



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Bioanálisis de Modificaciones Postraduccionales

Nitroxidativas del Fibrinógeno Humano

Consecuencias funcionales: estudios *in silico* e *in vitro*

Romina Antonella Medeiros Figueredo

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctora en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Agosto 2024

Bioanálisis de Modificaciones Postraduccionales

Nitroxidativas del Fibrinógeno Humano

Consecuencias funcionales: estudios *in silico* e *in vitro*

Tribunal:

Nombre presidente del tribunal: Dra. Leonor Thomson

Nombre integrante del tribunal: Dr. Nicolás Veiga

Nombre integrante del tribunal: Dra. Cecilia Porciúncula

Dra. Q.F. Graciela Borthagaray, Directora

Dra. Q.F. Margot Paulino, Directora

Bioanálisis de Modificaciones Postraduccionales Nitroxidativas del Fibrinógeno

Humano

Consecuencias funcionales: estudios *in silico* e *in vitro*

Romina Medeiros Figueredo, Dra.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTORAS: Dra. Q.F. Graciela Borthagaray¹, Dra. Q.F. Margot Paulino²

**(¹Departamento de Bioquímica Clínica – FQ – UdelaR, ²Unidad de Bioinformática –
Departamento de Experimentación y Teoría de la Estructura de la Materia y sus
Aplicaciones – FQ - UdelaR)**

Introducción General

Esta Tesis explora el impacto de la presencia de 3-nitrotirosina (NO₂Tyr), una modificación postraducciona (PTM) nitroxidativa, en el fibrinógeno (Fg), una proteína plasmática esencial en el proceso de coagulación sanguínea. El Fg es susceptible a nitración, pudiendo ocurrir alteraciones en su función, contribuyendo a enfermedades tromboticas. Esa nitración puede ocurrir en situaciones de estrés nitroxidativo, cuando se producen en exceso especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) que son moléculas altamente reactivas, capaces de modificar biomoléculas. La isquemia cerebral aguda del accidente cerebrovascular isquémico (ACVi), resultante de la obstrucción del flujo sanguíneo al cerebro, conduce a un aumento en la producción de ROS y RNS, y así a estrés nitroxidativo. El estudio se centra en cómo la nitración del Fg podría estar relacionada con el ACVi y busca proporcionar una comprensión más profunda de los mecanismos involucrados a través de diversas técnicas analíticas y de modelado molecular.

Análisis de 3-Nitrotirosina en Fibrinógeno mediante LC-MS/MS

En este Capítulo, se desarrollaron y optimizaron métodos avanzados de Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas Tándem (LC-MS/MS) para localizar y cuantificar los sitios de nitración en el Fg. Utilizando un sistema QTOF, se identificaron con éxito veinte sitios

diferentes de nitración de tirosina (Tyr) en las tres subunidades del Fg. La cuantificación relativa de NO₂Tyr se realizó midiendo el área bajo la curva de los picos en los cromatogramas. Luego, utilizando un sistema QqQLIT de alta sensibilidad, se analizaron muestras clínicas. Los resultados revelaron un mayor nivel de NO₂Tyr en el Fg de pacientes con ACVi en comparación con los controles, específicamente en los residuos βTyr⁴⁵², βTyr⁴⁷⁵ y γTyr³⁸⁰, sugiriendo que la nitración de Tyr podría tener aplicaciones diagnósticas.

Análisis de 3-Nitrotirosina en Plasma mediante métodos ELISA

Este Capítulo se centra en el desarrollo de ensayos de Inmunoabsorción Ligados a Enzimas (ELISA) para la cuantificación de NO₂Tyr en el Fg y el plasma. Se produjeron estándares de Fg nitrado (Fg-NO₂Tyr) y anticuerpos específicos para la detección de Fg. Se desarrollaron ensayos ELISA que permitieron detectar y cuantificar Fg, Fg-NO₂Tyr y NO₂Tyr. A pesar de las dificultades derivadas de la compleja matriz del plasma humano, se logró identificar concentraciones elevadas de NO₂Tyr en plasma de pacientes con ACVi. La técnica ELISA mostró ser efectiva para detectar niveles de NO₂Tyr. Los resultados indicaron un estado de estrés nitroxidativo en los pacientes con ACVi, lo cual es consistente con estudios previos y subraya la importancia de NO₂Tyr como biomarcador potencial.

Fibrinoformación y Fibrinólisis en Plasma de Pacientes con ACVi

Este Capítulo evaluó los procesos de fibrinoformación y fibrinólisis en plasma de pacientes con ACVi y en controles. Se analizaron parámetros clave como el tiempo de coagulación (Tc), la absorbancia máxima y el tiempo de fibrinólisis (Tf). Los resultados mostraron que los pacientes con ACVi tenían un Tc significativamente mayor y un Tf prolongado en comparación con los controles, lo que sugiere una capacidad fibrinolítica reducida. Estas alteraciones en la coagulación y fibrinólisis podrían estar relacionadas con la nitración del Fg y ofrecen una perspectiva sobre la alteración en la funcionalidad del coágulo en pacientes con ACVi.

Análisis de 3-Nitrotirosina en Trombos de ACVi

En este Capítulo, se investigaron trombos obtenidos de pacientes con ACVi tratados con trombectomía mecánica. Se utilizaron técnicas como SDS-PAGE, Western Blot y LC-MS/MS con inmunoprecipitación (IP) para identificar proteínas nitradas en los trombos. Se encontró que los trombos mostraban una heterogeneidad significativa en términos de tamaño, textura y composición, con la presencia de proteínas nitradas como el Fg, MMP-9, y actina citoplasmática. Estas proteínas nitradas están involucradas en la función cerebral y la

neuroinflamación, y podrían servir como biomarcadores útiles para la evaluación clínica del ACVi. A pesar de las limitaciones del método de IP, los resultados ofrecieron una nueva perspectiva sobre la nitración de proteínas en los trombos.

Modelado Molecular y Simulaciones de Dinámica Molecular del Fibrinógeno Humano

El Capítulo final se enfoca por un lado en el modelado y simulación de la estructura completa del Fg humano utilizando técnicas de modelado por homología y simulaciones de dinámica molecular (MD); y por otro lado en el estudio de la influencia de NO₂Tyr en su estructura e interacciones, mediante simulaciones de MD. Se construyó un modelo teórico tridimensional del Fg que incluyó las tres cadenas completas A α , B β y γ . La simulación reveló que el Fg presenta flexibilidad en las regiones α C y brindó una estructura completa y estable coherente con lo reportado en bibliografía. Las simulaciones de MD del Fg-NO₂Tyr mostraron cómo la nitración de Tyr³⁸⁰ en la cadena γ afecta la estructura del bolsillo Da, alterando la interacción con el ligando y potencialmente influenciando la polimerización y fibrinólisis del Fg. Estos resultados proporcionan una comprensión más detallada de cómo las PTMs, como la nitración, impactan la estructura y funcionalidad del Fg.

Conclusión General

La Tesis ofrece una visión integral sobre el impacto de la nitración en el Fg y su relación con el ACVi. Mediante el desarrollo y uso de técnicas analíticas avanzadas para su detección y cuantificación, junto con estudios funcionales y modelado molecular, se demostró por un lado que la nitración de Tyr en el Fg está presente en situación de ACVi; y por otro, que podría tener un efecto significativo en la estructura y función de esta proteína crucial para la coagulación. Se ha logrado una comprensión más profunda de esta PTM en Fg y su relación con la patología isquémica. Los hallazgos sugieren que la nitración podría ser un mecanismo relevante en la patogénesis del ACVi y podrían contribuir al desarrollo de nuevos biomarcadores y enfoques terapéuticos. La investigación subraya la importancia de continuar explorando las PTMs en el Fg, así como en otras proteínas relacionadas, para mejorar la comprensión de las enfermedades cardiovasculares y avanzar en la práctica clínica.

Bioanalysis of Nitroxidative Post-Translational Modifications of Human Fibrinogen

Functional consequences: *in silico* and *in vitro* studies

Romina Medeiros Figueredo, Dra.

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTORS: Dra. Q.F. Graciela Borthagaray¹, Dra. Q.F. Margot Paulino²

**(¹Department of Clinical Biochemistry – FQ – UdelaR, ²Bioinformatics Unit –
Department of Experimentation and Theory of the Structure of Matter and its
Applications – FQ - UdelaR)**

General Introduction

This Thesis explores the impact of 3-nitrotyrosine (NO₂Tyr), a nitroxidative post-translational modification (PTM), on fibrinogen (Fg), a plasma protein essential in the blood coagulation process. Fg is susceptible to nitration, which can lead to functional alterations and contribute to thrombotic diseases. This nitration can occur under conditions of nitroxidative distress, where there is an excess production of highly reactive molecules, reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), capable of modifying biomolecules. Acute cerebral ischemia resulting from ischemic stroke (IS) leads to increased production of ROS and RNS, thereby causing nitroxidative distress. The study focuses on how Fg nitration might be related to IS and aims to provide a deeper understanding of the mechanisms involved through various analytical and molecular modelling techniques.

Analysis of 3-Nitrotyrosine in Fibrinogen Using LC-MS/MS

In this Chapter, advanced Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) methods were developed and optimised to locate and quantify nitration sites in Fg. Using a QTOF system, twenty different tyrosine (Tyr) nitration sites in the three subunits of Fg were successfully identified. Relative quantification of NO₂Tyr was performed by measuring the area under the curve of the peaks in the chromatograms. Clinical samples were then analysed using a highly sensitive QqQLIT system. The results revealed higher levels of

NO₂Tyr in the Fg of IS patients compared to controls, specifically in the βTyr⁴⁵², βTyr⁴⁷⁵, and γTyr³⁸⁰ residues, suggesting that Tyr nitration could have diagnostic applications.

Analysis of 3-Nitrotyrosine in Plasma Using ELISA methods

This Chapter focuses on the development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) for quantifying NO₂Tyr in Fg and plasma. Nitrated Fg (Fg-NO₂Tyr) standards and specific antibodies for Fg detection were produced. ELISA assays were developed, enabling the detection and quantification of Fg, Fg-NO₂Tyr, and NO₂Tyr. Despite challenges arising from the complex matrix of human plasma, elevated concentrations of NO₂Tyr were identified in the plasma of IS patients. The ELISA technique proved effective in detecting NO₂Tyr levels, and the results indicated a state of nitroxidative stress in IS patients, consistent with previous studies and highlighting the importance of NO₂Tyr as a potential biomarker.

Fibrin Formation and Fibrinolysis in Plasma of IS Patients

This Chapter evaluated the processes of fibrin formation and fibrinolysis in the plasma of IS patients and controls. Key parameters such as coagulation time (Ct), maximum absorbance, and fibrinolysis time (Ft) were analyzed. The results showed that IS patients had significantly longer Ct and prolonged Ft compared to controls, suggesting reduced fibrinolytic capacity. These alterations in coagulation and fibrinolysis may be related to Fg nitration and offer insight into the altered clot functionality in IS patients.

Analysis of 3-Nitrotyrosine in IS Thrombi

In this Chapter, thrombi obtained from IS patients treated with mechanical thrombectomy were investigated. Techniques such as SDS-PAGE, Western Blot, and LC-MS/MS with immunoprecipitation (IP) were used to identify nitrated proteins in the thrombi. The thrombi showed significant heterogeneity in size, texture, and composition, with the presence of nitrated proteins such as Fg, MMP-9, and cytoplasmic actin. These nitrated proteins are involved in brain function and neuroinflammation and could serve as useful biomarkers for the clinical evaluation of IS. Despite the limitations of the IP method, the results provided new insights into protein nitration in thrombi.

Molecular Modelling and Molecular Dynamics Simulations of Human Fibrinogen

The final Chapter focuses on the modelling and simulation of the complete structure of human Fg using homology modelling techniques and molecular dynamics (MD) simulations, as well

as studying the influence of NO₂Tyr on its structure and interactions through MD simulations. A theoretical three-dimensional model of Fg was constructed, including the complete A α , B β , and γ chains. The simulation revealed that Fg exhibits flexibility in the α C regions and provided a complete and stable structure consistent with previous literature. MD simulations of Fg-NO₂Tyr showed how nitration of Tyr³⁸⁰ in the γ chain affects the structure of the Da hole, altering ligand interaction and potentially influencing Fg polymerization and fibrinolysis. These results provide a more detailed understanding of how PTMs, such as nitration, impact the structure and functionality of Fg.

General Conclusion

The Thesis offers a comprehensive view of the impact of nitration on Fg and its relationship with IS. Through the development and use of advanced analytical techniques for its detection and quantification, along with functional studies and molecular modelling, it was demonstrated that Tyr nitration in Fg is present in IS conditions and it could have a significant effect on the structure and function of this crucial coagulation protein. A deeper understanding of this PTM in Fg and its relationship with ischemic pathology has been achieved. The findings suggest that nitration could be a relevant mechanism in the pathogenesis of IS and may contribute to the development of new biomarkers and therapeutic approaches. The research underscores the importance of continuing to explore PTMs in Fg, as well as in other related proteins, to improve the understanding of cardiovascular diseases and advance clinical practice.

Indice

Capítulo 1: Introducción General.....	1
1. Fibrinógeno y Fibrina	2
1.1. Estructura del Fibrinógeno.....	2
1.2. Formación de Fibrina.....	4
1.3. Fibrinolisis	6
1.4. Otras Interacciones con Fibrinógeno y Fibrina.....	8
2. Estrés Oxidativo.....	10
2.1. Distrés Nitroxidativo.....	11
2.2. Especies Reactivas de Oxígeno.....	13
2.3. Especies Reactivas de Nitrógeno	14
2.4. Mecanismos Antioxidantes.....	19
2.5. Modificaciones Postraduccionales Nitroxidativas en Proteínas.....	19
3. Accidente Cerebrovascular Isquémico.....	22
3.1. Isquemia Cerebral Aguda.....	22
3.2. Fuentes de Especies Reactivas en Isquemia Cerebral Aguda	26
4. Determinación de 3-Nitrotirosina y Fibrinógeno Nitrado.....	28
4.1. Espectroscopía Ultravioleta-Visible.....	29
4.2. Cromatografía Líquida de Alto Desempeño	30
4.3. Espectrometría de Masas	30
4.4. Ensayos de Inmunoabsorción Ligados a Enzimas	31
4.5. Estado del Arte.....	31
5. Objetivos.....	35
5.1. Objetivo general.....	35
5.2. Objetivos específicos	35
Capítulo 2: Metodología	37
1. Datos Clínicos y Aspectos Éticos	38
2. Producción de Estándares de Proteínas Nitradas	39
2.1. Producción de Peroxinitrito	39
2.2. Tratamiento Nitrante de Proteínas	39
3. Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas tandem	40
3.1. Desarrollo de método de LC-MS/MS para localización de sitios de nitración y cuantificación relativa	40
3.2. Cuantificación de Fg Nitrado en plasma mediante método LC-MS/MS.	43
4. Ensayos de Inmunoabsorción Ligados a Enzimas	44
4.1. Desarrollo de ELISAs	44
4.2. Determinación de nitración en plasma con método ELISA.....	46

5. Ensayos de Fibrinoformación y Fibrinolisis	47
6. Estudio de Nitración en Trombos mediante Inmunoprecipitación y LC-MS/MS.....	47
6.1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio.....	48
6.2. Western Blotting	49
6.3. Inmunoprecipitación	50
6.4. Identificación de Proteínas Inmunoprecipitadas mediante LC-MS/MS.....	50
7. Modelado Molecular y Simulaciones de Dinámica Molecular	52
7.1. Modelado del Fibrinógeno Completo	52
7.2. Simulaciones de Dinámica Molecular del Fibrinógeno y Fibrinógeno Nitrado	56
Capítulo 3: Análisis de 3-Nitrotirosina en Fibrinógeno mediante LC-MS/MS	59
1. Introducción	60
1.1. Fundamentos de Espectrometría de Masas	60
1.2. Espectrometría de Masas Tándem como técnica para analizar Proteínas Modificadas	65
2. Resultados	67
2.1. Desarrollo de métodos LC-MS/MS	67
2.2. Cuantificación de Fibrinógeno Nitrado en plasma con método LC-MS/MS.....	74
3. Discusión.....	76
4. Conclusión	81
Capítulo 4: Análisis de 3-Nitrotirosina en Plasma mediante ELISA	82
1. Introducción	83
1.1. Fundamentos de ELISAs	83
1.2. Consideraciones de los Inmunoensayos para Analizar Proteínas Modificadas	83
1.3. Factores de Riesgo Cardiovascular	85
2. Resultados	86
2.1. Desarrollo de métodos ELISA	86
2.2. Análisis de nitración en plasma con método ELISA y correlación con FRC	90
3. Discusión.....	95
4. Conclusión	98
Capítulo 5: Fibrinoformación y Fibrinolisis en plasma de ACVi	100
1. Introducción	101
1.1. Hemostasis Primaria y Secundaria.....	101
1.2. Fibrinolisis	102
1.3. Estudios de Formación, Lisis y Estructura del Coágulo	104
2. Resultados	107
3. Discusión.....	112
4. Conclusión	114
Capítulo 6: Análisis de 3-Nitrotirosina en Trombos de ACVi.....	116

1.	Introducción	117
1.1.	Composición de los Trombos	117
1.2.	Fundamentos de SDS-PAGE	118
1.3.	Fundamentos del Western Blotting.....	122
1.4.	Fundamentos de la Inmunoprecipitación	127
1.5.	Análisis por Espectrometría de Masas: Orbitrap	129
2.	Resultados	131
2.1.	Caracterización de Trombos	132
2.2.	Inmunoprecipitación y análisis mediante LC-MS/MS.....	133
3.	Discusión.....	137
4.	Conclusión	140
	Capítulo 7: Modelado Molecular y Simulaciones de Dinámica Molecular	142
1.	Introducción	143
1.1.	Fundamentos del Modelado Molecular y Simulaciones Biomoleculares	143
1.2.	Diferentes Métodos de Modelado Molecular.....	146
1.3.	Simulaciones de Dinámica Molecular	150
1.4.	Limitaciones de Tamaño y Tiempo en Simulaciones de Dinámica Molecular.....	153
1.5.	Simulaciones Biomoleculares para estudio de PTMs en Proteínas.....	154
1.6.	Estructura Tridimensional del Fibrinógeno	156
2.	Resultados	158
2.1.	Modelado Molecular de la estructura completa del Fibrinógeno Humano	158
2.2.	Simulaciones de Dinámica Molecular de Fibrinógeno y Fibrinógeno Nitrado.....	177
3.	Discusión.....	196
4.	Conclusión	200
	Capítulo 8: Discusión General	202
	Capítulo 9: Conclusiones Finales.....	208
	Anexos	211
	Referencias.....	213

Lista de Tablas

<i>Nº</i>	<i>Título</i>	<i>Página</i>
1.1	Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno, radicalarias y no radicalarias	12
3.1	Péptidos de Fibrinógeno conteniendo 3-nitrotirosina identificados	68
3.2	Péptidos trípticos de Fibrinógeno seleccionados para el análisis MRM y SRM	71

5.1	Interpretación de parámetros derivados de curvas de formación y lisis de coágulo	108
6.1	Pooles de trombos agrupados por color, tamaño y escala NIHSS	135
6.2	Proteínas encontradas mediante LC-MS/MS luego de la IP del pool C	136
7.1	Valor medio $\pm$ SD (kcal/mol) de la energía total y de los tipos de energías, para cada cadena de Fibrinógeno	174
7.2	Entorno de 5 Å de cada residuo de tirosina (TYR) y 3-nitrotirosina (NTY), en las moléculas de Fibrinógeno y Fibrinógeno nitrado, respectivamente	186
7.3	Entorno de 5 Å de cada ligando en las moléculas de Fibrinógeno y Fibrinógeno nitrado	191
7.4	Energías de interacción entre los ligandos G e I y los bolsillos Da y Db, respectivamente	195

Lista de Figuras

Nº	Título	Página
1.1	Modelo esquemático de la estructura tridimensional completa del Fibrinógeno humano	2
1.2	Conversión de Fibrinógeno a Fibrina mediada por trombina	5
1.3	Representación esquemática de la degradación de Fibrina por plasmina	7
1.4	El estrés oxidativo y su relación con la señalización redox	10
1.5	Fuentes endógenas de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	13
1.6	Vías de reacción del peroxinitrito	15
1.7	Vías de oxidación de la tirosina por peroxinitrito	17
1.8	Detalle de eventos que ocurren durante la cascada isquémica	24
1.9	Cadena de transporte electrónico mitocondrial	26
1.10	Espectros UV-visible de tirosina y 3-nitrotirosina	29
1.11	Tirosina, radical tirosilo y 3-nitrotirosina	32
2.1	Proceso de construcción de la molécula completa de Fibrinógeno	52
2.2	Residuo NTY en el archivo de topologías	57
3.1	Identificación de 3-nitrotirosina en el péptido triptico β GSWYSMR de fibrinógeno nitrado <i>in vitro</i>	66

3.2	Comparación de los análisis MRM y SRM del péptido $\beta^{54}\text{EEAPSLRPAPPPIISGGGYR}^{72}$ del fibrinógeno nitrado <i>in vitro</i>	73
3.3	Boxplots del porcentaje de nitración para cada residuo de tirosina estudiado, en las muestras clínicas	75
4.1	Curvas de calibración obtenidas en el ELISA sándwich para la detección de Fibrinógeno	87
4.2	Curvas de calibración en el ELISA sándwich para la detección de Fibrinógeno nitrado	88
4.3	ELISA sándwich para la determinación de Fibrinógeno nitrado, efecto de la presencia de Fibrinógeno nativo	88
4.4	Curva de calibración del ELISA de inhibición para la determinación de 3-nitrotirosina total	89
4.5	Análisis comparativo de los valores medios de las variables en las cohortes estudiadas	92
4.6	Análisis de valores de 3-nitrotirosina del grupo ACVi, considerando la presencia de FRC e inflamatorios	93
4.7	Influencia de factores de riesgo cardiovascular e inflamatorios en el grupo ACVi	93
4.8	Análisis de valores de 3-nitrotirosina del grupo CTL, considerando la presencia de FRC e inflamatorios	94
4.9	Comparación de los niveles de 3-nitrotirosina en los grupos ACVi y CTL, subdivididos según la presencia de algunos FRC	94
5.1	Mecanismo de la hemostasis primaria y secundaria	102
5.2	Resumen del proceso fibrinolítico	103
5.3	Perfil de turbidez durante la coagulación	104
5.4	Tromboelastogramas normales	106
5.5	Curva de fibrinoformación y fibrinólisis de coágulo esperada	107
5.6	Curvas de fibrinoformación y fibrinólisis de coágulo obtenidas	108
5.7	Distribución de tiempos de coagulación en cada grupo clínico estudiado	109
5.8	Distribución de absorbancia máxima en cada grupo clínico estudiado	110
5.9	Correlación de la absorbancia máxima con la concentración de Fibrinógeno en cada individuo estudiado	110
5.10	Distribución de tiempos de fibrinólisis en cada grupo clínico estudiado	111

6.1	Dodecilsulfato de Sodio uniéndose a un polipéptido	119
6.2	Estructura química de la matriz de poliacrilamida	120
6.3	Flujo de trabajo de un experimento de SDS-PAGE	121
6.4	Organización de un "sándwich" de transferencia para el electroblotting húmedo	124
6.5	Detección de proteínas objetivo usando un sustrato basado en quimioluminiscencia	125
6.6	Flujo de trabajo en un experimento de Western Blot típico	126
6.7	Flujo de trabajo en un experimento de inmunoprecipitación con perlas magnéticas	129
6.8	Geometría del analizador de masas Orbitrap	131
6.9	Caracterización electroforética de los trombos estudiados	132
6.10	Western blotting de extractos y sobrenadantes de los trombos estudiados	134
6.11	Electroforesis de inmunoprecipitados de pools de trombos	135
7.1	Esquema de diferentes métodos de modelado molecular	148
7.2	Un modelo típico de Campo de Fuerza (Hamiltoniano)	149
7.3	Resolución espaciotemporal de las técnicas de modelado molecular	154
7.4	Modelo de la molécula de Fibrinógeno obtenido	160
7.5	Representación de la estructura secundaria del modelo de Fibrinógeno obtenido	161
7.6	Imágenes de microscopía de la molécula de Fibrinógeno, recabadas de bibliografía	164
7.7	Región del Conector- α C que contiene conformaciones tipo Poli-L-prolina II	165
7.8	Desviación Cuadrática Media de la molécula de Fibrinógeno y sus cadenas durante la Simulación de MD	168
7.9	Fluctuación Cuadrática Media de las cadenas del Fibrinógeno	171
7.10	Fluctuaciones Cuadráticas Medias de cada residuo de la molécula de Fibrinógeno	172
7.11	Evolución estructural del sistema de la molécula completa de Fibrinógeno	173
7.12	Energías de Interacción entre las diferentes cadenas del Fibrinógeno	176
7.13	Estructura de partida de la molécula, para los ensayos de Fibrinógeno nativo y nitrado	178

7.14	Desviación Cuadrática Media de las moléculas de Fibrinógeno y de Fibrinógeno nitrado	181
7.15	Fluctuación Cuadrática Media de las moléculas de Fibrinógeno y de Fibrinógeno nitrado	182
7.16	Región D del Fibrinógeno humano, conteniendo bolsillos de interacción, ligandos y residuos de tirosina de interés	185
7.17	Desviación Cuadrática Media de los entornos de 5 Å de cada residuo de TYR/NTY estudiado	189
7.18	Estado estructural inicial y final de los bolsillos Da y Db conteniendo los ligandos G e I, y residuos de TYR y NTY en el entorno	195

Lista de abreviaturas

3D: Tridimensional

α_2 -AP: α_2 -antiplasmina

γ : cadena gama del Fibrinógeno humano

γ_A : isoforma A de la cadena γ

$A\alpha$: cadena alfa del Fibrinógeno humano, incluyendo al FpA

$A\alpha-2$: isoforma 2 de la cadena $A\alpha$

ACN: Acetonitrilo

ACV / ACVi: Accidente Cerebrovascular / ACV Isquémico

AFM: Microscopía de Fuerza Atómica (Atomic Force Microscopy)

ARD: Distrés Respiratorio Agudo (Acute Respiratory Distress)

AT-1: Antitrombina 1

ATP: Adenosín Trifosfato

AUC: Área Bajo la Curva (Area Under the Curve)

$B\beta$: cadena beta del Fibrinógeno humano, incluyendo al FpB

BCIP: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BHE: Barrera Hematoencefálica

BSA: Seroalbúmina Bovina (Bovine Seralbumin)

BSA-NO₂Tyr: BSA Nitrada

C-terminal/es: Carboxilo-terminal/es

C_α : Carbono Alfa

CAT: Catalasa

CD: Dicroísmo Circular (Circular Dichroism)
CI: Intervalo de Confianza (Confidence Interval)
CID: Disociación Inducida por Colisión (Collision-Induced Dissociation)
CG: Grano Grueso (Coarse Grained)
COX: Ciclooxygenasa
CTL: Control
CCFR: Control Con Factores de Riesgo
CSFR: Control Sin Factores de Riesgo
CV: Coeficiente de Variación
DM: Diabetes Mellitus
DO: Densidad Óptica
DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido (Differential Scanning Calorimetry)
DTT: Ditioneitol
ELISA: Ensayos de Inmunoabsorción Ligados a Enzimas (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EM: Microscopía Electrónica (Electron Microscopy)
ESI: Ionización por Electrospray (Electrospray Ionization)
Fb: Fibrina
FF: Campo de Fuerza (Force Field)
Fg: Fibrinógeno humano
Fg-NO₂Tyr ó FgNY: Fg Nitrado
FGF-2: Factor de Crecimiento Fibroblástico-2 (Fibroblast Growth Factor 2)
FP: Fb/Plaquetas
FpA: Fibrinopéptido A
FpB: Fibrinopéptido B
FO: Fosforilación Oxidativa
FRC: Factor/es de Riesgo Cardiovascular
FT: Transformada de Fourier (Fourier Transform)
fXIII / fXIIIa: factor XIII / factor XIII activado (misma nomenclatura para los otros factores de la coagulación)
GB: Glóbulos Blancos
GC: Cromatografía de Gases (Gas Chromatography)
GR: Glóbulos Rojos
GSH: Glutación

GSH-Px: Glutati3n Peroxidasa
 GSH-R: Glutati3n Reductasa
 HPLC: Cromatograf3a L3quida de Alto Desempe3o (High Performace Liquid Chromatography)
 HRGP: Glicoprote3na Rica en Histidina (Histidine-Rich Glycoprotein)
 HRP: Peroxidasa de Rábano (Horseradish Peroxidase)
 HTA: Hipertensi3n Arterial
 I/R: Isquemia/Reperusi3n
 IC50: Concentraci3n Inhibitoria media (half-maximal Inhibitory Concentration)
 ICA: Isquemia Cerebral Aguda
 IDA: Adquisici3n Dependiente de Informaci3n (Information Dependent Acquisition)
 IL-1 β : Interleuquina-1 β
 IP: Inmunoprecipitaci3n
 IQR: Rango Intercuartil (Interquartile Range)
 KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin
 LC-MS/MS: Cromatograf3a L3quida acoplada a Espectrometr3a de Masas Tándem (Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry)
 LDL: Lipoprote3na de Baja Densidad (Low Density Lipoprotein)
 LIT: Trampa de Iones Lineal (Linear Ion Trap)
 LIT-Orbitrap: Trampa de Iones Lineal – Orbitrap
 LJ: Lennard-Jones
 LLOQ: L3mite de Cuantificaci3n M3nimo (Lower Limit of Quantification)
 Lp(a): Lipoprote3na(a)
 m/z: relaci3n masa-carga
 Mac-1: integrina leucocitaria $\alpha_M\beta_2$
 MD: Dinámica Molecular (Molecular Dynamics)
 MeSOX: Metionina Sulf3xido
 MM: Mecánica Molecular
 MMP-9: Martiz Metaloproteinas-a-9
 MPO: Mieloperoxidasa
 MRM: Monitoreo de Reacci3n M3ltiple (Multiple Reaction Monitoring)
 MS: Espectrometr3a de Masas (Mass Spectrometry)
 MS/MS 3 MSⁿ: Espectrometr3a de Masas Tándem

MSR: Metionina Sulfóxido Reductasa

N-terminal/es: Amino-terminal/es

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NBT: Tetrazolio Nitroazul (Nitroblue Tetrazolium)

NETs: Trampas Extracelulares de Neutrófilos (Neutrophil Extracellular Traps)

NIHSS: Escala de Accidente Cerebrovascular de los Institutos Nacionales de Salud

NMDA: N-metil-D-ácido aspártico

NMR: Resonancia Magnética Nuclear (Nuclear Magnetic Resonance)

NOS / eNOS / nNOS / iNOS: Óxido Nítrico Sintasa (Nitric Oxide Synthase) / NOS endotelial / NOS neuronal / NOS inducible

NO₂Tyr / NTY: 3-nitrotirosina

NPT: Ensamble Isobárico-Isotérmico

PAI-1 y 2: Inhibidor del Activador del Plasminógeno (Plasminogen Activator Inhibitor)

PBS: Solución Salina Tamponada con Fosfato (Phosphate-buffered Saline)

PCR: Proteína C Reactiva

PDB: Protein Data Bank

PLA2: Fosfolipasa A2

PM: Peso Molecular

PME: Particle Mesh Ewald

PPII: Poliprolina II

PTM: Modificación Postraducciona (Post-Translational Modification)

PVDF: Fluoruro de Polivinilideno (Polyvinylidene Difluoride)

Q1 / Q2 / Q3: Cuadrupolo 1 / Cuadrupolo 2 / Cuadrupolo 3

QC: Química Cuántica (Quantum Chemistry)

QM: Mecánica Cuántica (Quantum Mechanics)

QqQ: Triple Cuadrupolo

QqQLIT: Triple Cuadrupolo – Trampa de Iones Lineal

QTOF: Cuadrupolo – Tiempo de Vuelo

RG: Radio de Giro (Radius of Gyration)

RMSD: Desviación Cuadrática Media (Root Mean Square Deviation)

RMSF: Fluctuación Cuadrática Media (Root Mean Square Fluctuation)

RNS: Especies Reactivas del Nitrógeno (Reactive Nitrogen Species)

ROC: Características Operativas del Receptor (Receiver Operating Characteristic)

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno (Reactive Oxygen Species)

SASA: Área de Superficie Accesible al Solvente (Solvent-Accessible Surface Area)

SD: Desviación Estándar (Standard Deviation)

SDS: Dodecilsulfato de Sodio (Sodium Dodecyl-Sulfate)

SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SOD: Superóxido Dismutasa

SRM: Monitoreo de Reacción Seleccionada (Selected Reaction Monitoring)

TAFI: Inhibidor de la Fibrinólisis Activable por Trombina (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor)

Tc: Tiempo de Coagulación

TEM: Tromboelastometría

TF: Factor Tisular (Tissue Factor)

Tf: Tiempo de Fibrinólisis

TFA: Ácido Trifluoroacético (Trifluoroacetic Acid)

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

TOF: Tiempo de Vuelo (Time of Flight)

tPA: activador tisular del plasminógeno (Tissue Plasminogen Activator)

Tyr / TYR: tirosina

VDAC3: Canal Aniónico Dependiente de Voltaje 3 (Voltage-Dependent Anion Channel 3)

VdW: Van der Waals

VE-cadherina: receptor endotelial vascular cadherina

VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (Vascular Endothelial Growth Factor)

VWF: Factor de von Willebrand (von Willebrand Factor)

WB: Western Blotting

XIC: Cromatograma de Iones Extraído (Extracted Ion Chromatogram)

XO: Xantina Oxidasa

Capítulo 1: Introducción General

1. Fibrinógeno y Fibrina

1.1. Estructura del Fibrinógeno

El fibrinógeno humano (Fg) es una macromolécula glicoproteica de síntesis hepática, cuyo peso molecular (PM) es de aproximadamente 340 kDa, y vida media de unos 4 días. Constituye el 4% del total de las proteínas plasmáticas, lo cual lo convierte en una de las mayoritarias, con una concentración fisiológica de aproximadamente entre 200 y 400 mg/dL. Tiene un papel central en la hemostasia, formando las redes de fibrina (Fb) del coágulo, aunque no es su única función.

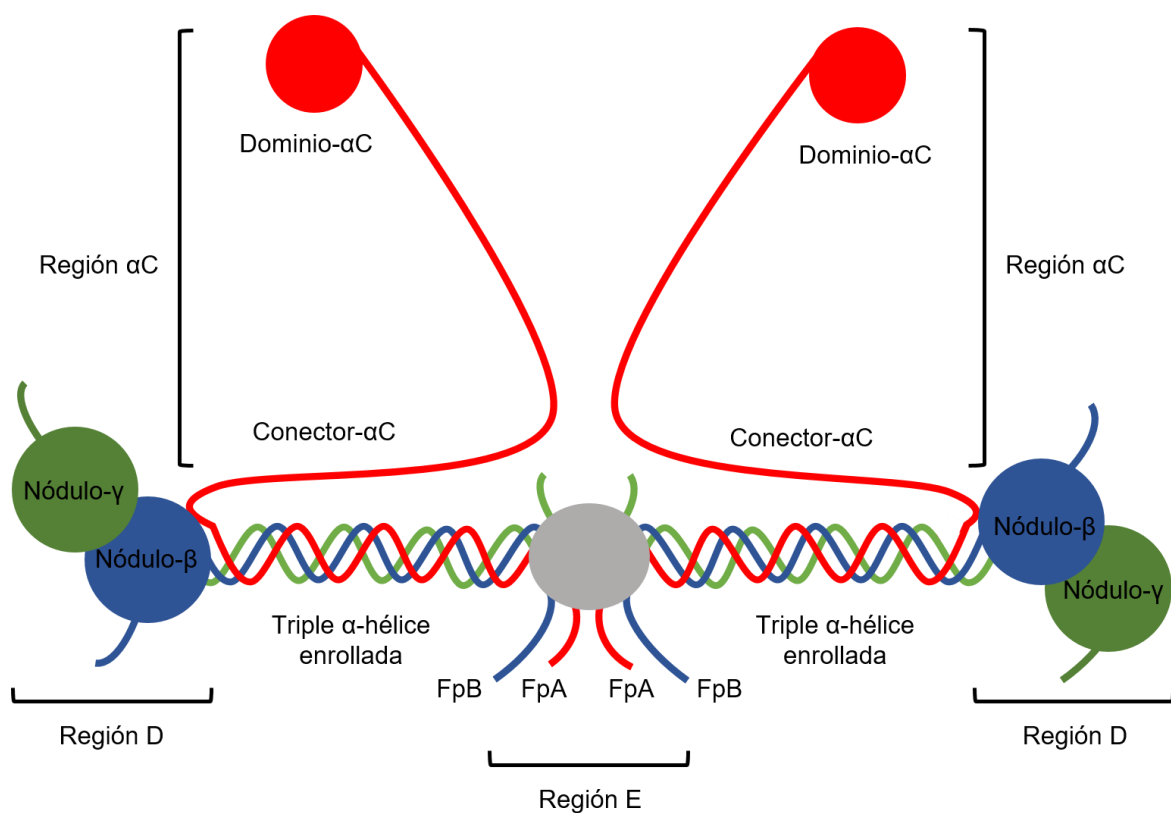


Figura 1.1. Modelo esquemático de la estructura tridimensional completa del Fibrinógeno humano. Cadenas Aα: rojas. Cadenas Bβ: azules. Cadenas γ: verdes. Se representa con un círculo gris la región E central, donde se conectan los extremos N-terminales de todas las cadenas. De la región E emergen los fibrinopéptidos A (FpA) y B (FpB). Esta región central está conectada con las regiones D laterales por triple α-hélices enrolladas. Las regiones D contienen las porciones C-terminales de las cadenas Bβ y γ, formando estructuras globulares llamadas nódulo-β y nódulo-γ, respectivamente. Finalmente, las porciones C-terminales de las cadenas Aα forman las regiones αC, que emergen de las hélices enrolladas. Esta región se subdivide además en un conector-αC y un dominio-αC.

Esta molécula, de 45 nm de largo y 9 nm de grosor, está compuesta por dos juegos de tres polipéptidos: Aα (alfa, isoforma predominante Aα-2 con 625 residuos, 66,5 kDa), Bβ (beta, 461 residuos, 52,0 kDa) y γ (gama, isoforma predominante γ_A con 411 residuos, 46,5 kDa),

unidos mediante enlaces de hidrógeno y 29 enlaces disulfuro. Tiene dos regiones D conectadas a una región central E mediante segmentos de triple α -hélices (hélices enrolladas) unidas por seis puentes disulfuro. En la región E están los extremos amino-terminales (N-terminales) unidos por cinco puentes disulfuro simétricos y un “anillo” peptídico cerrado a través de un puente disulfuro. Los extremos carboxilo-terminales (C-terminales) de las cadenas B β y γ se encuentran en las regiones D, formando el nódulo- β y el nódulo- γ , respectivamente. Mientras que los extremos C-terminales de la cadena A α forman una estructura independiente llamada región α C, de una longitud de aproximadamente 400 residuos, con dos subregiones llamadas conector- α C y dominio- α C, cuya estructura es parcialmente desordenada por lo cual no se puede observar en el cristal. En la Figura 1.1 se puede observar un modelo de la molécula completa de Fg, mostrando las regiones mencionadas. Finalmente, las cadenas B β y γ contienen carbohidratos unidos mediante enlaces N-glucosídicos a residuos de Asn³⁶⁴ en la cadena B β y Asn⁵² en la cadena γ , formados por ácido siálico, galactosa, manosa y N-acetilglucosamina.^[1,2,3] La molécula de Fg tiene cuatro sitios de unión a calcio de alta afinidad, uno en cada nódulo- γ y otro en cada nódulo- β .^[4,5]

El Fg es una molécula muy heterogénea. Existen variantes fisiológicas de la secuencia aminoacídica de las cadenas A α y γ con diferentes PM, cargas y funciones de la proteína. En adición, la unión covalente a carbohidratos también modifica su PM.^[6] La variante A α E contiene 236 aminoácidos más que la cadena A α y está presente en el llamado Fg de alto PM, de 420 kDa, el cual representa un 30% del Fg total circulante.^[7] También existe una cadena γ' minoritaria producto del splicing alternativo del transcripto primario que implica la sustitución de la secuencia 408-411V en γ_A por una secuencia aniónica de 20 aminoácidos (γ' 408-427) que contiene dos residuos de tirosina (Tyr) sulfatados.^[8,9] Estas cadenas son capaces de transportar trombina y factor XIII (fXIII) en su extremo C-terminal.^[10] Las cadenas γ' representan el 8% del total de cadenas γ y determinan que existan otras tres variantes de Fg de distinto PM: Fg 1 γ - γ (85% del total), Fg 2 heterodimérico γ' - γ (15% del total) y Fg homodimérico γ' - γ' (1% del total).^[11]

1.2. Formación de Fibrina

Cada cadena A α contiene un fibrinopéptido A (FpA, A α 1-16) en su extremo N-terminal, que al ser clivado por trombina en el enlace Arg-Gly, deja expuesto un sitio de polimerización llamado botón E_A, que da inicio a la formación de Fb. Una porción de E_A es la secuencia ¹⁷Gly-Pro-Arg-Val²⁰ (GPRV) que se encuentra N-terminal.^[12] Cada botón E_A se combina con un bolsillo complementario en la región D (Da) de otra molécula de Fg. El bolsillo Da se encuentra entre los residuos 337 y 379 de la cadena γ (nódulo- γ). La asociación entre E_A y Da les permite a las moléculas de Fb alinearse a través de las regiones finales y centrales que se superponen de forma desplazada una longitud de medio monómero, para formar fibrillas doble cadena. Estas fibrillas se asocian lateralmente para crear fibras con múltiples hebras.^[13]

La liberación del fibrinopéptido B (FpB, B β 1-14) por acción de la trombina es más lenta que la del FpA. Este proceso expone otro sitio de polimerización, botón E_B, que comienza con los residuos ¹⁵Gly-His-Arg-Pro¹⁸ (GHRP) de la cadena β , e interactúa con un sitio complementario de la cadena β en la región D, el bolsillo Db. Esta interacción contribuye a la asociación lateral induciendo rearrreglos en el nódulo- β de la región D, que promueven contactos intermoleculares nódulo- β :nódulo- β . La polimerización de Fb des-BB (carente de FpB) resulta en el mismo tipo de estructura fibrilar que con la Fb des-AA (carente de FpA), pero la resistencia del coágulo es menor. La Figura 1.2 muestra el inicio del proceso de formación de la red de Fb.^[14]

La región α C se origina en el residuo 220, donde emerge de la triple α -hélice. Es un brazo flexible que puede disociarse y reasociarse intermolecularmente mediante interacciones no covalentes, favoreciendo la agregación bilateral para formar haces de mayor grosor.^[15] Los coágulos de Fb que se forman de un Fg carente de la porción C-terminal de las regiones α C presentan tiempos de coagulación prolongados, turbidez disminuida y generan fibras más delgadas.^[16] En algunos casos las regiones α C están cercanas y conectadas no covalentemente a la región E, pero se disocian luego del clivado de FpB, lo que los deja disponibles para la interacción con regiones α C de otra molécula, promoviendo la asociación lateral de más fibrillas.

Existen dos sitios constitutivos de auto-asociación en el nódulo- γ de la región D, que participan en el ensamble y entrecruzamiento de la Fb, llamados γ_{XL} y D:D. El sitio γ_{XL} se superpone a la región de entrecruzamiento, y la asociación intermolecular entre dos sitios γ_{XL} promueve el alineamiento de estas regiones para que se dé la transglutaminación mediada por fXIII activado

(fXIIIa).^[17] Cada sitio D:D está situado en la porción externa de la región D entre los residuos 275 y 300 del nódulo- γ . Estos sitios son necesarios para el correcto alineamiento D-D. Disfibrinogemias congénitas como el Fg Tokyo II (γ R275C), que presentan interacciones D-D defectuosas, generan redes con más ramificaciones debido al lento ensamble de Fb e inapropiado posicionamiento de los monómeros.^[18]

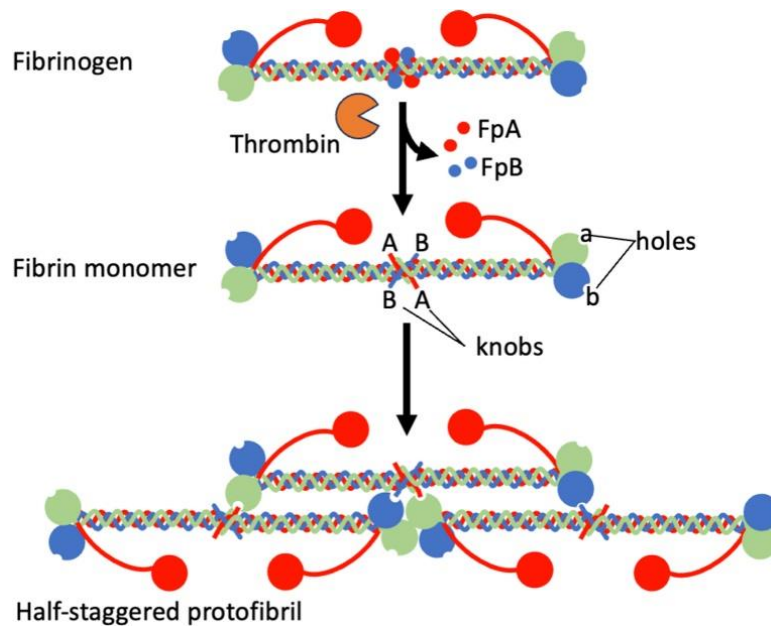


Figura 1.2. Conversión de Fibrinógeno a Fibrina mediada por trombina. Cadenas α : rojas. Cadenas β : azules. Cadenas γ : verdes. La conversión de fibrinógeno en fibrina mediada por trombina procede mediante la eliminación proteolítica de los fibrinopéptidos de los extremos N-terminales de las cadenas α (FpA, 16 aminoácidos) y β (FpB, 14 aminoácidos), quedando el monómero de fibrina. La exposición de los nuevos N-terminales en las cadenas α y β permite el encaje de estos "botones" o "knobs" (A y B) en "bolsillos" o "holes" (a y b) de los dominios globulares C-terminales de las cadenas γ y β (nódulo- γ y nódulo- β , respectivamente). Las regiones α C promueven posteriormente la agregación de protofibrillas semi-desplazadas en fibras de fibrina integradas en una red de fibrina. Imagen extraída de revisión "Fibrinogen and fibrin: synthesis, structure, and function in health and disease" de Alisa S. Wolberg.^[14]

En el sitio de entrecruzamiento presente en el nódulo- γ , el fXIIIa cataliza la formación de γ dímeros introduciendo enlaces covalentes intermoleculares amida entre el grupo amino de la Lys⁴⁰⁶ de una cadena γ y el grupo carbonilo de la Gln³⁹⁸ de la otra.^[19] El mismo tipo de enlaces son generados más lentamente entre Gln y Lys de las cadenas α , creando α -oligómeros y polímeros, y entre cadenas γ y α .^[20] Se han propuesto dos tipos de entrecruzamientos: el longitudinal que liga los extremos de dos monómeros alineados, y el transversal que entrecruza cadenas γ de dos monómeros en hileras diferentes; existiendo evidencia el transversal sería el tipo más probable de entrecruzamiento.^[13]

1.2.1. *Arquitectura de la Red de Fibrina*

La arquitectura de la Fb no es igual en todos los casos, existen muchas variaciones en su estructura asociadas tanto a situaciones fisiológicas como patológicas. Ésta puede ser homogénea o heterogénea si posee poros o nudos, respectivamente. Usualmente una arquitectura compacta de porosidad disminuida se asocia con fibras más finas y con muchas ramificaciones, mientras que una estructura abierta generalmente se relaciona a fibras gruesas.^[21] La estructura de la red de Fb determina la velocidad de lisis.^[22]

En las redes de Fb existen dos tipos de ramificaciones.^[23] La primera se da cuando dos fibrillas doble cadena, mediante interacciones débiles, convergen lateralmente para formar fibrillas de cuatro cadenas: la unión bilateral. La convergencia lateral de fibrillas adicionales genera una versión multifibrillar de esta estructura. El otro tipo de ramificación, llamada equilateral, se forma por interacciones convergentes entre tres monómeros de Fb, generando tres fibras doble cadena. Este tipo de uniones se forman con mayor frecuencia cuando el clivado de los fibrinopéptidos es lento, y produce redes más ramificadas con una matriz menos porosa que la formada en condiciones de altos niveles de trombina.^[24]

Existen muchos factores influyentes en las características de la red de Fb: la concentración y calidad del Fg, la fuerza iónica del medio, la concentración de iones calcio, la concentración de trombina y algunos estados patológicos como diabetes mellitus (DM). Al aumentar la concentración de Fg la Fb resulta más compacta y rígida, de mayor turbidez, menos permeable y más difícil de lisar.^[25] Otro ejemplo es que el Fg de alto PM genera una Fb más abierta y favorece el crecimiento de estructuras capilares.^[26] La presencia de anormalidades congénitas o adquiridas en el Fg también alteran su funcionalidad provocando desórdenes hemostáticos. El calcio mantiene la estructura y estabilidad a la vez que aumenta el grosor de las fibras, la rigidez y resistencia mecánica de los geles de Fb.^[27]

1.3. Fibrinólisis

La fibrinólisis se da cuando la plasmina, producto de la activación del plasminógeno por el activador tisular del plasminógeno (tPA) cliva proteolíticamente a la Fb. El tPA es sintetizado por las células endoteliales vasculares y circula en el plasma. La activación del plasminógeno mediada por tPA se ve acelerada ante la presencia de Fb y polímeros de Fg entrecruzados. La activación del plasminógeno ocurre cuando éste se añade al tPA unido a Fb, formando un complejo ternario. Posteriormente el clivado de la Fb por la plasmina, que hidroliza enlaces

arginil y lisil en las hélices enrolladas, crea sitios de unión adicionales, potenciando la fibrinólisis. Hay dos sitios en la Fb involucrados en la activación del plasminógeno por tPA: α 148-160 (similar afinidad por tPA y plasminógeno) y γ 312-324 (exclusivamente tPA). Ambos sitios son crípticos en el Fg, pero se exponen durante la formación de la red de Fb, como consecuencia de interacciones intermoleculares D:E que inducen cambios conformacionales en la región D.^[28,29,30] Esa exposición se revierte cuando el complejo se disocia. Sin embargo, en el Fg hay un sitio de unión a plasminógeno de alta afinidad en la porción distal del dominio- α C, en la cual también hay un sitio de unión a tPA, lo cual regula la fibrinólisis dejando al plasminógeno disponible para la formación del complejo ternario en el sistema Fb.^[31]

La degradación del Fg por plasmina genera fragmentos X, Y, D y E. El fragmento X resulta cuando se clivan las regiones α C, y cuando ocurre el clivado en la mitad de una de las regiones de triple hélices enrollada se generan los fragmentos Y y D. El subsecuente clivado de los fragmentos Y produce los fragmentos D y E.^[32] Debido al entrecruzamiento, los productos de degradación de Fb son diferentes, y la degradación se da más lentamente. El más pequeño, llamado complejo 1 es DD/E y resulta del clivado de ambas triple hélices manteniéndose las uniones no covalentes entre la región E central de una molécula y dos regiones terminales D de otras dos moléculas. El complejo 2 consta de dos fragmentos YD/DY idénticos orientados como imagen especular. El complejo 3 contiene las subunidades YY y DXD intactas, y el complejo 4 son los fragmentos YXD o DXY (Figura 1.3).^[3] La ruptura posterior de los complejos más grandes lleva a la formación del complejo 1.^[33]

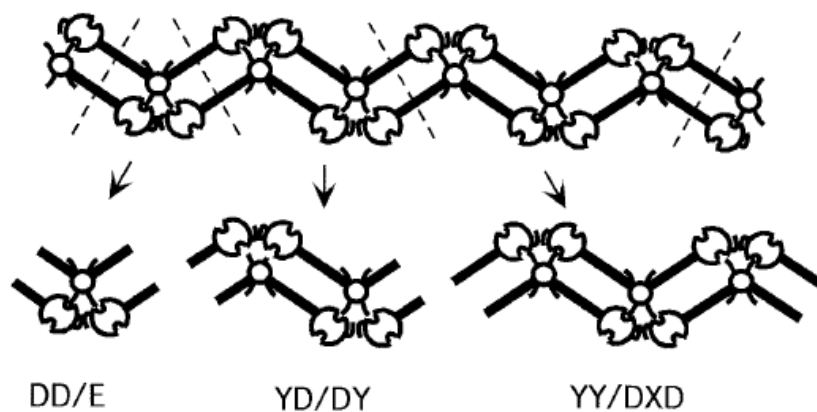


Figura 1.3. Representación esquemática de la degradación de Fibrina por plasmina. Se muestra una fibrilla de doble cadena. Las líneas punteadas indican el sitio de clivado por plasmina para generar los complejos 1 (DD/E), 2 (YD/DY) y 3 (YY/DXD). Imagen extraída de revisión "Fibrinogen: Structure, Function, and Surface Interactions" de Cristina Fuss et al.^[3]

La velocidad de la fibrinólisis está estrechamente relacionada con la arquitectura de la red de Fb. Dado que la plasmina corta transversalmente fibras individuales, las fibras delgadas serán cortadas antes que las gruesas. Redes de estructura abierta se lisan a mayor velocidad que las compactas, a causa de la menor cantidad de fibras por unidad de volumen y que los componentes fibrinolíticos pueden moverse más libremente dentro de la red.^[21]

El inhibidor de plasmina, α_2 -antiplasmina (α_2 -AP), puede ser entrecruzado covalentemente a las cadenas A α en la posición 303, por el fXIIIa, y su presencia aumenta la resistencia a la fibrinólisis.^[34] Además, el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1 y -2), un inhibidor de la activación de plasminógeno por tPA, puede ser entrecruzado a la Fb en varios sitios en el dominio- α C lejanos al α 303, amplificando la resistencia a la fibrinólisis.^[35]

1.4. Otras Interacciones con Fibrinógeno y Fibrina

La unión de trombina a Fg se da a través de un sitio de reconocimiento en la trombina: exosito 1.^[36] Esa interacción no sólo promueve el clivado y liberación de FpA y, eventualmente, FpB, sino que genera una Fb con potencial de unirse a trombina, pero no como su sustrato. Esta capacidad de la Fb se le llama actividad antitrombina I (AT-I)^[37] y está representada por dos tipos de sitios de unión a trombina, uno de baja afinidad en la región E (dos por molécula aproximadamente) y otro de mayor afinidad en la región D de moléculas que contienen una cadena γ' .^[38] La unión de baja afinidad involucra residuos en los extremos N-terminales de las cadenas α , β y γ .^[39] Los sitios de alta afinidad se encuentran en los extremos C-terminales de las cadenas γ' entre los residuos 414 y 427, y los residuos de Tyr sulfatados en 418 y 422 incrementan el potencial de unión. Existen estudios que relacionan la deficiencia o defecto en la actividad AT-I con mayor riesgo de sufrir enfermedades tromboembólicas.^[13]

La lipoproteína(a) (Lp(a)) es un complejo lipoproteico aterogénico formado por apoLp(a) unida mediante puentes disulfuro a la mitad apoLp B-100 de la lipoproteína de baja densidad (LDL). Se une a la Fb y Fg degradados por plasmina, en el dominio- α C mediante un mecanismo lisina dependiente, compitiendo con el plasminógeno por los sitios de unión, y es entrecruzada al Fg en presencia de fXIIIa. Su presencia en el Fg tiene un efecto inhibidor de la fibrinólisis.^[40]

La glicoproteína rica en histidina (HRGP) es una proteína plasmática y plaquetaria que se une específicamente al Fg y la Fb de forma iónica. La unión a Fg tiene efecto sobre la cinética de conversión de Fg a Fb, enlenteciéndola y generando geles de menor turbidez. La interacción con Fb tiene un rol en la interacción célula-célula entre plaquetas y macrófagos.^[41] Una alta

proporción de esta proteína circula ligada al plasminógeno lo cual reduce la concentración efectiva de plasminógeno.^[42]

Además de mediar el ensamble de Fb, la secuencia β 15-42 une heparina^[43] y participa en interacciones celulares y con la matriz. Dicha secuencia media el *spreading* plaquetario,^[44] la proliferación fibroblástica, la unión con células endoteliales,^[45] la formación y proliferación de capilares interactuando con el receptor endotelial vascular cadherina (VE-cadherina)^[46] y la liberación de factor de von Willebrand (VWF).^[47] El *spreading* plaquetario es un proceso por el cual las plaquetas adherentes primero se aplanan en los sitios de lesión vascular y aumentan su área de contacto mediante la deformación de la membrana plasmática, el cual constituye un paso crucial para la hemostasia y la trombosis.

Ocurren muchas interacciones celulares con el Fg y Fb a través de la unión a integrina por las secuencias Arg-Gly-Asp (RGD) en A α 572-575 (RGDS) y posiblemente en A α 95-98 (RGDF).^[48] En el caso de las plaquetas, los sitios RGD compiten con la secuencia γ A400-411 por la unión a la integrina α Ib β 3.^[49]

La integrina leucocitaria α M β 2 (Mac-1) es un receptor de Fg (y Fb) de alta afinidad en monocitos y neutrófilos activados, muy importante en la respuesta inflamatoria.^[50] El sitio de unión al Mac-1 se encuentra en la región D y contiene dos secuencias peptídicas: γ 190-202 (P1) y γ 377-395 (P2). P1 es parte integral del nódulo- γ mientras que P2 está inserto en este nódulo y forma una lámina- β antiparalela con P1.^[51]

La superficie de interacción con Fg más importante es el receptor GP IIb-IIIa de las plaquetas. Esta interacción se da luego de que el Fg se une a las integrinas plaquetarias. Existen seis de estos sitios en una molécula de Fg. Una secuencia de 11 aminoácidos en el extremo C-terminal de las dos cadenas γ es crucial para el reconocimiento específico de la integrina α Ib β 3 (que forma parte de GP IIb-IIIa) en las plaquetas activadas, permitiendo la unión de una plaqueta en cada extremo o de una plaqueta con las dos interacciones. Esto es esencial para la incorporación de Fg granular al coágulo en formación, y este Fg también es un cofactor para la agregación y liberación.^[52]

En adición a las muchas interacciones ya comentadas, hay otras proteínas que se unen al Fg y Fb y afectan su comportamiento. La fibronectina se une a la cadena α en la región C-terminal de la Fb a través del entrecruzamiento por fXIIIa con el residuo Gln³⁹⁸ de la primera,^[53]

incrementando el grosor y la rigidez del coágulo.^[54] El factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) se unen a Fg y potencian la proliferación celular. La interleuquina-1 β (IL-1 β) es participante de la respuesta inflamatoria y también se une al Fg (y Fb).^[55]

2. Estrés Oxidativo

Las células utilizan oxígeno (O_2) para generar energía y forman especies reactivas radicalarias y no radicalarias, con propiedades oxidantes y nitrantes, como resultado principalmente de la producción de adenosín trifosfato (ATP) mitocondrial. La producción de oxidantes biológicos es necesaria para mantener la homeostasis celular y se ha demostrado que es crucial para los procesos fisiológicos. Más específicamente, las especies reactivas superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) son productos de la función celular normal y se utilizan en varios procesos fisiológicos. Esto incluye la señalización celular, la respiración mitocondrial, la vasodilatación y la defensa celular durante la fagocitosis por células inmunitarias como los neutrófilos. Esos agentes reactivos, si no son detenidos por la acción de antioxidantes, que forman especies no tóxicas, forman parte de una cadena de propagación donde se combinan con otros para formar especies más dañinas.^[56] Estos antioxidantes forman parte de un sistema de defensa natural que todos los organismos poseen.

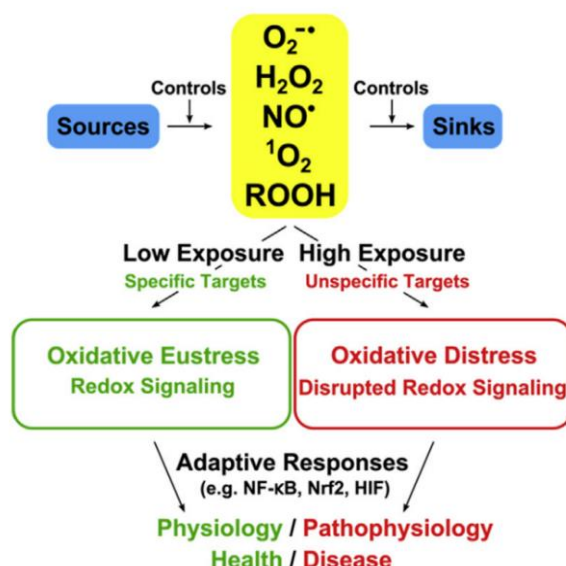


Figura 1.4. El estrés oxidativo y su relación con la señalización redox. Diversos oxidantes son producidos por fuentes endógenas o exógenas. Sus niveles en estado estacionario también son controlados por reacciones de eliminación (sumideros). Una baja exposición a oxidantes permite dirigirse a objetivos específicos en el uso de la señalización redox (eustrés oxidativo), mientras que una alta exposición conduce a una señalización redox interrumpida y/o daño a biomoléculas (distrés oxidativo). Las respuestas adaptativas modulan y contrarrestan estos efectos. El resultado contribuye a los procesos de salud y enfermedad. Extraído de "Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis" de Helmut Sies.^[58]

Cuando las especies reactivas se producen en exceso y no son equilibradas por la capacidad antioxidante, puede producirse estrés oxidativo y efectos adversos asociados. El concepto de estrés oxidativo fue formulado en el año 1985 y ha ido evolucionando con el tiempo y los numerosos hallazgos realizados. Se define como un “desbalance entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, llevando a una disrupción de la señalización y control redox y/o a daño molecular”.^[57,58] El estrés oxidativo se clasifica de acuerdo a la intensidad, desde lo fisiológico (eustrés) al estallido tóxico que daña biomoléculas (distrés). La exposición a bajas concentraciones de especies oxidantes y nitrantes se utiliza para señalización redox con dianas específicas, mientras que la alta exposición resulta en daño a dianas inespecíficas.^[59] La Figura 1.4 esquematiza estas definiciones.

2.1. Distrés Nitroxidativo

Dada la gran diversidad de oxidantes con sus amplios rangos de reactividad química y biológica, se han definido varios subtipos de estrés oxidativo, de acuerdo a la forma en que se generan. Uno de esos subtipos es el estrés nitroxidativo (estrés oxidativo y nitrativo^[60]) que representa la actividad nitrativa del peroxinitrito (ONOO^-). Entonces, el distrés nitroxidativo es un proceso en el cual la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) supera los mecanismos antioxidantes generando un desbalance a favor de las primeras. Por ende, representa un estado en el cual hay niveles elevados de ROS y RNS, los cuales, como ya se indicó, son productos del metabolismo de los organismos aerobios, que han sido parcialmente reducidos y tienen una alta reactividad y capacidad oxidante y nitrante. En la Tabla 1.1 se presenta una lista de ellos.^[61,62]

La sobreproducción de estas especies, así como la deficiencia de mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, lleva a un estado de desequilibrio prooxidante con divergentes efectos en las funciones celulares como ser diferenciación y crecimiento celular, señalización de factores de crecimiento, respuestas mitogénicas, modulación de la matriz extracelular y disparo de apoptosis, inactivación de NO^* , detección de O_2 y estimulación de genes proinflamatorios y quinasas.^[63] Los agentes oxidantes y nitrantes tienen un muy breve tiempo de vida media (mili, micro o nanosegundos), baja selectividad y elevada reactividad, por lo cual reaccionan fácilmente con biomoléculas intra y extracelulares como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y membranas, dañando su estructura y funcionalidad. Por ejemplo, su acción sobre las proteínas puede resultar en una pérdida o ganancia de función. No obstante, también existe evidencia de que estas especies al producirse de forma regulada ayudan a mantener la

homeostasis a nivel celular en tejidos sanos, tienen un papel como segundos mensajeros y modulan vías de señalización.^[64]

Durante la situación de distrés nitroxidativo, estos oxidantes y nitrantes biológicos pueden reaccionar con los lípidos, proteínas y/o el ADN, alterando su función normal, lo cual tiene diversas implicaciones en enfermedades.^[65] La magnitud y las consecuencias del distrés nitroxidativo dependen tanto de la intensidad como de la duración de la condición. Existen numerosos estudios que demuestran que el distrés nitroxidativo está involucrado en la fisiopatología de enfermedades como DM, hipertensión arterial (HTA), enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, tabaquismo y envejecimiento.^[66]

Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)			
Especies Radicales		Especies No Radicales	
$O_2^{\bullet-}$	Superóxido	H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
$OH^{\bullet}$	Hidroxilo	$HOCl$	Ácido hipocloroso
$RO_2^{\bullet}$	Peroxilo	O_3	Ozono
$C_nH_{(2n+2)-1}^{\bullet}$	Alquilo	1O_2	Oxígeno singulete
$RO^{\bullet}$	Alcoxilo	RCO	Carbonilos excitados
$HO_2^{\bullet}$	Hidroperoxilo	$ROOH$	Hidroperóxido
$HQ^{\bullet}$	Semiquinona		
Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS)			
Especies Radicales		Especies No Radicales	
$NO^{\bullet}$	Óxido nítrico	$ONOO^-$	Peroxinitrito
$NO_2^{\bullet}$	Dióxido de nitrógeno	$ONOOH$	Ácido peroxinitroso
		$ONOOCO_2^-$	Nitrosoperoxicarbonato
		O_2NOO^-	Peroxinitrato
		$ROONO$	Alquilperoxinitritos
		N_2O_3	Trióxido de dinitrógeno
		N_2O_4	Tetraóxido de dinitrógeno
		HNO_2	Ácido nitroso
		NO_2^+	Catión nitronio
		NO_2^-	Nitrito
		NO^-	Anión nitroxilo
		NO^+	Catión nitroxilo
		NO_2Cl	Cloruro de nitrilo

Tabla 1.1. Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno, radicalarias y no radicalarias. Además, existen otras especies reactivas de cloro, bromo, azufre, selenio y carbonilo.

Las principales fuentes de ROS y RNS son la cadena de transporte electrónico de la mitocondria y el retículo endoplasmático.^[67] Son producidos por todos los tipos celulares (neutrófilos, monocitos, macrófagos, etc.) y existen enzimas capaces de sintetizarlos también, las más importantes son la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, xantina oxidasa (XO) y óxido nítrico sintasa (NOS); pero también hay otras como la mieloperoxidasa (MPO), aldehído oxidasa, ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasa, deshidrogenasa, triptofano-dioxigenasa y flavoproteína-deshidrogenasa.^[68] La Figura 1.5 muestra esquemáticamente cuáles son las fuentes endógenas de ROS y RNS.

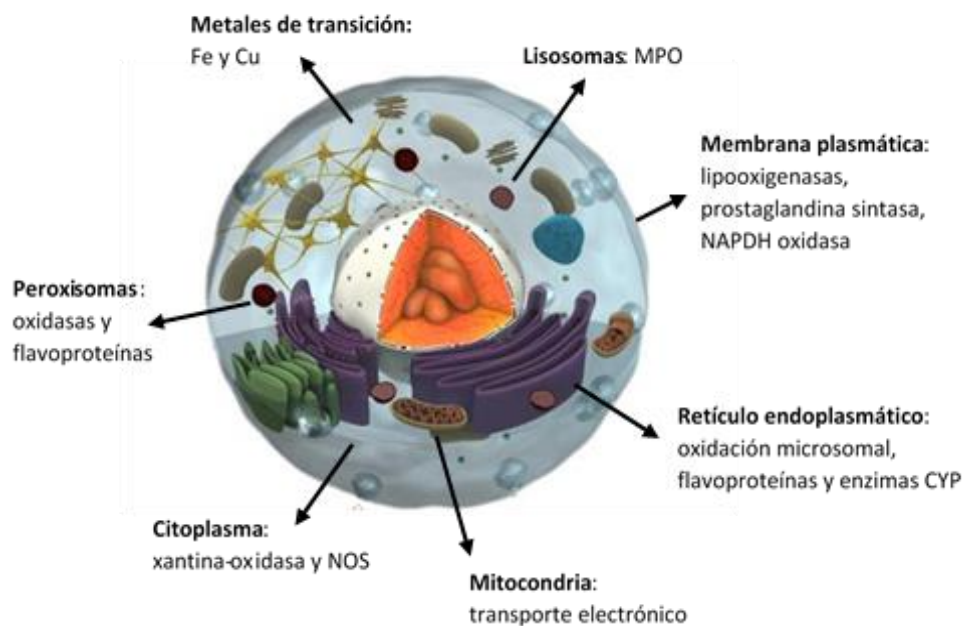


Figura 1.5. Fuentes endógenas de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. MPO: mieloperoxidasa. NOS: óxido nítrico sintasa.

2.2. Especies Reactivas de Oxígeno

En los organismos eucariotas más del 90% de las ROS son producidas en la cadena de transporte electrónico, durante la cual un pequeño número de electrones son transferidos al O_2 de forma prematura, formando $O_2^{\bullet-}$, una ROS primaria.^[69] Las células inflamatorias fagocíticas del sistema inmune, como los neutrófilos, utilizan $O_2^{\bullet-}$ y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para destruir a los patógenos. Esta reacción es catalizada por la enzima de membrana NADPH oxidasa que genera $O_2^{\bullet-}$ al donar electrones desde NADPH al O_2 .

En células no fagocíticas, citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), $IL-1\beta$ e interferón gama ($IFN-\gamma$), al unirse a sus receptores estimulan la generación de ROS importantes

para la señalización. Varios factores de crecimiento, al unirse con sus receptores también los generan e inician señales mitogénicas, y también, dependiendo de su isoforma, son capaces de inhibir o activar a la NADPH oxidasa.^[70] Otros estímulos como angiotensina II, serotonina, 5-hidroxitriptamina, bradiquinina, trombina y endotelina, también generan especies oxidantes al interactuar con receptores acoplados a proteína G.^[71]

El radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$) es una de las ROS más reactivas; tiene una vida media de 10^{-9} segundos *in vivo*, y, por lo tanto, cuando se produce, reacciona en su sitio de formación. Bajo condiciones fisiológicas normales, el $\text{OH}^\bullet$ se produce mediante la escisión del H_2O_2 , catalizada por metales de transición, en un proceso conocido como la reacción de Fenton.^[72] Bajo condiciones de estrés oxidativo, como las que ocurren durante el estallido respiratorio, el exceso de $\text{O}_2^{\bullet-}$ promueve la liberación de hierro libre de proteínas que contienen hierro, como las proteínas hierro-azufre (4Fe-4S). El hierro divalente liberado (Fe^{2+}) puede participar en la reacción de Fenton catalizada por metales, produciendo radicales altamente reactivos ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$).

2.3. Especies Reactivas de Nitrógeno

Las RNS incluyen los radicales $\text{NO}^\bullet$ y dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2^\bullet$), ONOO^- , y otros óxidos de nitrógeno y productos que se generan cuando el $\text{NO}^\bullet$ reacciona con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y alcoxilo ($\text{RO}^\bullet$). El $\text{NO}^\bullet$ tiene un rol importante en el señalamiento celular, vasodilatación y respuesta inmune. Es una pequeña molécula neutra sintetizada de forma constitutiva a nivel endotelial por la eNOS en una reacción donde la L-arginina y el O_2 son convertidos en $\text{NO}^\bullet$ y citrulina a través de un proceso oxidativo de cinco electrones, requiriendo varios cofactores como flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN), NADPH, tetrahidrobiopterina y hemo.^[73] Existiendo, además, una forma constitutiva neuronal (nNOS) y una forma inducible (iNOS). El $\text{NO}^\bullet$ también es producido probablemente por reacciones no enzimáticas como la reacción de nitritos con el ácido en el estómago.^[74] El $\text{NO}^\bullet$ no es particularmente problemático *in vivo*, ya que existen mecanismos suficientes para prevenir su acumulación. Es menos reactivo que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y difunde desde la célula a través de la membrana celular hacia los glóbulos rojos (GR). Una vez en los GR, se convierte en nitrato (NO_3^-) mediante una reacción con oxihemoglobina, lo que limita su vida media a medio segundo.^[75,76] El $\text{NO}^\bullet$ en concentraciones micromolares inhibe la catalasa y el citocromo P-450, involucrados en el metabolismo oxidativo. De manera similar, también puede inhibir a la enzima citocromo c oxidasa, lo que incrementa transitoriamente la fuga de $\text{O}_2^{\bullet-}$ de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

2.3.1. Formación de Peroxinitrito

Como ya se dijo, el $\text{NO}^\bullet$ es un radical libre y como tal puede participar en reacciones con otras especies reactivas.^[77] Por otro lado, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ existe en forma de anión, el cual es más propenso a donar un electrón que a aceptar uno de otra molécula. Cuando ambas especies, $\text{NO}^\bullet$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$ son sintetizadas en proximidad, la reacción limitada por difusión entre el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el $\text{NO}^\bullet$ ($k_M 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) produce un agente fuertemente oxidante y nitrante: el ONOO^- . La reacción radical-radical entre el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el $\text{NO}^\bullet$ para producir ONOO^- es más rápida que la reacción entre el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y la superóxido dismutasa (SOD) para su dismutación ($k = 1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), y compite eficazmente con ella.^[78] Entonces el interjuego entre la producción y eliminación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y su reacción con el $\text{NO}^\bullet$ modulan la actividad biológica de éste. Un aumento de 10 veces tanto en $\text{O}_2^{\bullet-}$ como en $\text{NO}^\bullet$ puede resultar en un aumento de 100 veces en la formación de ONOO^- . En condiciones inflamatorias hay un aumento de los reactivos del orden de 1000 veces, lo que resulta en un aumento de 1000000 veces en la formación del producto ONOO^- .^[79] El ONOO^- a pH fisiológico es capaz de protonarse para dar ácido peroxinitroso (ONOOH , $\text{pK}_a = 6.8$) que genera $\text{OH}^\bullet$ y $\text{NO}_2^\bullet$, o se descompone a NO_3^- (Figura 1.6).^[80]

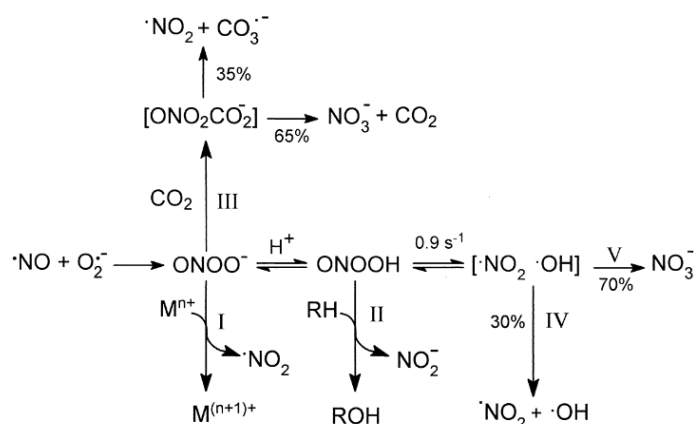
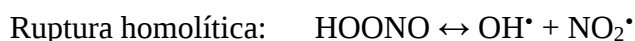


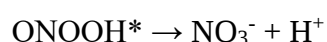
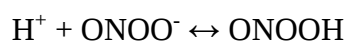
Figura 1.6. Vías de reacción del peroxinitrito. Los números I a V indican posibles destinos del peroxinitrito: las reacciones directas incluyen la oxidación de un electrón de centros metálicos de transición (Fe, Mn, Cu) (I); la oxidación de dos electrones con un sustrato objetivo (RH) (II) y la formación de nitrosoperoxycarbonato (III), que se descompone rápidamente en radicales secundarios. El ácido peroxinitroso sufre homólisis para producir radicales libres $\text{NO}_2^\bullet$ y $\text{OH}^\bullet$ (IV) o se reorganiza a nitrato (V). Imagen extraída de “Unraveling peroxynitrite formation in biological systems” de Rafael Radi et al.^[80]

En comparación con el anión, el ONOOH es más reactivo y podría ser el responsable de la mayoría de las reacciones citotóxicas atribuidas al ONOO^- . Sus principales reacciones incluyen oxidaciones de uno y dos electrones y nitraciones.

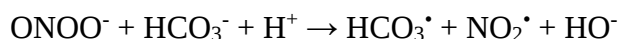
El enlace O-O del ONOOH puede ser roto homolítica y heterolíticamente:



La primera reacción rinde dos oxidantes potentes y podría ser responsable de la oxidación, mientras que la segunda genera un poderoso agente nitrante y podría guiar las reacciones de nitración. Iones metálicos podrían catalizar el clivado heterolítico porque la separación inicial de cargas requiere una alta energía de activación. Sin embargo, la ruptura homolítica no es posible cinética ni termodinámicamente,^[81] y se ha postulado que el rearreglo del ácido peroxinitroso para dar ácido nítrico involucra un intermediario de alta energía: ONOOH*, el cual reacciona con sustratos para formar productos similares a los formados por el radical OH[•].^[82] Entonces:

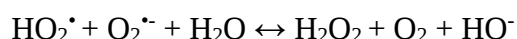
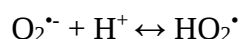
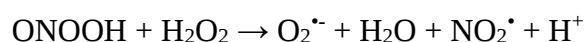


Además, la interacción del ONOO⁻ con bicarbonato, presente en el medio, es importante para su reactividad. Las especies formadas por la reacción del ONOO⁻ con el carbonato son más reactivas y de menor vida media que el ONOO⁻. Estas especies serían radicales libres bicarbonato:



Por esto, e independientemente del mecanismo involucrado, el contenido de bicarbonato en una reacción es un factor importante a tener en cuenta.

La reacción del ONOOH con H₂O₂ se da por un mecanismo de un electrón y resulta en la liberación de oxígeno:



Así, el $\text{NO}^\bullet$ es prooxidante pues el ONOO^- generado es un agente fuertemente oxidante y nitrante a nivel de proteínas y lípidos de membrana e intracelulares.^[83] Incluso a pH fisiológico su relativa estabilidad le permite difundir a través de largas distancias a escala celular y hasta atravesar membranas. El anión ONOO^- es relativamente estable en soluciones básicas ($\text{pH} > 12$) y puede mantenerse congelado a -80°C por semanas. En solución tiene un color amarillo y se determina su concentración midiendo absorbancia a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).^[84]

Existe una relación inversa entre reactividad y especificidad, es decir que las especies altamente reactivas son menos específicas con lo que reaccionarán. Por ejemplo, se ha demostrado que el $\text{OH}^\bullet$ es tan reactivo que solo puede difundir aproximadamente el diámetro de una proteína desde su sitio de producción. En contraste, el ONOO^- reacciona más lentamente que el $\text{OH}^\bullet$, por lo que su área de acción es mayor y más selectiva en cuanto a con qué reaccionará. En consecuencia, el ONOO^- puede influir en procesos biológicos. Se ha demostrado que el ONOO^- es más eficiente en la producción de iones OH^- que la reacción de Fenton. El radical $\text{OH}^\bullet$ puede hidroxilar al ácido benzoico, y también reacciona con muchos compuestos fenólicos como fenol, salicilato y Tyr,^[85] y residuos de Tyr en proteínas abstrayendo el hidrógeno, y el $\text{NO}_2^\bullet$ restante del ONOO^- luego reacciona con el anillo aromático para formar derivados 3-nitrotirosina (NO_2Tyr) a través del radical intermediario tirosilo (Figura 1.7).^[86,87]

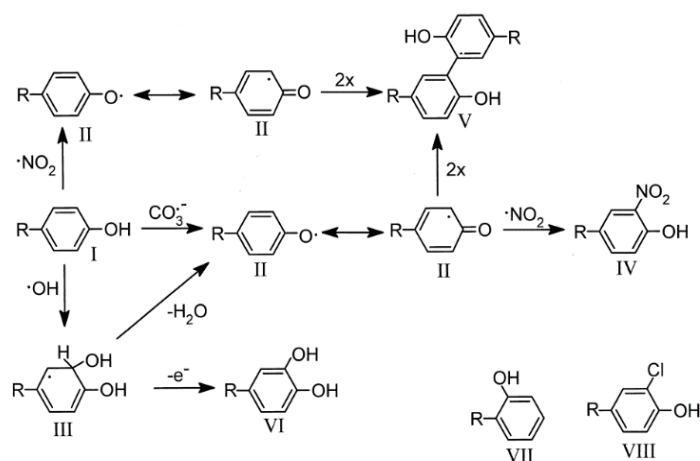


Figura 1.7. Vías de oxidación de la tirosina por peroxinitrito. Los compuestos representados son tirosina (I), radical tirosilo (II), aducto de radical tirosina-hidroxilo (III), 3-nitrotirosina (IV), 3,3'-ditirosina (V), 3-hidroxitirosina (VI), todos los cuales pueden producirse durante las reacciones de oxidantes derivados del peroxinitrito con la tirosina. Tanto el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ como el $\text{NO}_2^\bullet$ pueden realizar una abstracción de un electrón de la tirosina para producir el radical tirosilo, mientras que el $\text{OH}^\bullet$ predominantemente conduce a la formación de un aducto de radical que puede descomponerse por eliminación de agua en radical tirosilo, o ser oxidado a 3-hidroxitirosina, entre otras reacciones. También se muestran o-tirosina (VII) y 3-clorotirosina (VIII), productos de la reacción del $\text{OH}^\bullet$ o HOCl con la tirosina, respectivamente. Imagen extraída de "Unraveling peroxynitrite formation in biological systems" de Rafael Radi et al.^[80]

El triptófano también puede ser nitrado.^[88] Esta reacción de nitración involucra el clivado heterolítico del ONOOH para generar el ion nitronio (NO_2^+) y el anión hidroxilo (OH^-), como se mostró anteriormente, y el NO_2^+ nitró al sustrato.

Son al menos tres las vías oxidativas que hacen al ONOO^- tan reactivo: descomposición catalizada por ion hidrógeno (H^+) para formar un intermediario con la reactividad del radical $\text{OH}^\bullet$ y $\text{NO}_2^\bullet$,^[89] reacción directa del anión con grupos sulfhidrilos,^[90] y reacción con iones metálicos para formar potentes agentes nitrantes parecidos al ion NO_2^+ .^[91]

El ONOO^- está involucrado en la patología de muchas enfermedades, en la mayoría de las cuales la evidencia que lo implica es la detección de NO_2Tyr en los tejidos dañados. Algunas de esas enfermedades son aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedades neurodegenerativas, inflamación aguda y síndrome de distrés respiratorio (ARD).^[92] Este compuesto puede oxidar seroalbúmina bovina (BSA) generando grupos carbonilos, y se ha encontrado que altas concentraciones causan fragmentación. También induce la peroxidación de lípidos y la nitración de proteínas y compuestos fenólicos de bajo peso molecular, que se asumen como una marca de la presencia de ONOO^- *in vivo*. Aunque hay otros agentes nitrantes como el $\text{NO}_2^\bullet$, éstos no contribuyen a la formación de NO_2Tyr *in vivo* por la existencia de reacciones competitivas. En las proteínas del plasma humano aproximadamente el 0.7 % de los residuos de Tyr están nitrados. En las proteínas de los leucocitos polimorfonucleares la fracción de residuos nitrados es mayor (1.4 %).^[93]

2.3.2. Significancia Biológica del Peroxinitrito

Los efectos del ONOO^- *in vitro* se han probado usando concentraciones tan altas como 0.1-1 mM para producir efectos medibles. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la rápida descomposición del ONOO^- *in vivo* y compararse la toxicidad en unidades de tiempo por concentración. La exposición neta al ONOO^- puede ser calculada por la cinética de pseudo primer orden de su descomposición. La concentración de ONOO^- a tiempo t es:

$$[\text{ONOO}^-]_t = [\text{ONOO}^-]_0 e^{-kt}$$

Donde k es la constante de descomposición del ONOO^- . Integrando esta ecuación con respecto al tiempo desde cero a infinito se obtiene la exposición neta:

$$\int_0^\infty [\text{ONOO}^-]_t dt = \frac{[\text{ONOO}^-]_0}{k} \left[-e^{-kt} \right]_0^\infty = \frac{[\text{ONOO}^-]_0}{k}$$

con unidades de tiempo por concentración. Se puede calcular que la exposición a, por ejemplo, un bolo de 250 μM es equivalente a una exposición estable a 1 μM durante 7 minutos.^[94,95]

2.4. Mecanismos Antioxidantes

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que retrasa o inhibe la oxidación de un sustrato.^[96] Los antioxidantes son aquellas sustancias que previenen la producción o neutralizan las ROS y RNS, cuando estas se encuentran en concentraciones significativas.^[97] Esa defensa antioxidante que tiene como objetivo contrarrestar los efectos negativos de los agentes oxidantes, se puede clasificar como interna o externa (origen nutricional), y como enzimática y no enzimática. Los mecanismos antioxidantes enzimáticos incluyen a la SOD, que se encuentra en tres isoformas (Cu/Zn, mitocondrial y extracelular) y cataliza la dismutación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 .^[98] También es importante la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) que reduce al H_2O_2 y peróxidos lipídicos a agua y alcoholes lipídicos oxidando glutatión (GSH) a disulfuro de glutatión. Otras enzimas antioxidantes son la catalasa (CAT) que convierte H_2O_2 en O_2 y H_2O , hemo oxigenasa (HO), glutatión reductasa (GSH-R) y peroxiredoxinas. Los antioxidantes no enzimáticos son moléculas de bajo peso molecular como el GSH, la vitamina C, vitamina E, carotenoides y retinoides.

Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos actúan de manera cooperativa; por ejemplo, la reducción de la vitamina C por el tripéptido antioxidante GSH es respaldada por la GSH-R, que regenera el GSH reducido utilizando NADPH como reductor. Otro buen ejemplo de cómo los antioxidantes actúan cooperativamente es el antioxidante α -tocoferol (vitamina E), un antioxidante no enzimático, que se ha demostrado que es uno de los antioxidantes más eficientes en la neutralización de lípidos mediante reducción. El radical tocoferoxilo resultante es luego reducido nuevamente a su forma original por el anión soluble en agua ascorbato (vitamina C). Estos antioxidantes no enzimáticos requieren reducción enzimática para volver a su estado anterior. En la mayoría de las células, los tres antioxidantes enzimáticos más abundantes son SOD, CAT y GSH-Px.^[99]

2.5. Modificaciones Postraduccionales Nitroxidativas en Proteínas

Como ya se comentó, los oxidantes y nitrantes biológicos pueden modificar biomoléculas, incluyendo ADN, lípidos y proteínas. Las principales razones para un aumento en el nivel de proteínas oxidadas o nitradas pueden desglosarse en cuatro factores principales: un aumento

en la tasa de producción de ROS o RNS, una disminución en la eliminación de esas ROS o RNS por antioxidantes, una mayor susceptibilidad de las proteínas (por ejemplo, debido a una estructura alterada) y, finalmente, una disminución en la tasa de eliminación de proteínas modificadas por proteasas.^[100]

Las proteínas pueden ser oxidadas o nitradas, entre otras modificaciones posibles, de varias formas, todas consideradas modificaciones postraduccionales (PTMs) nitroxidativas. Estas modificaciones pueden ocurrir de múltiples maneras. El primer tipo de modificación involucra la escisión oxidativa del esqueleto de la proteína o de la cadena lateral de los aminoácidos. Los residuos más susceptibles a este tipo de modificaciones de escisión oxidativa del esqueleto son Pro, Arg, Lys, Thr, Glu y Asp. El mecanismo involucra la abstracción de un átomo de hidrógeno α por un radical, causando la escisión del esqueleto en el enlace peptídico; esto deja un radical centrado en carbono, que reacciona con O_2 para formar un intermedio radical peroxilo-alquilo, seguido por la formación de un peróxido de alquilo y, finalmente, un radical alcoxi. En ausencia de oxígeno, el radical de carbono formado durante la fragmentación oxidativa del péptido también puede formar un enlace cruzado carbono-carbono con otra proteína.^[101]

Otro tipo de modificación postraducciona que puede ocurrir es en las cadenas laterales de los aminoácidos, las cuales varían en su susceptibilidad a la modificación.^[102] Por ejemplo, la fosforilación está involucrada en las vías de señalización celular, la metilación y la acetilación en la regulación de la transcripción génica y la función proteica; y la hidroxilación en las vías de excreción del metabolismo de fármacos.

Algunas de modificaciones son una consecuencia química del estrés nitroxidativo; por ejemplo, la formación de carbonilos en los aminoácidos Lys, Pro, Thr y Arg son marcas bien establecidas y medidas del daño oxidativo general. Los aminoácidos que contienen cadenas laterales de azufre, Cys y Met, son especialmente destacables ya que se encuentran entre los residuos más sensibles a la oxidación por casi todas las formas de oxidantes biológicos. Las modificaciones oxidativas en las cadenas laterales de Cys incluyen mono, di y tri oxidación, llamadas respectivamente ácidos sulfénico, sulfínico y sulfónico.^[103] Incluso bajo condiciones leves de estrés oxidativo, los residuos de Cys pueden modificarse a disulfuros y la Met a metionina sulfóxido (MeSOX). Las modificaciones oxidativas de estos aminoácidos son reversibles, y podrían considerarse las únicas modificaciones verdaderamente reversibles de los residuos de aminoácidos. Fisiológicamente, la formación de disulfuros es la consecuencia

más común de la oxidación de Cys, y es reversible mediante la reducción de vuelta al estado de tiol por el sistema de tiorredoxina. La Met también tiene una cadena lateral que contiene azufre, la cual puede ser oxidada por una variedad de oxidantes biológicos. La forma oxidada de la Met, MeSOX, al igual que la Cys, puede ser reducida a su estado original. Esta reducción es catalizada enzimáticamente por la metionina sulfóxido reductasa (MSR), y consecuentemente, la MSR se considera una enzima antioxidante y de reparación de proteínas.^[104] La oxidación de los residuos de Met usualmente tiene poco efecto biológico, y la reducción cíclica de MeSOX actúa como un eliminador innato de oxidantes biológicos para proteger a las proteínas de modificaciones oxidativas irreversibles extensas.

También se ha reportado que la His es uno de los aminoácidos más susceptibles a reacciones de oxidación. Una modificación común de la His es la 2-oxo-histidina, que ocurre tras la exposición al H_2O_2 .^[105] Otro residuo susceptible a las PTMs nitrooxidativas es el Trp, que puede modificarse a N-formilquinurenina; quinurenina, 5-hidroxitriptófano, 7-hidroxitriptófano y nitrotriptófano.

Como se describió anteriormente, las modificaciones en los residuos de Tyr después de la exposición a especies nitrantes pueden formar NO_2 Tyr, que se considera un posible marcador de isquemia e inflamación.^[106]

El último tipo de modificación en las proteínas es la adición indirecta de productos oxidativos moleculares, por ejemplo, la adición del producto de la peroxidación lipídica malondialdehído.

Debido a que las proteínas tienen muchas funciones únicas diferentes, tales modificaciones nitrooxidativas pueden tener diversas consecuencias funcionales. Por ejemplo, las modificaciones estructurales oxidativas en las enzimas pueden inhibir su actividad normal. Las enzimas con metales cerca de su sitio activo son particularmente susceptibles a la oxidación catalizada por metales, lo que conlleva una inhibición de la función. Este tipo de modificaciones puede tener efectos leves o severos en el sistema celular, dependiendo del porcentaje y la ubicación de la modificación oxidativa.^[107] La función celular de los organismos biológicos depende de la funcionalidad de las proteínas, las cuales proporcionan múltiples niveles de estructura, permiten el movimiento intra y extracelular, llevan a cabo reacciones enzimáticas y realizan la señalización celular para gestionar las vías biológicas. Las modificaciones descritas, por lo tanto, pueden tener varias implicaciones para los sistemas biológicos y en la patología de diversas enfermedades.

3. Accidente Cerebrovascular Isquémico

3.1. Isquemia Cerebral Aguda

Se ha observado que existe una relación entre el estrés nitrooxidativo y la isquemia cerebral aguda (ICA).^[108] La ICA se define como una disminución del flujo sanguíneo a los tejidos cerebrales, lo cual impide el adecuado aporte de oxígeno, glucosa y otros nutrientes, llevando a cambios metabólicos y, si no se reestablece en un corto período de tiempo, muerte celular, debido al desarrollo de una serie de eventos fisiopatológicos denominados en su conjunto “cascada isquémica”, dentro de los que se encuentra en estrés nitrooxidativo.^[109]

Cabe comentar que el tejido cerebral es altamente susceptible al daño metabólico e isquémico, y al estrés oxidativo. Representa el 2% del peso corporal, pero consume el 20% del O₂ corporal (156μmol/100g/min). Tiene una alta y específica actividad metabólica y un alto consumo de O₂. El mecanismo para obtención de ATP es casi exclusivamente la fosforilación oxidativa (FO). Es un tejido que no tiene reservas de energía y tiene menor cantidad de antioxidantes en comparación a otros tejidos. Además, contiene altas concentraciones de lípidos fácilmente peroxidables (ácidos grasos poliinsaturados) y muchas regiones del cerebro tienen un alto contenido de hierro.^[110]

Durante un accidente cerebrovascular isquémico (ACVi), el cual representa el 85% de los accidentes cerebrovasculares (ACV), ocurre una situación de ICA. El ACVi se define como el rápido desarrollo de signos clínicos de una disfunción neurológica, debido a infarto. Según las Estadísticas Sanitarias Mundiales del 2019 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el ACV es la segunda causa de muerte y la primera de discapacidad a nivel mundial. Globalmente, 3.3 millones de personas murieron por ACVi en 2019, con una incidencia anual es de 7.6 millones y una prevalencia de 77.2 millones.^[111] Es una de las principales causas de morbilidad a nivel global, con consecuencias invalidantes en los sobrevivientes, y una alta incidencia de eventos secundarios, representando un problema de salud pública con elevado costo sanitario. Un estudio retrospectivo del Instituto de Neurología del Uruguay, basado en el análisis de los certificados de defunción, en el período comprendido entre 1997 y 2006, mostró tasas de mortalidad entre 96.5 y 114 muertes por ACV cada 100.000 habitantes por año.^[112]

El mecanismo de un ACVi implica la disminución o el bloqueo del suministro de sangre al cerebro debido a un trombo o engrosamiento del endotelio luminal, originado por

hipercoagulabilidad, hipofibrinólisis o un estado inflamatorio, llevando a un estado de ICA. La patogenia de la ICA es extremadamente compleja e involucra múltiples mecanismos, entre los cuales se encuentra la generación de radicales libres, los cuales contribuyen al daño neuronal estructural y funcional, a través de su interacción nociva con un gran número de moléculas proteicas, lipídicas y nucleares, y de la iniciación de vías de señalización intracelulares.^[113]

Es bien sabido que el tejido cerebral es muy vulnerable a la isquemia, es incapaz de almacenar energía y requiere un aporte constante de oxígeno y glucosa en concentraciones adecuadas para mantener su integridad funcional y estructural. Una oclusión vascular que cause un déficit de estas sustancias va a desencadenar mecanismos patológicos que tienen como resultado la muerte celular e injuria cerebral.^[114] Ocurre un desequilibrio iónico y una liberación excesiva de glutamato hacia el espacio extracelular, seguido de un incremento dramático en la concentración de calcio iónico intracelular, el cual activa vías intracelulares como el estrés nitroxidativo.^[115] La Figura 1.8 muestra el desarrollo de la cascada isquémica.

La cascada isquémica puede subdividirse en tres fases de formación de ROS y RNS: 1) despolarización mitocondrial, 2) isquemia química y 3) reperfusión. La primera ocurre por privación de oxígeno y glucosa que inhibe al complejo IV, acumulándose intermediarios de la cadena respiratoria habiendo fuga de electrones y déficit de ATP. Durante la despolarización mitocondrial se agota el ATP intraneuronal debido a la falta de sustratos para su producción (O_2 y glucosa) y hay una reducción de la actividad de las bombas de iones dependientes de ATP (Na^+/K^+ -ATPasa) que despolariza la membrana. La afectación de los gradientes iónicos transmembrana causa un influjo de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes. Luego aumenta la actividad neuronal con eflujo de aminoácidos excitatorios como glutamato. La liberación excesiva de glutamato también es mediada por la estimulación de terminales presinápticas por Ca^{2+} y por la alteración del sistema de eliminación e inactivación de glutamato, que es dependiente de ATP y voltaje. El glutamato activa los receptores ionotrópicos de tipo NMDA y no-NMDA (N-metil-D-ácido aspártico), aumentando aún más la concentración citoplasmática de Ca^{2+} . El resultado final es la acumulación intracelular de Ca^{2+} induciendo la activación de enzimas como proteasas, lipasas, nucleasas, proteinquinasas, XO y NOS.

La segunda etapa, de isquemia química, ocurre 25-35 minutos después, por activación de XO debido a la privación de ATP que produce sustratos de ésta, y de proteasas, fosfolipasa A2 (PLA2), nucleasas, proteinquinasas, COX y NOS. Las enzimas Ca^{2+} dependientes son

activadas y se modula su síntesis, y producen ROS y RNS (PLA2, COX-2, XO, iNOS, nNOS). La alteración funcional de la cadena de transporte de electrones aumenta la producción de $O_2^{\cdot-}$, el cual dismuta a H_2O_2 , precursor del $OH^{\cdot}$. Se producen altas concentraciones de NO por la nNOS y iNOS, que reacciona con $O_2^{\cdot-}$ produciendo $ONOO^-$ que al ser protonado forma el altamente reactivo $ONOOH$, que reacciona con moléculas biológicas importantes o es convertido a $OH^{\cdot}$, como se expuso anteriormente.

La tercera es la rápida reoxigenación que genera daño ischemia/reperfusión (I/R), donde continúa la acción de enzimas, ocurre liberación de Fe y acumulación de células inflamatorias. El $NO^{\cdot}$ producido por enzimas también exacerba el daño isquémico inhibiendo la cadena respiratoria y liberando hierro de la ferritina. El hierro también es liberado de proteínas como resultado de la disminución del pH y producto de la reducción de Fe^{3+} inducida por $O_2^{\cdot-}$, potencia la producción de $OH^{\cdot}$ mediante la reacción de Fenton. Por último, la acumulación de células sanguíneas inflamatorias (neutrófilos y monocitos) contribuyen a mantener el distrés nitrooxidativo.



Figura 1.8. Detalle de eventos que ocurren durante la cascada isquémica. Fases de la cascada isquémica: despolarización mitocondrial (naranja), isquemia química (gris), reperfusión (amarillo). ↓ y ↑: disminución y aumento. FO: fosforilación oxidativa. ATP: adenosín trifosfato. ROS: especies reactivas de oxígeno. RNS: especies reactivas de nitrógeno. BHE: barrera hematoencefálica.

Es particularmente interesante el fenómeno de daño por I/R que ocurre cuando el suministro de sangre al tejido ha estado privado de O₂ se restablece. Aunque la reperusión es esencial para la recuperación del tejido, puede paradójicamente causar daño adicional. Los mecanismos del daño por I/R incluyen el estrés oxidativo, que, al restaurar el flujo sanguíneo, ocurre una rápida generación de ROS y RNS dada por productos tóxicos acumulados en las células durante la isquemia; la inflamación, ya que en la reperusión se activa la respuesta inflamatoria, que involucra la infiltración de leucocitos en el tejido, liberación de citoquinas proinflamatorias y activación del complemento, lo que contribuye al daño tisular; la disfunción mitocondrial que puede conducir a la apoptosis o necrosis celular; la disfunción del endotelio aumentando la permeabilidad vascular y edema; así como la activación de la coagulación.

En suma, los mecanismos fundamentales que llevan a daño isquémico y muerte celular por ROS y RNS son: estrés nitrooxidativo, excitotoxicidad y desbalance iónico, y apoptosis. La superposición de estos mecanismos lleva a la peroxidación lipídica, desnaturalización de proteínas, ruptura de cadenas polinucleotídicas, modificación de bases, pérdida de la integridad de la membrana, falla de los organelos y muerte celular por necrosis o apoptosis.^[116] La pérdida de integridad celular se da por aumento de la permeabilidad de membrana celular, alteración del transporte iónico y de las funciones de barrera, disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE), alteración del tono vascular y flujo sanguíneo, aumento de la agregabilidad plaquetaria, inflamación, apoptosis, necrosis y autofagia. Existe evidencia de que el estrés nitrooxidativo inducido por la excitotoxicidad es el principal evento causante del daño cerebral.^[117,118]

Específicamente, la generación de radicales libres en la ICA, según varios estudios, viene dada por los siguientes mecanismos: estimulación de los receptores NMDA por el glutamato, disfunción mitocondrial, activación de nNOS, inducción de NOS y COX, autooxidación de catecolaminas, metabolismo de ácidos grasos, liberación de ácido araquidónico, migración de neutrófilos y leucocitos capaces de generar aniones O₂⁻, conversión de xantina deshidrogenasa a XO y acidosis intracelular.^[119,120,121]

3.2. Fuentes de Especies Reactivas en Isquemia Cerebral Aguda

La mitocondria es una fuente importante de radicales libres pues allí ocurre el proceso de generación intracelular de energía (ATP), el cual involucra la reducción de O_2 a H_2O . Durante este proceso de transferencia de electrones puede haber fuga de éstos, generando varias moléculas radicalarias intermediarias como el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 (Figura 1.9). La reacción entre estas dos especies en presencia de metales (hierro intracelular), lleva a la formación de otro radical, el $OH^{\cdot}$, uno de los más potentes que existen.

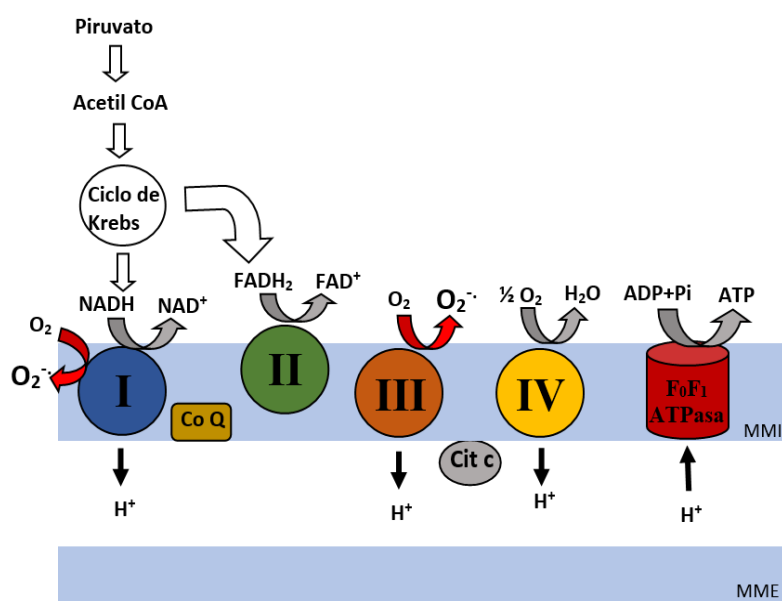


Figura 1.9. Cadena de transporte electrónico mitocondrial. Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Esta consiste en una serie de complejos enzimáticos (I-IV) y transportadores móviles (coenzima Q [Co Q] y citocromo c [Cit c]) ubicados en la membrana interna de la mitocondria. Estos complejos transfieren electrones desde donadores de alta energía, como NADH y FADH₂, hasta el oxígeno molecular, lo que genera un gradiente de protones utilizado por la ATP sintasa para la producción de ATP. Durante este proceso, una pequeña proporción de electrones puede escapar prematuramente, principalmente desde los complejos I y III, reduciendo el oxígeno de forma incompleta y formando superóxido ($O_2^{\cdot-}$), una especie reactiva de oxígeno. MMI: membrana mitocondrial interna, MME: membrana mitocondrial externa.

También el metabolismo del ácido araquidónico a través de las vías de la COX y lipooxigenasa es una fuente importante de $O_2^{\cdot-}$ en neuronas postisquémicas.^[122] En adición, la microglía activada y los leucocitos periféricos que infiltran generan oxidantes luego de la reperusión por el sistema nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX).^[123] En resumen, las principales fuentes de radicales libres en ICA incluyen la disrupción del metabolismo mitocondrial, la fuga de electrones durante el transporte electrónico mitocondrial, y respuestas inflamatorias al daño cerebral.

Otra fuente de agentes nitrantes y oxidantes es el estado inflamatorio, que existe previo, durante y posterior al evento cardiovascular isquémico, que recluta células del sistema inmune productoras de ROS y RNS.^[124] El fenotipo fisiopatológico vascular asociado al riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica presenta susceptibilidad a deposición de lípidos, formación de trombos, infiltración de células inmunes, inflamación y perfiles hemodinámicos aberrantes. La aterosclerosis, una de las causas subyacentes de ACVi, se define como una enfermedad inflamatoria, con un componente de distrés oxidativo como perturbador de la homeostasis vascular. La inflamación en la aterosclerosis es causada por las placas ateroscleróticas y la alteración de los fenotipos de las células vasculares.^[125] Más específicamente, las células endoteliales arteriales expresan la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), la cual se une a los leucocitos y promueve la inflamación.^[126,127] Durante la respuesta inflamatoria, los macrófagos y los neutrófilos responden a los quimioatrayentes y, posteriormente, producen $O_2^{\cdot-}$ y $NO^{\cdot}$, los cuales, como ya se expuso, forman $ONOO^{\cdot-}$. Varias otras ROS y RNS pueden producirse durante la respuesta inflamatoria, entre ellos el $HOCl^{\cdot}$, el H_2O_2 , y el radical $OH^{\cdot}$.^[128,129] El distrés nitrooxidativo podría ser además un factor causal de ICA y actualmente el objetivo principal de los esfuerzos investigativos en esa área es entender los mecanismos moleculares que subyacen a la injuria isquémica, para proponer y desarrollar enfoques preventivos, diagnósticos y terapéuticos.^[130]

Es difícil medir los compuestos oxidantes de forma directa por su corta vida media, sin embargo, es posible demostrar indirectamente su producción en condiciones patológicas como ICA, determinando los niveles de antioxidantes o de los productos de la reacción entre esos compuestos y otras moléculas como proteínas.^[131] Se ha encontrado que existe una mayor producción de especies nitrooxidantes durante el daño isquémico.^[132] Como ya se dijo, estas especies pueden reaccionar con proteínas produciendo PTMs nitrooxidativas que influyen la estructura y función de estas. Particularmente la presencia de NO_2Tyr es evidencia de modificaciones mediadas por RNS en condiciones de distrés nitrooxidativo. El Fg es una proteína plasmática abundante involucrada en la formación del trombo, y se ha observado que es altamente susceptible a tales PTMs nitrooxidativas, por lo que representa un potencial biomarcador.^[133] El daño nitrooxidativo y las modificaciones del Fg poseen potencial como biomarcadores de enfermedades, proporcionando posibilidades para el diagnóstico y una mayor comprensión de patologías. El análisis de NO_2Tyr y de Fg nitrado en residuos de Tyr (Fg- NO_2Tyr) permitiría el diseño de biomarcadores específicos para el daño nitrooxidativo en condiciones de ICA.

4. Determinación de 3-Nitrotirosina y Fibrinógeno Nitrado

La NO_2Tyr *in vivo* por dos mecanismos: la vía del $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ y la de hemoperoxidasas, llevando a la formación de radicales tirosilo y $\text{NO}_2^\bullet$, que se combinan para formar NO_2Tyr libre o en los residuos proteicos, al agregar un grupo nitro. La tasa de nitración se eleva cuando se encuentran metales de transición o ciertas metaloproteínas (como CuZnSOD).^[134] Resulta de interés su uso como biomarcador. Un biomarcador es una característica biológica que se puede medir y evaluar objetivamente como un indicador de procesos normales, patológicos o de respuesta a una intervención terapéutica. Los biomarcadores se utilizan en la medicina y la investigación clínica para diagnosticar enfermedades, evaluar la progresión de una patología, y predecir o monitorear la respuesta a un tratamiento. Por ejemplo, niveles elevados de ciertas proteínas en la sangre pueden servir como biomarcadores para identificar la presencia de enfermedades cardiovasculares o cáncer. En el caso de la NO_2Tyr y del Fg- NO_2Tyr , se ha propuesto su uso como biomarcador de estrés nitrooxidativo y enfermedades que cursan con ese fenómeno.

Se han empleado varios métodos para detectar NO_2Tyr , que combinan una tecnología de separación como Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (HPLC por sus siglas en inglés) y Cromatografía de Gases (GC por sus siglas en inglés), con sistemas de detección como absorbancia, fluorescencia, ensayos electroquímicos y Espectrometría de Masas (MS por sus siglas en inglés), cada uno de los cuales presenta desventajas debido a la compleja preparación de muestras destinada a superar las limitaciones de selectividad o sensibilidad. Se han desarrollado métodos que implican derivatizaciones de NO_2Tyr , para su detección mediante GC con un límite de detección de 0.5 ng de NO_2Tyr por inyección.^[135] La GC proporciona la mejor sensibilidad pero requiere una derivatización previa al análisis, mientras que la HPLC no lo requiere, pero también es menos precisa. Con el objetivo de aumentar la sensibilidad se han incorporado pasos previos de extracción y HPLC a los métodos de MS.^[136] Acoplar HPLC a la MS puede superar tales limitaciones, permitiendo una identificación robusta y sin ambigüedades de las modificaciones sin producir artefactos durante los pasos de derivatización de la cromatografía. Por esta razón, la MS se considera la técnica estándar de oro para identificar modificaciones en proteínas.^[137] El análisis mediante MS es, sin embargo, tanto laborioso como complejo.

Además, para aplicaciones clínicas, se han desarrollado ensayos inmunoquímicos de tipo ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas). Los ensayos inmunológicos son un

medio rápido y económico para identificar tales modificaciones. Existen muchos anticuerpos y técnicas tipo ELISA para identificar y cuantificar la NO₂Tyr. Un estudio realizado por Safinowski *et al.*^[138] comparó diferentes inmunoensayos para la NO₂Tyr. El estudio concluyó que existen inconsistencias en la confiabilidad de los resultados. Las discrepancias observadas se atribuyeron a la baja abundancia de NO₂Tyr. Existen algunas limitaciones críticas con el ELISA, incluyendo: (i) los anticuerpos pueden mostrar cierta unión no específica, y (ii) la NO₂Tyr puede no estar accesible para el anticuerpo en algunos sitios de la proteína debido a la estructura terciaria y cuaternaria.^[139] La fiabilidad de las técnicas de inmunoensayo depende en gran medida de la especificidad y la aidez de los anticuerpos utilizados; los anticuerpos comerciales disponibles actualmente son conocidos por mostrar variaciones en la aidez.

4.1. Espectroscopía Ultravioleta-Visible

Se puede cuantificar el contenido de NO₂Tyr utilizando su cambio espectral en soluciones alcalinas. El pKa del grupo fenólico de NO₂Tyr es 7.5, considerablemente menor al de la Tyr (aprox. 10). Ambos compuestos tienen un pico de absorbancia a 280 nm a pH 3.5. Sin embargo, NO₂Tyr presenta un pico adicional a 365 nm en soluciones ácidas (pH aprox. 5) o a 430 nm en condiciones básicas (pH aprox. 9.5) (Figura 1.10). Así, puede calcularse la concentración de NO₂Tyr con el incremento de la absorbancia a 430 nm. Cabe aclarar que este método es de baja sensibilidad y sería deseable utilizar muestras relativamente puras.^[140]

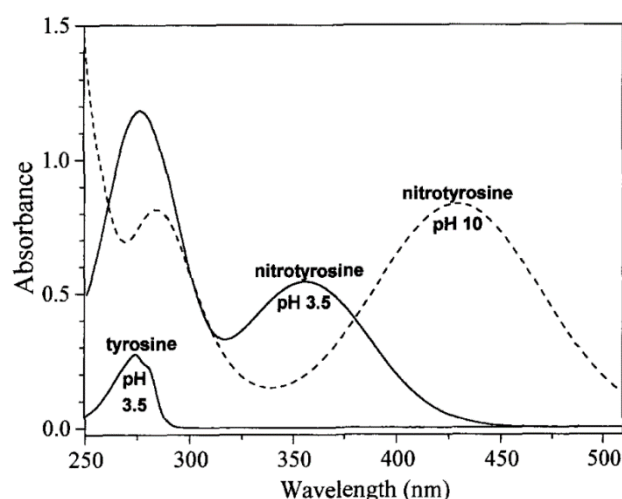


Figura 1.10. Espectros UV-visible de tirosina y 3-nitrotirosina. Espectros ultravioleta-visible de tirosina y 3-nitrotirosina en 50 mM de formiato de amonio, pH 3.5 (líneas continuas); y 3-nitrotirosina en 50 mM de borato de sodio, pH 10 (línea discontinua). Compuestos a una concentración de 0.2 mM. Imagen extraída de "Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: In vivo marker of peroxynitrite" de Crow e Ischiropoulos.^[140]

4.2. Cromatografía Líquida de Alto Desempeño

Esta técnica permite la separación de NO₂Tyr de los otros componentes de la muestra. La HPLC requiere una preparación previa que involucra la hidrólisis ácida de las proteínas para generar aminoácidos, aunque también se ha usado la hidrólisis enzimática. Es un método complejo pues es posible la creación o destrucción de NO₂Tyr en el proceso de hidrólisis, además de que se debe verificar que ésta haya sido completa. Aunque los límites de detección son buenos, no es lo suficientemente sensible para el análisis de pequeñas cantidades de proteína (menos de 100 µg). Los detectores que se utilizan pueden ser ultravioleta, de fluorescencia (luego de llevar a cabo una modificación estructural sobre NO₂Tyr generando un compuesto fluorescente) o electroquímico.^[141]

4.3. Espectrometría de Masas

Los métodos proteómicos para el estudio de las proteínas nitradas se encuentran en continuo desarrollo y son desafiantes técnicamente. Han revelado aspectos claves en cuanto a la nitración de proteínas tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque es complejo lograr objetivos como la identificación, mapeo y cuantificación de proteínas nitradas.

Una buena metodología para la caracterización y cuantificación de proteínas tirosin-nitradas *in vivo* es el uso combinado de electroforesis en 2 dimensiones con detección inmunoquímica de NO₂Tyr, seguido de la identificación de proteínas mediante MS regular, sumado el inmunoenriquecimiento de péptidos tirosin-nitrados y la identificación de esos péptidos con un experimento de MS tándem. Cabe comentar que esta metodología es costosa.

Los enfoques proteómicos para estudiar la nitración de proteínas, solos o en combinación con técnicas inmunoquímicas o bioanalíticas, son herramientas muy útiles para identificar biomarcadores asociados a patología oxidativa, identificar las especies nitrantes *in vivo*, arrojar luz sobre los efectos estructurales y funcionales de la nitración de residuos específicos, y obtener proteínas nitradas puras para su uso en estudios posteriores. Es muy importante que la investigación de proteínas nitradas, y el consecuente desarrollo metodológico en proteómica, permite la identificación de proteínas y péptidos nitrados específicos, como biomarcadores y predictores de enfermedades, como participantes en la señalización celular y como moléculas involucradas en enfermedades degenerativas, autoinmunes e inflamatorias.

4.4. Ensayos de Inmunoabsorción Ligados a Enzimas

Los estudios inmunoquímicos se llevan a cabo utilizando anticuerpos comerciales policlonales y monoclonales anti-NO₂Tyr. Estos anticuerpos son generados mediante la inmunización de conejos con BSA o hemocianina extraída de molusco (keyhole limpet hemocyanin, KLH), tratadas con ONOO⁻. Los anticuerpos obtenidos son purificados por afinidad. Las técnicas de ELISA han sido ampliamente utilizadas para la investigación, bioanálisis y diagnóstico clínico.^[142] Para establecer una técnica de este tipo que sea efectiva para determinado biomarcador, es clave poder seleccionar el par de anticuerpos primario y secundario que reconozcan específicamente dicho biomarcador con alta afinidad y sin reacciones cruzadas.

Khan et al. desarrollaron un ensayo ELISA competitivo para la determinación de proteínas nitradas en fluidos biológicos. Para la cuantificación de la nitración se construyen curvas de calibración determinando la unión del anticuerpo al antígeno inmovilizado en diluciones seriadas de BSA nitrada (BSA-NO₂Tyr). Este método es semicuantitativo pues la afinidad del anticuerpo por la NO₂Tyr del analito puede no ser la misma que por el BSA-NO₂Tyr.^[143]

4.5. Estado del Arte

La identificación de proteínas específicas nitradas tiene como objetivo echar luz sobre los mecanismos moleculares de diversas patologías. La identificación y cuantificación de los residuos de Tyr que sufren nitración en el Fg, *in vivo* e *in vitro*, es una tarea que aún no se ha logrado completa ni conclusivamente. La Figura 1.11 muestra la reacción de oxidación de Tyr que al perder un electrón genera el radical tirosil, el cual luego de reaccionar con NO₂[•] evoluciona a NO₂Tyr. Además, esa modificación química funcional produce una disminución del pKa del grupo hidroxilo fenólico en 3 unidades.^[134]

Las PTMs del Fg han sido implicadas en la patología de varias enfermedades, a menudo involucrando la formación deficiente de coágulos y sus efectos subsecuentes.^[144] Niveles elevados de Fg y nitración de Tyr del Fg han sido implicados en varias enfermedades tromboticas arteriales y venosas. El Fg nitrado ha sido específicamente identificado en enfermedades como el ARD,^[145] cáncer de pulmón,^[146] enfermedad renal en etapa terminal,^[147] enfermedad de las arterias coronarias,^[148] y en pacientes con tromboembolismo venoso.^[149]

Más específicamente, se han detectado modificaciones de NO₂Tyr en la cadena β del Fg mediante Western Blotting (WB), en el plasma de muestras tomadas de pacientes con ARD.

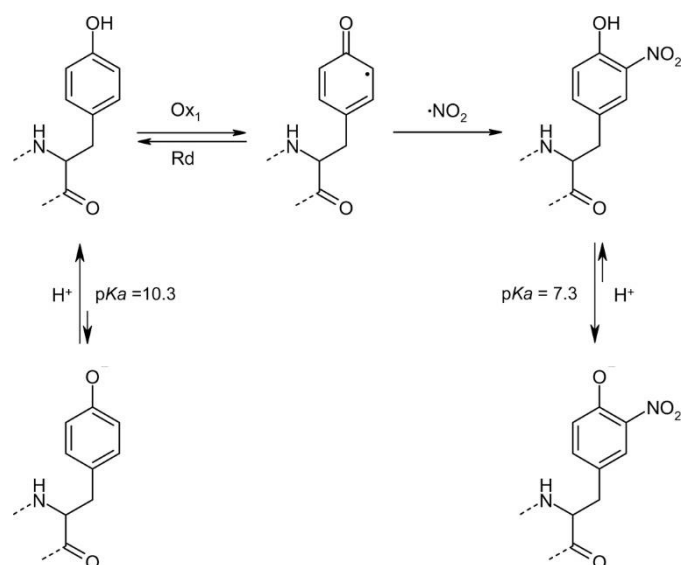


Figura 1.11. Tirosina, radical tirosilo y 3-nitrotirosina. La oxidación de un electrón de la tirosina produce Tyr• que, al reaccionar con $\cdot\text{NO}_2$, evoluciona a 3-nitrotirosina. Tyr• puede ser reducido de nuevo a tirosina por reductores (Rd) en competencia con la reacción de nitración. Imagen extraída de “Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Functional Effects” de Rafael Radi.^[134]

Parastatidis *et al*^[150] analizaron muestras de fumadores mediante MS, con el objetivo de identificar los residuos de NO₂Tyr, encontrando que los residuos 322 y 452 de los extremos C-terminales de las cadenas β son los principales sitios de nitración *in vivo*.

Un estudio realizado por Shacter *et al*.^[151] mostró que el Fg es la proteína plasmática más susceptible a la oxidación. El estudio mostró que la albúmina, siendo la proteína plasmática más abundante, tenía los mayores niveles absolutos de oxidación. Sin embargo, en cuanto a la proporción de oxidación a proteína, el Fg mostró 20 veces más oxidación que la albúmina. El estudio concluyó que el Fg es la proteína plasmática más susceptible a la oxidación. Por otro lado, se ha demostrado que los niveles de NO₂Tyr son mayores en pacientes con enfermedad arterial coronaria en comparación con controles sanos, 9.1 $\mu\text{mol/mol}$ de Tyr y 5.2 $\mu\text{mol/mol}$ de Tyr, respectivamente.^[152]

Ill-Raga *et al*^[153] estudiaron la presencia de Fg-NO₂Tyr inmunoquímicamente, en coágulos formados bajo condiciones nitrooxidativas *in vitro* y en cortes de cerebro de pacientes que habían fallecido a causa de un ACVi; y estudiaron el Fg purificado de plasma de ratas sometidas a isquemia cerebral focalizada y humanos que sufrieron ACVi, cuantificando la nitración de éste espectrofotométricamente. Encontraron Fg-NO₂Tyr en los coágulos formados bajo condiciones nitrooxidativas y en los cortes de parénquima cerebral. También encontraron un incremento en la cantidad de Fg-NO₂Tyr plasmático en las muestras de plasma de los modelos

de isquemia cerebral en ratas, con un pico a las 3 horas, y en los pacientes ACVi en comparación con controles sanos. Otro factor que se estudió en este trabajo fue cómo la nitración del Fg afectaba su estructura y función en la hemostasis, mediante estudios de fluorescencia intrínseca, microscopía electrónica de transmisión y estudios de tromboelastometría; obteniendo como resultados que de hecho hay un cambio estructural intrínseco generando estructuras globulares diferentes a las varillares en el Fg nativo. Con respecto a la funcionalidad se observó un mayor tiempo de coagulación (indicando que hay una disminución en la acción de la trombina, enlenteciendo la formación de Fb), un mayor tiempo de formación del coágulo (indicando que se afecta la interacción del Fg con las plaquetas), y una disminución de la máxima firmeza del coágulo. Los tromboelastogramas también mostraron una disminución en la amplitud de los coágulos nitrados, lo cual está directamente relacionado con la disminución de su firmeza. Analizando la persistencia del coágulo en el tiempo se pudo cuantificar la lisis máxima midiendo la máxima firmeza del coágulo, mostrando que la nitración inhibe la fibrinólisis haciendo los coágulos más estables. De hecho, existen numerosos informes de la alteración hemostática funcional, hacia un estado protrombótico, que ocurre ante la nitración del Fg.^[154]

Un estudio realizado por Vadseth *et al.*^[148] mostró de forma específica la formación de NO₂Tyr en el Fg y alteraciones funcionales en las propiedades físicas del Fg/Fb que podrían llevar a un estado pro-trombótico. Los datos indican que la nitración de Tyr altera selectivamente la función y las propiedades físicas del Fg, promoviendo la aceleración de la coagulación, lo cual puede explicar la asociación entre la nitración del Fg y la enfermedad arterial coronaria.

Meredith *et al.*^[155] mapearon las modificaciones NO₂Tyr generadas *in vitro* sobre el Fg, mediante MS, encontrando que los residuos más susceptibles son las Tyr²⁷⁷ y Tyr⁵⁸⁹ de la cadena α , las Tyr⁷¹ y Tyr⁴⁷⁵ de la cadena β , y la Tyr¹³⁵ de la cadena γ , aunque también identificaron otros residuos NO₂Tyr.

Luo *et al.*^[156] estudiaron las nitraciones del Fg mediadas por ONOO⁻, simulando las condiciones *in vivo*, mediante electroforesis en gel y vieron que las cadenas γ son las más susceptibles, luego analizaron en profundidad esas cadenas utilizando un enfoque de Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas tándem (LC-MS/MS) obteniendo como resultados que los principales sitios de injuria son los residuos de Tyr¹²², Tyr²⁸⁸, Tyr³⁰⁰, Tyr³⁷⁴ y Tyr³⁸⁹.

Tang *et al.*^[157] desarrollaron una técnica inmunoquímica (ELISA tipo sándwich) para detectar Fg nitrado *in vitro* agregado a fluidos biológicos (plasma y suero humano). Además, estudiaron los digestos trópticos de Fg nitrado mediante LC-MS/MS y encontraron 26 residuos de Tyr nitrados *in vitro*.

Se ha podido determinar la estructura cristalográfica del Fg^[158] (código Protein Data Bank [PDB] 3GHG). Sin embargo, no ha sido resuelta en su totalidad, pues faltan secuencias muy relevantes como las que quedan expuestas cuando el FpA y FpB son clivados por trombina, y que tienen un rol fundamental en la polimerización de la Fb, así como una gran porción de aprox. 400 aminoácidos en el extremo C terminal de las cadenas α , que representan las regiones α C y están involucradas en el proceso de formación de la red de Fb y en la interacción con otras proteínas como se comentó anteriormente.

De la revisión realizada podemos concluir que el Fg nitrado participa en el proceso de isquemia cerebral, aumentando su concentración y afectando la cinética, arquitectura, viscosidad y lisis del coágulo que forma, lo cual es consistente con un riesgo aumentado de complicaciones tromboticas. Los estudios funcionales realizados arrojan datos concordantes con respecto a la disminución en la fibrinólisis, y hay trabajos que indican que tanto la velocidad inicial de formación de Fb como la firmeza del coágulo es mayor. También se ha desarrollado un método inmunoquímico que permite la detección de Fg nitrado artificialmente adicionado a plasmas comerciales, sin embargo, actualmente no existe una técnica tipo ELISA para la determinación de Fg nitrado en plasma humano, de uso en la práctica clínica enfocado a ACVi. Además, existen diferentes informes sobre los sitios de nitración *in vitro* del Fg, no habiendo descripciones de los residuos nitrados en el Fg de plasma de pacientes que sufrieron ACVi. Si bien la nitración del Fg se conoce que afecta el mecanismo global de la formación del coágulo y su posterior lisis, no se conocen los mecanismos moleculares que explican tales alteraciones. Finalmente, la estructura del Fg no está completa, faltando secuencias fundamentales para la función.

En el presente trabajo se busca determinar la presencia de Fg-NO₂Tyr en pacientes que sufrieron ACVi, con dos métodos validados para plasma humano, de potencial aplicación en estudios biomédicos y la práctica clínica. Se muestra el desarrollo de estos métodos y se analiza su utilidad como herramientas de diagnóstico temprano, pronóstico y/o seguimiento del tratamiento de esta enfermedad. Estos métodos están basados en LC-MS/MS y ELISA. Por otro lado, se pone a punto y se realiza un estudio funcional del coágulo de Fb formado a partir

de plasma de pacientes ACVi. Siguiendo con el foco en las redes de Fb formadas, y su entorno, se realiza un estudio de trombos extraídos por trombectomía mecánica, para caracterizar su composición en cuanto a proteínas nitradas. Finalmente, se profundiza en el conocimiento de la estructura del Fg, y de los cambios que sufre cuando ocurren PTMs nitroxidativas *in vivo* en condiciones de ICA. Para esto se realiza un modelo *in silico*, completando la estructura reportada, y se ensaya un modelo conteniendo residuos de NO₂Tyr, que intenta justificar las alteraciones funcionales informadas.

El distrés nitroxidativo es un factor de riesgo para la aterosclerosis a través de mecanismos como disfunción endotelial, inflamación y oxidación de LDL, y la aterosclerosis es la principal causa de las ECV, como el ACVi. El mecanismo de un ACVi se basa en la obstrucción del flujo sanguíneo por un trombo o émbolo, cuyo componente principal es el Fg. Esto conduce al proceso patológico de la ICA, la cual a su vez perpetúa el estado de distrés nitroxidativo, generando más ROS y RNS, lo que provoca daño tisular y molecular. La hipótesis de este trabajo es que existe nitración del Fg en un ACVi, que ocurre antes, durante y después del evento agudo, afectando el proceso de fibrinoformación y fibrinolisis, siendo un factor desencadenante y perpetuador de la isquemia al formar un trombo que ocluye la luz vascular.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Desarrollar herramientas de diagnóstico para detectar marcadores nitroxidativos de patología isquémica cerebral. Profundizar en el entendimiento de la nitración de Tyr, una PTM no enzimática nitroxidativa que ocurre sobre el Fg, y su relación con esta patología.

5.2. Objetivos específicos

1. Desarrollo de métodos de LC-MS/MS y ELISA para la determinación de Fg nitrado en residuos de Tyr, en muestras de plasma humano.
2. Identificación, cuantificación y caracterización de Fg nitrado en residuos de Tyr, por condiciones nitroxidativas *in vitro* y de isquemia cerebral aguda *in vivo*, mediante los métodos desarrollados.
3. Puesta a punto de método para el estudio funcional de fibrinoformación y fibrinolisis, y su aplicación a plasma de pacientes que sufrieron ACVi y controles.

4. Estudio de proteínas nitradas en trombos de pacientes que sufrieron ACVi mediante IP y LC-MS/MS.
5. Modelado molecular de la molécula completa de Fg, y realización de simulaciones de dinámica molecular (MD) que evalúen el efecto de la presencia de NO₂Tyr.

Capítulo 2: Metodología

1. Datos Clínicos y Aspectos Éticos

Se realizó un estudio observacional, analítico, longitudinal retrospectivo de casos y controles en pacientes consecutivos que consultaron en el Departamento de Emergencia del Hospital Maciel, con diagnóstico clínico-imagenológico de ACVi, que cumplieran con los criterios de la OMS. Los pacientes fueron evaluados por integrantes del equipo de medicina interna, quienes aplicaron un protocolo preestablecido de recolección de sangre y datos con variables afines a la investigación, que incluía datos filiatorios, de la anamnesis, del examen físico, de los antecedentes personales de factores de riesgo cardiovascular (FRC) y del tratamiento. Para la clasificación etiológica se empleó el criterio Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST),^[159] y el estado neurológico fue evaluado al ingreso mediante la Escala de Accidente Cerebrovascular de los Institutos Nacionales de Salud (NIHSS).

El criterio de inclusión fue la presencia de un ACVi de menos de 36 horas de evolución y haber firmado el paciente o un familiar a cargo el consentimiento informado de participación en el estudio. La confirmación del diagnóstico clínico, su naturaleza, topografía y la extensión de la lesión se determinó mediante una tomografía axial computada de cráneo sin contraste. Cuando fue necesario se agregó resonancia magnética nuclear (NMR) de cráneo, valoración cardíaca mediante electrocardiograma, ecocardiograma transesofágico y eco Doppler de vasos del cuello.

Los datos clínicos de los pacientes, que incluyen información demográfica, historial médico, gravedad del ACVi (escala NIHSS), tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la extracción de sangre o la trombectomía, y detalles del procedimiento, se recopilaron a partir de los registros médicos de los pacientes.

Además, se recolectó una muestra de sangre, información demográfica e historial familiar y personal de enfermedades cardiovasculares de pacientes ambulatorios sin ACVi (grupo control).

Todos los protocolos fueron examinados y aprobados por los Comités de Ética del Hospital Maciel y la Facultad de Química de la Universidad de la República (Exp. N° 101900-000409-16), los cuales siguen los estándares éticos establecidos en el Decreto Ministerial 158/19 relativo a la investigación en seres humanos, y en la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes. Los procedimientos que involucraron animales adhieren a las guías ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)

y fueron autorizados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Facultad de Química (Exp. N° 101900–001846–19).

2. Producción de Estándares de Proteínas Nitradas

2.1. Producción de Peroxinitrito

El ONOO^- se sintetizó según lo descrito por Beckman *et al*^[94] con modificaciones.^[160] En resumen, se agregó H_2O_2 a una solución de nitrito de sodio en un matraz enfriado a 0 °C en un baño de hielo, con agitación continua, seguido por la rápida adición de ácido clorhídrico y luego hidróxido de sodio para detener la reacción. El exceso de H_2O_2 se neutralizó mediante la adición de dióxido de manganeso sólido seguido de filtración para eliminar el sólido. La concentración de ONOO^- se determinó mediante el aumento en la absorbancia a 302 nm ($\epsilon_{302\text{nm}} = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en 1.2 N de NaOH.

2.2. Tratamiento Nitrante de Proteínas

Para el desarrollo de los métodos de LC-MS/MS y ELISAs se produjeron estándares de Fg y BSA nitrados.

Se utilizó Fg aislado con polietilenglicol (PEG)^[161] a partir del plasma de donantes sanos como fuente de Fg para los tratamientos *in vitro* con ONOO^- . Este Fg fue nitrado *in vitro* utilizando ONOO^- sintetizado en el laboratorio, a diferentes equivalentes molares.

Se nitró Fg (4 mg/mL) con el ONOO^- sintetizado, en un medio 100 mM de fosfato de potasio, 25 mM de bicarbonato de sodio, 100 μM de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), pH 7.4. Se añadió un pequeño volumen de la solución de ONOO^- a un tubo conteniendo la solución de Fg, seguido inmediatamente por una agitación vigorosa. Dado que se utilizó buffer conteniendo bicarbonato, es probable que se haya formado el anión ONOOCO_2^- , potenciando la nitración de Tyr.

Para obtener Fg con diferentes grados de nitración, se utilizaron tres relaciones molares diferentes de ONOO^- a Fg: 200 (Fg- $\text{NO}_2\text{Tyr1}$), 100 (Fg- $\text{NO}_2\text{Tyr2}$) y 10 (Fg- $\text{NO}_2\text{Tyr3}$) moles de ONOO^- por mol de Fg. La concentración de NO_2Tyr en cada caso se determinó midiendo la absorbancia de una solución alcalina del Fg nitrado ($\text{pH} \geq 9$) a 420 nm ($\epsilon_{420\text{nm}} = 4300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), y la concentración de Fg se determinó midiendo la absorbancia de una solución neutra ($\text{pH} = 7$) a 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}} = 5.14 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Finalmente, el contenido de NO_2Tyr en el Fg nitrado se estimó como la razón molar de NO_2Tyr a Fg. Las preparaciones de Fg

nitrado se dializaron contra 0.02 M de citrato de sodio, 0.15 M de NaCl, pH 7.4, con 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 0.2 g/L de azida de sodio, y se almacenaron a -80 °C como soluciones stock de 1 mg/mL.

También se le realizó un tratamiento nitrante, siguiendo el mismo método de nitración, a BSA comercial (A7030, Sigma-Aldrich) para obtener BSA-NO₂Tyr (3 moles de NO₂Tyr/mol de BSA). Adicionalmente, un pool de plasma citratado de donantes sanos fue nitrado utilizando el mismo protocolo, con una relación molar de ONOO-/proteína total de 5, obteniendo plasma nitrado *ex vivo*.

3. Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas tándem

3.1. Desarrollo de método de LC-MS/MS para localización de sitios de nitración y cuantificación relativa

3.1.1. Digestión en Solución

Para el desarrollo de un método de LC-MS/MS para la identificación de sitios de nitración en Fg, los estándares de Fg-NO₂Tyr producidos, así como un control de Fg no tratado (una preparación comercial de Sigma-Aldrich) fueron digeridos en solución con tripsina en presencia del surfactante RapiGest SF (Waters, Reino Unido), siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. En resumen, 100 µL de RapiGest SF al 0.1% se añadieron a 20 µL de solución de Fg (aproximadamente 100 µg) y se mezclaron vigorosamente. Se agregó ditiotreitól (DTT) a cada muestra para obtener una concentración final de 5 mM y se incubó a 60 °C durante 30 minutos. Los residuos de Cys libre fueron alquilados mediante la adición de iodoacetamida a una concentración final de 15 mM, incubándolos a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos. Finalmente, se agregó tripsina de grado MS (2.25 µg; Promega, Southampton, Reino Unido) y las muestras se incubaron a 37 °C durante la noche.

Para preparar las muestras para LC-MS/MS, se añadió ácido trifluoroacético (TFA) 99% para obtener una concentración final del 1% y se permitió reaccionar durante 30 minutos a 37 °C. Las muestras tratadas con ácido fueron luego centrifugadas a 10000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y los sobrenadantes clarificados se transfirieron a un tubo de microcentrífuga limpio y se secaron al vacío. Los pellets se reconstituyeron en 30 µL de eluyente A (ver abajo) y se transfirieron a viales de vidrio con tapa de rosca para autosampler (Chromacol, Speck y Burke Analytical, UK).

3.1.2. *Análisis Espectrométrico de Masas – Método no dirigido: IDA*

En primera instancia la MS se realizó en el modo de Adquisición Dependiente de Información (IDA, por sus siglas en inglés), y se llevó a cabo la evaluación de los espectros. En el modo IDA, el instrumento selecciona y aísla automáticamente iones específicos para su posterior análisis. Este enfoque permite obtener información detallada sobre los componentes presentes en la muestra. Después de la adquisición de los espectros, se procedió a la evaluación de los mismos para analizar la información contenida en los datos obtenidos. Este proceso incluye la identificación de péptidos, la determinación de PTMs, y la cuantificación de las especies presentes, entre otros análisis relevantes. Las muestras fueron analizadas en un sistema de MS TripleTOF® 5600 (QTOF, SCIEX, UK) acoplado a un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, UK). Se utilizaron dos fases móviles: solvente A (98% H₂O, 2% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico) y solvente B (98% acetonitrilo, 2% H₂O, 0.1% ácido fórmico). La solución de péptidos se cargó en una pre-columna C18 (C18 PepMap™, 5 µm, 0.5 × 5 mm, Thermo Scientific, UK) utilizando solvente A a 20 µL/min antes de la separación en una columna nano-HPLC (C18 PepMap™, 5 µm, 0.075 × 150 mm, Thermo Scientific, UK). La velocidad de flujo durante la separación fue de 0.3 µL/min, con una elución gradiente desde 2% hasta 45% de solvente B durante 45 minutos, seguido de un aumento a 90% de solvente B en 1 minuto. La gradiente se mantuvo en 90% de solvente B durante 5 minutos y luego se reequilibró al solvente inicial durante 5 minutos. El tiempo total por corrida cromatográfica fue aproximadamente 1 hora. Los péptidos eluidos de la columna fueron ionizados con un voltaje de spray de 2.4 kV, una temperatura de fuente de 150 °C, un potencial de de-clustering de 50 V y gas cortina de 15. Se recopilaron escaneos en modo de ion positivo en un rango de 350–1250 Da durante 250 ms utilizando el modo de alta resolución TOF-MS. Se utilizó IDA para recopilar datos de MS/MS con los siguientes criterios: los 15 iones más intensos con estados de carga de 2+ a 5+ y una intensidad mínima de 500 ocurrencias por segundo utilizando exclusión dinámica durante 30 s, una adquisición de 100 ms de duración y una energía de colisión fija de 50 ± 15 V. Las áreas de pico en los cromatogramas de iones extraídos (XICs) de los péptidos principales fueron integradas por PeakView® y se calculó el porcentaje de nitración del péptido.

Se utilizó el motor de búsqueda Mascot (Matrix Science, UK, versión 2.4.0) para interrogar la sección de taxonomía Mammalia de la base de datos SwissProt (2018_08). Esta base de datos contiene la isoforma 1 de la cadena α, la cadena β, y la isoforma γ_B (incluyendo el péptido señal) de la cadena γ del Fg. Las búsquedas se realizaron en archivos raw.wiff utilizando el

motor de búsqueda Mascot con el convertidor de datos de SCIEX, con modificaciones variables de nitración de Tyr y Trp (+45 Da), aminación de Tyr (+15 Da), oxidación de Met, Tyr y Trp (+16 Da), trioxidación de Cys (+48), formación de quinurenina a partir de Trp (+4 Da), deamidación de Asn y Gln (+1 Da), y carbamidometilación de Cys (+57 Da). Esta última se buscó como una modificación variable porque los tratamientos nitrooxidativos pueden causar modificaciones irreversibles de la Cys que impiden la reacción con iodoacetamida. La proteasa seleccionada fue tripsina, con un máximo de 2 pérdidas de cortes permitidas. Los péptidos identificados por Mascot fueron validados mediante la secuenciación *de novo* de los datos de MS/MS utilizando el software de análisis PeakView®, versión 2.2. Este enfoque de secuenciación *de novo* implica la determinación directa de la secuencia de aminoácidos del péptido a partir de los datos de fragmentación generados durante la MS/MS. La validación mediante secuenciación *de novo* proporciona una confirmación adicional de la identificación de péptidos y contribuye a la precisión de los resultados obtenidos a través de la búsqueda en bases de datos.

3.1.3. *Análisis Espectrométrico de Masas – Método dirigido: MRM y SRM*

Luego, cuando se tuvieron identificados los sitios de nitración se realizó MS en modo de Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM, por sus siglas en inglés) y Monitoreo de Reacción Seleccionada (SRM, por sus siglas en inglés). Estos son enfoques específicos y altamente sensibles utilizados en análisis cuantitativos de compuestos específicos en una muestra. En MRM, se seleccionan algunas transiciones específicas de precursor a producto de fragmentación para cada ion que se desea monitorear. MRM se utiliza comúnmente en la cuantificación de compuestos específicos en mezclas complejas, la instrumentación se configura para monitorear múltiples pares precursor-producto durante el tiempo de ejecución del experimento, es particularmente útil para la cuantificación de biomoléculas, como péptidos, proteínas y metabolitos. SRM es similar a MRM y a menudo se utiliza de manera intercambiable. La principal diferencia radica en que, en SRM, la selección de la transición precursor-producto se realiza de manera más específica y selectiva, en lugar de monitorear múltiples transiciones, SRM se centra en un número limitado de transiciones específicas, es especialmente valioso en aplicaciones donde la especificidad y la sensibilidad son críticas, como en la cuantificación precisa de biomarcadores en muestras biológicas. Ambos modos (MRM y SRM) son esenciales en la MS cuantitativa, proporcionando una capacidad excepcional para la detección y cuantificación precisa de compuestos específicos en muestras

complejas. Estos métodos son ampliamente utilizados en áreas como proteómica, metabolómica y análisis de pequeñas moléculas.

Para la aplicación de estos métodos dirigidos los péptidos fueron separados y analizados utilizando un sistema de MS QTrap® 5500 (QqQLIT, SCIEX, UK) acoplado a un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, UK). Se utilizó el sistema de solventes descrito anteriormente. La solución de péptidos se cargó directamente en una columna C18 (C18 PepMap™ 100, 5 µm, 300 µm × 25 cm, Thermo Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido) a 5 µL/min y se eluyó utilizando una gradiente de 2% a 45% de solvente B durante 45 minutos. La ionización de los péptidos se logró con un voltaje de rociado configurado en 5.5 kV, una temperatura de fuente de 150 °C y un potencial de declúster de 70 V. El tiempo total de exploración fue de 0.7 s, el tiempo de retención varió entre 20 y 70 ms dependiendo de las transiciones, y las energías de colisión se calcularon para todas las transiciones y se establecieron en el segundo cuadrupolo utilizando iones de las series b o y. Las transiciones se desarrollaron en base a los péptidos modificados identificados en los análisis anteriores. Se consideraron picos cuantificables si la relación señal-ruido era ≥ 8 . El porcentaje de nitración del péptido se calculó a partir de estos datos. Estos métodos se aplicaron al análisis de muestras clínicas, realizando los experimentos por triplicado.

3.2. Cuantificación de Fg Nitrado en plasma mediante método LC-MS/MS.

El Fg de las muestras de plasma de pacientes se enriqueció mediante precipitación con glicina.^[150] Los pellets obtenidos se volvieron a disolver en un volumen mínimo de 50 mM de Tris, 140 mM de NaCl, pH 7.4 (20-50 µL) para el análisis mediante MS. Para este análisis se llevó a cabo la digestión en solución utilizando RapiGest SF explicada anteriormente. Se aplicó el método SRM desarrollado previamente para el análisis de muestras biológicas.

3.2.1. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS Statistics. Se analizaron 24 muestras de ACVi y 24 muestras controles. La distribución de probabilidad gaussiana del conjunto de datos de la población para cada cohorte clínica se evaluó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Cuando la prueba K-S rechazó la hipótesis de distribución gaussiana, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U (M-W) para comparar los datos de las muestras clínicas, que consisten en dos conjuntos de muestras independientes.

4. Ensayos de Inmunoabsorción Ligados a Enzimas

4.1. Desarrollo de ELISAs

La BSA y el anticuerpo monoclonal murino anti-NO₂Tyr biotinilado (número de clon CC.22.8C7.3) fueron obtenidos de Sigma Aldrich y Cayman Chemical (EE. UU.), respectivamente. El Fg, el ONOO⁻ y el anticuerpo policlonal de conejo anti-Fg enriquecido por afinidad de columna fueron producidos internamente en nuestro laboratorio. Una fracción de este anticuerpo se conjugó con peroxidasa de rábano (HRP, anti-Fg/HRP) para su uso como anticuerpo secundario, también internamente.

4.1.1. *Obtención de anticuerpo policlonal de conejo anti-Fg*

Para obtener suero hiperinmune anti-Fg de conejo, se inmunizaron 2 conejos con una preparación de Fg (3 dosis cada 20 días), y 10 días después del segundo recuerdo, se extrajo sangre.

Para obtener anticuerpos anti-Fg, se precipitó el suero hiperinmune de conejo con sulfato de amonio al 37% de saturación para obtener una fracción enriquecida en inmunoglobulinas. El precipitado se separó por centrifugación, se disolvió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se dializó contra PBS hasta la ausencia de sulfato en el permeado. La concentración de proteínas se determinó por absorbancia a 280 nm. Se preparó una columna de afinidad con Fg inmovilizado de manera covalente en Sepharose-BrCN (GE Lifesciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. La fracción de anticuerpos específicos para Fg se purificó mediante cromatografía de afinidad de antígeno, eluyendo la fracción retenida en la columna a pH ácido. Se dializó contra un tampón de glicina 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 8.2, y se determinó la concentración de inmunoglobulina por absorbancia a 280 nm ($\epsilon = 1.4 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Una fracción de estas inmunoglobulinas anti-Fg enriquecidas se conjugó con HRP según el método del periodato.^[162]

4.1.2. *Western Blotting*

Las muestras de Fg y los estándares de Fg-NO₂Tyr fueron desnaturalizados, reducidos y caracterizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) al 10%. Estos se tiñeron con Coomassie Blue para visualización de proteínas. Las mismas muestras se analizaron por WB utilizando anti-Fg como anticuerpo primario en un caso, y anti-NO₂Tyr como anticuerpo primario en el otro. Para esto, las bandas de proteínas de Fg y Fg-NO₂Tyr se transfirieron a nitrocelulosa, los sitios no

específicos se bloquearon con 4% de BSA en PBS-Tween 20 durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se incubaron con el anticuerpo primario a 1 µg/mL en PBS-T durante la noche a 4 °C. Después del lavado, se incubó con extravidina: fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich) cuando el anticuerpo primario era anti-NO₂Tyr biotinilado; y con inmunoglobulina/HRP anti-conejo cuando el anticuerpo primario era anti-Fg. El desarrollo del color se realizó con 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) / Tetrazolio Nitroazul (NBT) en el primer caso y con sustrato HRP (Millipore) en el segundo.

4.1.3. ELISA para determinación de Fibrinógeno

Se realizó un ELISA de captura o sándwich para la determinación de Fg. En una placa se inmovilizaron los anticuerpos de captura policlonales anti-Fg de conejo a una concentración de 2 mg/mL. Después de la incubación con la muestra, se agregó anti-Fg/HRP en una dilución de 1/4000 como anticuerpo secundario. El desarrollo del color se inició mediante la adición de H₂O₂ y el cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), permitiendo desarrollarse durante 10 minutos a temperatura ambiente y detenido mediante la adición de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4 M. La absorbancia se determinó a 450 nm. Se realizaron curvas de calibración con diluciones seriadas de Fg y Fg-NO₂Tyr.

4.1.4. ELISA para determinación de 3-nitrotirosina en Fibrinógeno

Para la detección de residuos de NO₂Tyr en Fg, se llevó a cabo un ELISA de captura utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-Fg inmovilizados en la fase sólida a 2 mg/mL en BSA 1 mg/mL, y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-NO₂Tyr biotinilado a 0.25 µg/mL como sonda de detección. Se utilizaron extravidina:HRP y H₂O₂/TMB como sustrato y cromógeno, respectivamente. La reacción se detuvo después de 10 minutos con la adición de H₂SO₄ 4 M y el desarrollo del color se determinó a 450 nm. Se realizaron curvas de calibración con diluciones seriadas de estándares de Fg-NO₂Tyr.

4.1.5. ELISA para determinación de 3-nitrotirosina total

Para la detección de NO₂Tyr total (el aminoácido libre o unido a proteínas), se llevó a cabo un ELISA de inhibición o competitivo. Las muestras se incubaron previamente con anticuerpos monoclonales de ratón anti-NO₂Tyr biotinilado a 0.5 µg/mL durante la noche a 4°C en tubos Eppendorf, con el fin de bloquear parcialmente su reacción posterior con la proteína adsorbida en el pocillo. La curva de calibración se construyó incubando diluciones seriadas de BSA-NO₂Tyr. Paralelamente, se inmovilizó BSA-NO₂Tyr a 10 µg/mL en la fase sólida en un buffer

de acetato a pH 4.6 y se incubó durante la noche a 4°C. Al día siguiente, la mezcla previamente incubada de muestra y anticuerpo se transfirió a la placa que contenía el antígeno inmovilizado y se incubó durante 1 hora a 37°C, seguido de una incubación con extravidina:HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió sustrato H₂O₂/TMB en un buffer de acetato a pH 4.6, se detuvo la reacción después de 10 minutos con la adición de H₂SO₄ 4 M y se determinó la absorbancia a 450 nm.

4.2.Determinación de nitración en plasma con método ELISA

Se utilizó el ensayo de inhibición optimizado para la cuantificación de NO₂Tyr (libre y unida a proteínas) para analizar muestras de plasma de pacientes con ACVi y controles. Se utilizó el procedimiento descrito, incubando diluciones 1/10 del plasma con anti-NO₂Tyr biotinilado durante la noche a 4°C. Se determinó la concentración total de NO₂Tyr en las muestras de plasma y se calculó su relación molar con el contenido de Fg (determinado mediante el método de Clauss). Se analizaron 21 muestras de ACVi y 21 muestras de control.

4.2.1. Estudio de Factores de Riesgo Cardiovascular

Los valores de Fg se dicotomizaron en categorías de alterado y no alterado según el valor de referencia proporcionado por el fabricante del reactivo (no alterado: <400 mg/dL). De manera similar, los valores de Proteína C Reactiva (PCR) se dicotomizaron en categorías de alterada y no alterada, con alterado definido como valores que superan los asociados con bajo riesgo cardiovascular según los criterios de la American Heart Association (1.5 mg/L). Se definió un punto de corte arbitrario de 62 años para la edad como FRC.

4.2.2. Análisis Estadístico

Se analizaron 21 muestras de ACVi y 21 muestras controles. Para evaluar la distribución de probabilidad gaussiana, se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El análisis inferencial involucró el uso de la prueba t de Student para distribuciones gaussianas y la prueba de Mann-Whitney U para distribuciones no gaussianas al comparar dos muestras independientes, con una significancia establecida en $p < 0.05$. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para comparar las proporciones de sexo entre los dos grupos. Para el análisis de varianza, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de comparaciones post-hoc utilizando la prueba de Mann-Whitney U, con una significancia establecida en $p < 0.05$. Los datos se presentan como media $\pm$ CI95% (intervalo de confianza del 95%) o mediana $\pm$ IQR50 (rango intercuartil).

5. Ensayos de Fibrinoformación y Fibrinólisis

Se realizaron estudios funcionales de fibrinoformación y fibrinólisis en pacientes con ACVi y controles. Utilizando el equipo Multiskan EX y el protocolo descrito por Larsen y Hvas^[163] se planteó realizar estudios que permitan evaluar de manera simultánea la formación y lisis del coágulo. En primer lugar, se realizaron pruebas con muestras de pacientes sanos, con el fin de poner a punto la técnica elegida. Se trata de un ensayo para evaluar la formación y lisis de la Fb. Para esto se mezcló plasma pobre en plaquetas citratado, con un activador de la coagulación (factor tisular [TF] recombinante) y con fosfolípidos y Ca^{2+} para inducir la formación de Fb (Recombiplastin 2G, HemosIL). Simultáneamente se agregó tPA para inducir la lisis (Actilyse, Boehringer Ingelheim). Se emplea un principio turbidimétrico dado que la red de Fb primero se forma y luego se lisa en la cubeta con lo que la turbidez aumenta y luego disminuye. Se registró la absorbancia continuamente durante 1.5 hrs para generar curvas de formación-lisis del coágulo que muestran la absorbancia medida en función del tiempo, las cuales fueron analizadas posteriormente.

Para cada muestra se obtuvo una curva de fibrinoformación y fibrinólisis (por duplicado), y de éstas se extrajeron los siguientes parámetros: altura de pico, tiempo de fibrinoformación o tiempo de coagulación (T_c , definido como el tiempo desde que comienza la fibrinoformación (cuando la derivada cambia de 0 a un valor positivo) hasta el tiempo del pico), tiempo de fibrinólisis (T_f , definido como el tiempo a partir del pico hasta que termina la fibrinólisis (cuando la derivada cambia de un valor negativo a 0)) y relación entre estos. Se analizaron 52 pacientes con ACVi, 22 muestras de pacientes sin factores de riesgo para desarrollar un ACVi (CSFR), (HTA, DM, dislipemia, consumo de tabaco, o antecedente de ACVi) y 37 de controles de población general con algún factor de riesgo (CCFR), en duplicados. Se comprobó la distribución gaussiana con un K-S test y luego se compararon los resultados entre grupos mediante test de hipótesis t-Student para dos muestras independientes.

6. Estudio de Nitración en Trombos mediante Inmunoprecipitación y LC-MS/MS

Se realizó una búsqueda de nitración en trombos de pacientes con ACVi tratados con trombectomía mecánica. Los trombos analizados en este estudio se obtuvieron de pacientes clínicos que experimentaron un ACVi y fueron sometidos a trombectomía mecánica como parte de su tratamiento. La decisión de realizar la trombectomía mecánica fue tomada por el neurointervencionista a cargo según criterios clínicos estándar y hallazgos de imágenes. La

trombectomía mecánica se realizó utilizando técnicas establecidas y dispositivos disponibles comercialmente. El dispositivo específico y el enfoque se determinaron según las características individuales del paciente y la ubicación del vaso obstruido. Después de una trombectomía mecánica exitosa, los trombos recuperados se recopilaron del dispositivo de trombectomía y se colocaron en un recipiente estéril. Se tomó precaución para minimizar la contaminación externa durante el proceso de recopilación. Al recogerlos, los trombos se transportaron inmediatamente al laboratorio y se mantuvieron a una temperatura controlada, manejándolos con precaución durante todo el proceso de transporte. Los trombos se recibieron congelados en solución salina. El descongelado se realizó en un baño de hielo y luego a temperatura ambiente. Se llevó a cabo una primera centrifugación de 8 minutos a 8000 rpm en un minispin (F45-12-11, 6 cm de radio) a temperatura ambiente, y el sobrenadante se separó y transfirió a otro tubo para su análisis (sobrenadante, S). El pellet se resuspendió con buffer TENS (Tris-EDTA-NaCl, pH 7.4) y se trituró a temperatura ambiente hasta la disgregación total del coágulo. Finalmente, se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente a 10000 g y el sobrenadante se transfirió a otro tubo para un análisis adicional (extracto, E). Para cada trombo, se analizaron dos muestras, el primer sobrenadante (S) y el segundo (E).

6.1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio

Las muestras de proteínas se resolvieron en una SDS-PAGE para observar bandas proteicas de interés y comparar patrones, realizar WB y el análisis de MS posterior a la inmunoprecipitación (IP). Las muestras se prepararon mezclándolas con un volumen apropiado de buffer de muestra para SDS-PAGE conteniendo un agente reductor (β -mercaptoetanol), y se calentaron a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Se preparó un gel de resolución al 10% y un gel de apilamiento al 4% utilizando una solución de gel de poliacrilamida (acrilamida, bis-acrilamida, buffer de Tris-HCl, SDS y persulfato de amonio, seguido por la adición de tetrametiletildiamina como catalizador). El gel se ensambló vertiendo la solución de gel de resolución en una caja de fundición de gel, dejando espacio en la parte superior para agregar el gel de apilamiento y se permitió que el gel polimerizara durante aproximadamente 30 minutos. Se agregó el gel de apilamiento, se insertó un peine para crear pozos de muestra, y se dejó polimerizar. Para la electroforesis la caja de gel se colocó en un tanque de electroforesis lleno de buffer de corrida (Tris-glicina), y las muestras, junto con un marcador de PM (10-250 kDa), se cargaron en los pozos. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante (90 V) hasta que el frente de tinte alcanzó la parte inferior del gel de resolución. Después de la electroforesis el gel se colocó en una solución de tinción (45% metanol, 10% ácido acético, 0.1% Coomassie

Brilliant Blue) para la visualización de proteínas, el gel se agitó suavemente durante 1 hora y luego se destiñó para eliminar el exceso de tinte (la solución de desteñido contiene los mismos componentes que la de tinción, excepto el Coomassie blue). Para la captura y análisis de imágenes el gel teñido se colocó en un sistema de documentación de gel y sistema de imagen de quimioluminiscencia (Fujifilm LAS-4000), y se capturó una imagen de este. Las intensidades de las bandas y los pesos moleculares se analizaron utilizando un software adecuado (ImageJ) y comparando las bandas con el marcador de PM.

6.2. Western Blotting

Después de la electroforesis, las proteínas del gel de SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando un sistema de transferencia en húmedo. La transferencia se llevó a cabo en un tampón de transferencia (buffer de Tris-glicina que contiene metanol) a 90 V durante 1 hora a 0°C. La membrana se bloqueó con una solución de bloqueo (5% de BSA en tampón de Tris-salino con Tween 20 [TBST]) durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se incubó con un anticuerpo primario específico para la proteína objetivo durante la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron un anticuerpo monoclonal de ratón desarrollado contra NO₂Tyr (39B6, sc32757), uno que reconoce la cadena de α de Fg (anti-Fibrinogen α , C-7, sc-398806) y uno que reconoce la cadena β de Fg (anti-Fibrinogen β , D-4, sc-271035) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). La membrana se lavó con TBST para eliminar el anticuerpo primario no unido y otros contaminantes, y se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a HRP como enzima de detección durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se lavó nuevamente con TBST para eliminar el anticuerpo secundario no unido. El anticuerpo anti-ratón ligado a HRP se dejó reaccionar durante 4 minutos antes de la detección usando quimioluminiscencia mejorada (kit ECL - 34078, Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La señal se capturó utilizando un sistema de imagen de quimioluminiscencia. Las intensidades de las bandas se cuantificaron utilizando el software de análisis por densitometría ImageJ. Se realizó una normalización comparando las bandas de proteínas objetivo con la proteína total para tener en cuenta las variaciones en la carga de proteínas. Se utilizó una relación entre la intensidad de la banda de interés y la proteína total de la muestra estimada con coloración por rojo Ponceau S.

6.3. Inmunoprecipitación

Se realizó una IP con el kit Dynabeads™ Protein G Immunoprecipitation No. 10007D (Invitrogen). En resumen, los pasos se detallan a continuación. (1) Las perlas magnéticas se resuspendieron en el frasco, se transfirieron 50 µg de perlas a un tubo, y el sobrenadante se eliminó después de magnetizar las perlas. (2) Se añadió el anticuerpo (anti-NO₂Tyr) (10 µg) diluido en 200 µL de Buffer de Unión y Lavado de Anticuerpos, se incubó con rotación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se colocó el tubo en el imán y se eliminó el sobrenadante, y el complejo magnético anticuerpo-perla se resuspendió en 200 µL de Buffer de Unión y Lavado de Anticuerpos y se lavó suavemente por pipeteo. Se repitió este paso colocando el tubo en el imán y eliminando el sobrenadante. (3) Se añadió la muestra que contenía el antígeno (aproximadamente 1000 µL) y se pipeteó suavemente para resuspender el complejo magnético anticuerpo-perla. Se incubó con rotación durante 120 minutos a temperatura ambiente para permitir que el antígeno se uniera al complejo magnético anticuerpo-perla. (4) Se colocó el tubo en el imán y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio para su análisis posterior. El complejo magnético anticuerpo-perla-antígeno se lavó tres veces con 200 µL de Buffer de Lavado en cada lavado, separándolo con el imán, eliminando el sobrenadante y resuspendiéndolo suavemente entre cada lavado. (5) Se resuspendió el complejo magnético anticuerpo-perla-antígeno en 100 µL de Buffer de Lavado y se transfirió la suspensión a un tubo limpio. Esto se recomienda para evitar la co-elución de proteínas unidas a la pared del tubo. (6) La solución del complejo magnético anticuerpo-perla-antígeno se trató en condiciones reductoras desnaturizantes, y se cargó en un gel de SDS-PAGE para su separación.

6.4. Identificación de Proteínas Inmunoprecipitadas mediante LC-MS/MS

6.4.1. Digestión en Gel

Después de secar, las bandas del gel se destiñeron en acetonitrilo:agua (ACN:H₂O, 1:1), se redujeron y alquilaron (los enlaces disulfuro de los residuos de cisteína se redujeron con 10 mM de DTT durante 1 hora a 56 °C, y luego los grupos tiol se alquilaron con 10 mM de iodoacetamida durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad) y se digirieron *in situ* con tripsina de grado de secuenciación (Promega, Madison, WI) según lo descrito por Shevchenko *et al*^[164] con modificaciones menores. Las piezas de gel se deshidrataron con suficiente ACN. Se quitó el ACN y las piezas de gel se secaron en una centrífuga de vacío. Las piezas de gel secas se volvieron a hidratar en 100 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de CaCl₂ con

tripsina a 12.5 ng/μl durante 1 hora en un baño de hielo. Se eliminó el buffer de digestión y los geles se volvieron a cubrir con 100 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de CaCl₂ y se incubaron a 37°C durante 12 horas. La digestión se detuvo con la adición de 1% de TFA. Los sobrenadantes completos se secaron y luego se desalaron en ZipTip C18 (Millipore) hasta el análisis espectrométrico de masas.

6.4.2. *Análisis Espectrométrico de Masas*

El digesto proteico desalado se secó, se resuspendió en 10 μl de ácido fórmico al 0.1% y se analizó mediante LC-MS/MS en un sistema de MS LTQ-Orbitrap Velos Pro (LIT-Orbitrap, Thermo Scientific) acoplado a un sistema de HPLC Easy-nLC 1200. Los péptidos fueron concentrados (en línea) por cromatografía de fase reversa utilizando una precolumna C18 RP de 0.1 mm × 20 mm (Thermo Scientific), y luego se separaron usando una columna bioZen 2.6 μm Peptide XB-C18 RP de 0.075 mm x 250 mm (Phenomenex) operando a 0.25 μl/min. Los péptidos se eluyeron utilizando un gradiente dual de 60 minutos. El perfil del gradiente se configuró de la siguiente manera: 5–25% de solvente B durante 45 minutos, 25–40% de solvente B durante 15 minutos, 40–100% de solvente B durante 2 minutos y 100% de solvente B durante 18 minutos (solvente A: ácido fórmico al 0.1% en agua, solvente B: ácido fórmico al 0.1%, 80% de acetonitrilo en agua). La ionización se realizó utilizando un emisor LC-MS de acero inoxidable con un diámetro interno de 30 μm (Proxeon) a una tensión de pulverización de 2.1 kV con una lente S del 60%. La resolución del Orbitrap se ajustó a 30000. Los péptidos se detectaron en escaneos de 400 a 1600 amu (1 μscan), seguidos de veinte escaneos MS/MS dependientes de datos (Top 20), utilizando un ancho de aislamiento de 2 u (en unidades de masa/carga), una energía de colisión normalizada del 35%, y exclusión dinámica aplicada durante períodos de 60 segundos. La criba de estados de carga estaba habilitada para rechazar iones protonados no asignados y con carga única.

La identificación de péptidos a partir de los datos crudos se realizó utilizando el motor de búsqueda PEAKS Studio XPro (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Ontario, Canadá). La búsqueda en la base de datos se llevó a cabo contra Uniprot-homo sapiens (79684 entradas; versión de UniProt 09/22) (base de datos decoy-fusion). Se utilizaron las siguientes restricciones para las búsquedas: clivaje triptico después de Arg y Lys (semi específico), hasta dos sitios de clivaje perdidos, y tolerancias de 20 ppm para iones precursor y 0.6 Da para fragmentos de MS/MS. Las búsquedas se realizaron permitiendo la oxidación opcional de Met, la carbamidometilación de Cys y la oxidación de Tyr/Trip a nitro. Las tasas de descubrimiento

falso para coincidencias de espectros de péptidos y para proteínas se limitaron a 0.01. Solo se consideraron como identificaciones confiables aquellas proteínas con al menos dos péptidos únicos descubiertos en los análisis de LC-MS/MS.

7. Modelado Molecular y Simulaciones de Dinámica Molecular

Las técnicas computacionales del modelado molecular del Fg y simulaciones de MD se realizaron para obtener una estructura completa de la molécula de Fg y para evaluar el efecto de la nitración. El Fg presenta una estructura compleja con muchos sitios de interacción con otras proteínas y consigo mismo para polimerizar. Además, se ha demostrado que sufre PTMs nitroxidativas en patologías como ACVi. Se cuenta con una estructura cristalográfica a la cual le faltan secciones en los extremos N y C terminal de las 3 cadenas, siendo el extremo C-terminal de la cadena A α el más afectado. En consecuencia, su estructura tridimensional (3D) no está resuelta en su totalidad, ni en su nivel terciario ni cuaternario, siendo un verdadero desafío lograr un modelo completo.

7.1. Modelado del Fibrinógeno Completo

En primera instancia se propuso obtener tal modelo completo a los efectos de disponer de una estructura completa que nos permitiera posteriores estudios de las muchas zonas de interacción que existe en la molécula de Fg, y, en particular, investigar el impacto de las PTMs en su estructura y los posibles cambios en su funcionalidad asociadas a patologías.

Mientras las simulaciones de MD atomísticas proporcionan detalles a nivel atómico sin precedentes, una limitación significativa reside en la escala de tiempo y longitud que se puede alcanzar con los recursos computacionales disponibles. Alternativamente, los modelos de grano grueso (coarse grained, CG, por sus siglas en inglés) se han usado históricamente para capturar la física a escalas de tiempo y longitud más grandes sin sacrificar la información estructural subyacente esencial.^[165,166] Este enfoque se utilizó para modelar las regiones α C que comprenden aproximadamente 400 aminoácidos. Finalmente, para validar el modelo completo, se realizaron simulaciones de MD atomísticas. Este método es capaz de simular el comportamiento dinámico de una estructura y validar el modelo rígido inicial si se logra una situación estable.

Para construir el nuevo modelo completo, se modelaron la isoforma 2 de la cadena A α incluyendo FpA, la cadena B β incluyendo FpB y la isoforma γ_A de la cadena γ . Se seleccionaron A α -2 y γ_A porque son las isoformas predominantes. No se incluyeron los

péptidos señal. Para crear el modelo de Fg, se descargó la estructura cristalográfica del Fg humano del Banco de Datos de Proteínas (PDB ID: 3GHG)^[158] como un ensamblaje biológico y se utilizó como plantilla. Los aminoácidos 1-26 y 201-625 no están resueltos en la cadena A α del cristal del Fg humano; estas porciones representan al FpA, al botón E_A y una porción de 6 residuos de la cadena A α en la sección N-terminal, y la región α C completa en la sección C-terminal. Los aminoácidos 1-57 y 459-461 no están resueltos en la cadena B β del cristal del Fg humano; la porción N-terminal representa FpB, el botón E_B y una porción de 39 residuos siguientes. Los aminoácidos 1-13 y 395-411 no están resueltos en la cadena γ del cristal del Fg humano. Todas las regiones faltantes en las cadenas B β y γ , y los extremos N-terminales de las cadenas A α se construyeron mediante modelado por homología utilizando el motor Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0).^[167] La secuencia de los extremos C-terminales de las cadenas A α (regiones α C) se modelaron *de novo*, agregándolas a la estructura cristalográfica como una cadena lineal de aminoácidos usando el software MOE (Molecular Operating Environment ChemComp 2022.02),^[168] y realizando una simulación de MD de CG para permitir el plegamiento de esas regiones. El proceso de construcción se muestra en la Figura 2.1.

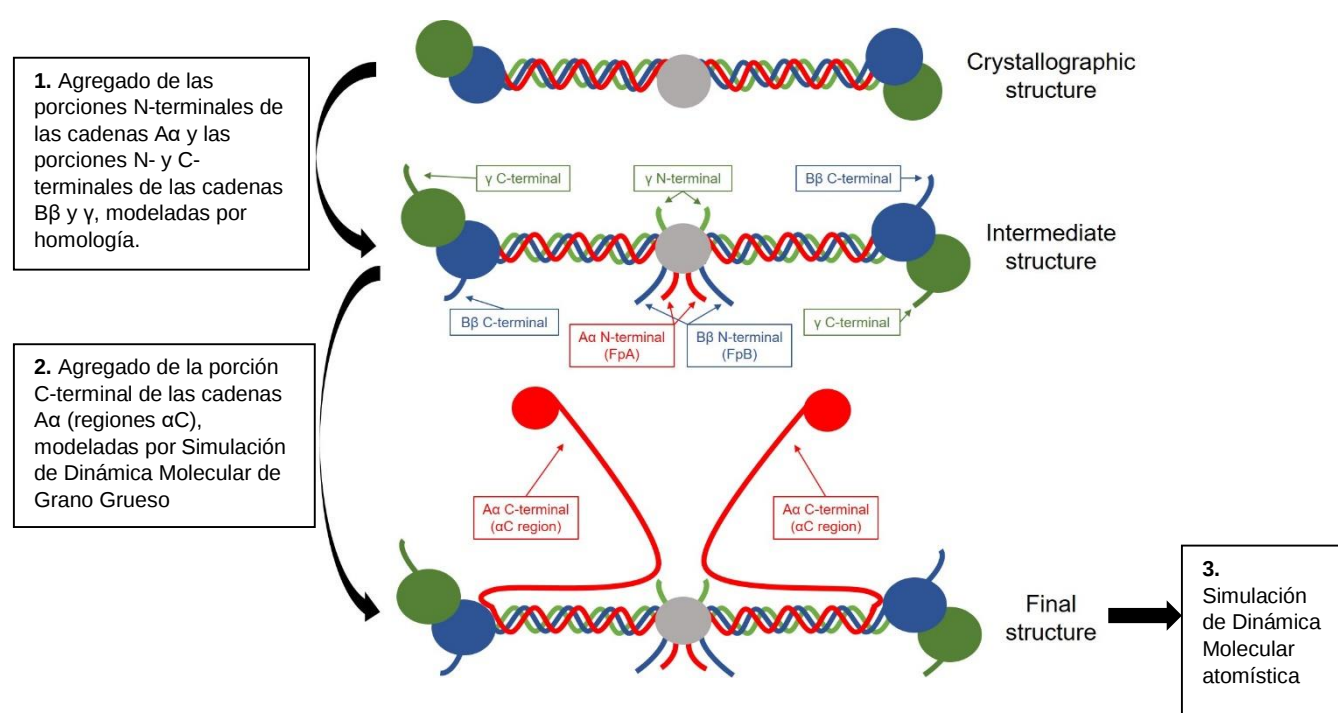


Figura 2.1. Proceso de construcción de la molécula completa de Fibrinógeno. El proceso comienza con la estructura cristalográfica del fibrinógeno (código PDB: 3GHG). Las porciones N-terminales y C-terminales de las cadenas B β y γ , así como las porciones N-terminales de las cadenas A α , se añadieron inicialmente basándose en modelado por homología para obtener una estructura intermedia. Las porciones C-terminales de las cadenas A α se incorporaron utilizando simulaciones de dinámica molecular de grano grueso para alcanzar la estructura final. Posteriormente, se realizaron simulaciones de dinámica molecular a nivel atómico para refinar y estabilizar la estructura, así como para observar su evolución.

7.1.1. Simulación de Dinámica Molecular de Grano Grueso

7.1.1.1.Preparación de la Estructura

A partir de las coordenadas del Fg humano con las porciones C-terminales 201-625 de las cadenas A α agregadas manualmente como una cadena lineal de aminoácidos, y después de una minimización en vacío, se realizó una conversión de la molécula de todos los átomos a un modelo de CG utilizando el campo de fuerza SIRAH.^[169] Se minimizó el sistema en vacío durante 50000 pasos. Luego, el sistema fue solvatado utilizando una caja de agua con un buffer de 15 Å. Después de la adición de las moléculas de agua, el sistema fue neutralizado y se añadieron iones Na⁺ y Cl⁻ hasta alcanzar una concentración de sal de 0.15 mol/L, emulando una fuerza iónica fisiológica.

7.1.1.2.Protocolo de la Simulación de Dinámica Molecular de Grano Grueso

La estructura completa se preparó utilizando VMD^[170] y el plugin LEaP de AmberTools20.^[171] La simulación de MD se realizó empleando el software de MD NAMD (Not Another Molecular Dynamics Program) v.2.14,^[172] con el campo de fuerza de CG SIRAH. Todas las etapas de los protocolos de simulación MD se llevaron a cabo con solvente explícito utilizando el modelo de agua WT4 en el ensamble isobárico-isotérmico (NPT). En todos los casos, se aplicó un corte de distancia de 10.0 Å para las interacciones no enlazadas de corto alcance y 10.0 Å para las funciones de suavizado; las interacciones electrostáticas de largo alcance se calcularon utilizando el método Particle Mesh Ewald (PME).^[173] Las interacciones de Van der Waals (VdW) se calcularon utilizando el método 12-6 LJ.^[174,175] Primero, el sistema se sometió a un protocolo de minimización de energía durante 50000 pasos. Durante las siguientes etapas de annealing, equilibración y producción, la presión se mantuvo en 1 atm usando el barostato de pistón de Nosé-Hoover Langevin,^[176,177] y las ecuaciones del movimiento de Newton se integraron utilizando el método de integración de Verlet en velocidad^[178] con un paso de tiempo de 20 fs. La etapa de annealing consistió en 0.25 ns de simulación, con una rampa de temperatura de 0.25 ns donde la temperatura se elevó de 60 K a 310 K, y los átomos definidos por la selección "backbone" se restringieron. Durante las etapas de equilibración y producción, la temperatura se mantuvo en 310 K utilizando el termostato de Langevin. La etapa de equilibración consistió en 20 ns de simulación y los átomos definidos por la selección "backbone" se restringieron. La etapa de producción consistió en 0.5 μ s de simulación y no se restringieron átomos. La simulación de CG se realizó con condiciones periódicas de contorno.

7.1.2. Simulación de Dinámica Molecular Atomística

7.1.2.1.Preparación de la Estructura

Después de modelar las porciones faltantes, se ensambló todo como se muestra en la Figura 2.1 y se realizó una minimización de energía y una corta simulación de MD atomística para estabilizar y refinar aún más la estructura. El sistema se solvató utilizando una caja de agua con un buffer de 15 Å, con dimensiones de 457.95, 301.87, 154.65 (x, y, z en Å) y se colocó en (-237.53, -161.46, -64.03) y (220.42, 140.41, 90.62) como coordenadas mínimas y máximas. La molécula también se rotó para minimizar el volumen de la caja de solvente. Se colocaron un total de 679677 moléculas de agua modelo TIP3P,^[179] obteniendo un total de 1931136 átomos en la caja. Después de la adición de las moléculas de agua, el sistema presentó una carga neta total de -8. El sistema se neutralizó y se añadieron un total de 1906 iones Cl⁻ más 1914 iones Na⁺, logrando una concentración de sal de 0.15 mol/L, emulando una fuerza iónica fisiológica.

7.1.2.2.Protocolo de la Simulación de Dinámica Molecular Atomística

La estructura se preparó utilizando VMD y el plugin QwikMD.^[180] La simulación de MD se realizó empleando el paquete de MD NAMD. Se utilizó el campo de fuerza CHARMM36 (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics).^[181,182] Todas las etapas se llevaron a cabo con solvente explícito utilizando el modelo de agua TIP3P en el ensamble NPT. En todos los casos, se aplicó un corte de distancia de 12.0 Å para las interacciones no enlazadas de corto alcance y 10.0 Å para las funciones de suavizado; las interacciones electrostáticas de largo alcance se trataron utilizando el método PME. Primero, el sistema se sometió a un protocolo de minimización de energía durante 20000 pasos. Durante las siguientes etapas de annealing, equilibración y producción, la presión se mantuvo en 1 atm usando el pistón de Nosé-Hoover Langevin, las ecuaciones de movimiento se integraron utilizando el esquema de pasos múltiples r-RESPA para actualizar las interacciones de corto alcance cada 1 paso y las interacciones electrostáticas de largo alcance cada 2 pasos, y se eligió un paso de integración de 2 fs. La etapa de annealing consistió en 0.29 ns de simulación, con una rampa de temperatura de 0.25 ns donde la temperatura se elevó de 60 K a 310 K, y los átomos definidos por la selección "backbone" se restringieron. Durante las etapas de equilibración y producción, la temperatura se mantuvo en 310 K utilizando la dinámica de Langevin. La etapa de equilibración consistió en 1.00 ns de simulación y los átomos definidos por la selección "backbone" se restringieron. La etapa de producción consistió en 30 ns de simulación y no se restringieron átomos.

7.1.3. *Análisis de la Trayectoria obtenida*

La trayectoria obtenida se analizó para evaluar la estabilidad termodinámica, estructural y geométrica de la proteína. Los gráficos se prepararon con Xmgrace^[183] y las estructuras proteicas se visualizaron con VMD. La información de las energías durante la dinámica se extrajo en VMD, y se analizó la evolución de la energía total con sus componentes de energía cinética y energía potencial, así como las contribuciones de las fuerzas de VdW y electrostáticas de esta última energía. Todas estas energías se han representado en gráficos en función del tiempo de producción. Se graficaron Radio de Giro (RG) y Área de Superficie Accesible al Solvente (SASA) para evaluar la estabilidad.

También se realizó un análisis estructural, con la evolución de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) de los carbonos alfa (C_α) de la proteína y de cada cadena en las trayectorias de simulación de MD calculadas como un promedio y graficadas en función del tiempo de producción. Se calculó la Fluctuación Cuadrática Media (RMSF) de la trayectoria de simulación de MD usando un script y se graficaron las fluctuaciones del backbone de la proteína (eje Y) como función de la posición de los residuos de cada cadena en el Fg (eje X). El modelo 3D final obtenido se representó en colores según el RMSF de cada residuo. La estructura inicial se utiliza como referencia para los cálculos de RMSD y RG, para poder comparar la magnitud de los cambios geométricos en los sistemas.

También se realizó una extracción de una pose al inicio, mitad y final de la simulación y la superposición de ellas también se muestra. Finalmente, se calcularon el número de enlaces de hidrógeno y las energías de interacción entre las diferentes cadenas del Fg, observando interacciones no enlazantes de VdW y electrostáticas, que fueron graficados.

7.2. Simulaciones de Dinámica Molecular del Fibrinógeno y Fibrinógeno Nitrado

Por otro lado, se procedió a estudiar el comportamiento de la molécula cuando están presentes ciertos residuos de NO_2Tyr . Se decidió realizar el experimento con las posiciones de Tyr que mostraron estar en mayor porcentaje en pacientes con ACVi en el experimento de LC-MS/MS que se detalló anteriormente.^[184] Esos tres residuos son: Tyr⁴⁵² y Tyr⁴⁷⁵ de la cadena B β y Tyr³⁸⁰ de la cadena γ , y se encuentran en los nódulos que contienen los bolsillos de interacción a través de los cuales una molécula de Fg interacciona con otra para comenzar a polimerizar (bolsillos Db y Da, respectivamente).

7.2.1. Parametrización del Residuo de 3-Nitrotirosina

Para esto, el residuo NO₂Tyr fue previamente parametrizado en el Campo de Fuerza General CHARMM36. Brevemente, para la parametrización de NO₂Tyr, al cual se llamó NTY, se realizaron los siguientes pasos:

1. En MOE, se crea una Tyr y se modifica enlazando un nitrógeno (N) a CE2, al que se enlazan dos oxígenos (O), uno con doble enlace y el otro con carga -1. Se renombraron los átomos: HE2 a NE2, O1 a ON1 y O2 a ON2. Luego, se exporta como NTyr en formatos pdb y mol2.
2. En cgenff.umaryland.edu, se carga NTyr.mol2 y se genera NTyr.str con atomtypes, cargas y parámetros. Se copia el residuo TYR en el archivo de topología top_all36_prot.rtf y se hacen las siguientes modificaciones: renombrar TYR a NTY, actualizar atomtypes y cargas según NTyr.str, agregar el grupo nitro, y ajustar los enlaces y ángulos. Se guarda el archivo como top_all36_prot_NTyr.rtf. La Figura 2.2 muestra un fragmento de este archivo de topologías, con la representación del nuevo residuo de NTY.
3. En el archivo de parámetros par_all36m_prot.prm, se añaden los nuevos parámetros de BONDS, ANGLES y DIHEDRALS para los atomtypes diferentes. Se guarda el archivo como par_all36m_prot_NTyr.prm.

7.2.2. Simulaciones de Dinámica Molecular Atomísticas

7.2.2.1. Preparación de las Estructuras de Fibrinógeno y Fibrinógeno Nitrado

Para explorar el impacto estructural de los residuos NO₂Tyr dentro de estos bolsillos de interacción intermolecular que presenta el Fg, se crearon dos modelos de Fg, ambos obtenidos a partir de la estructura cristalográfica. Uno de ellos con los residuos Tyr⁴⁵² y Tyr⁴⁷⁵ en la cadena β y Tyr³⁸⁰ en la cadena γ modificados a NO₂Tyr, mientras que el otro modelo, sin modificar, se utilizó como control. La estructura se preparó utilizando VMD y el plugin QwikMD. Cada sistema de Fg (no modificado y modificado) se agregó a una caja de agua y se neutralizó con NaCl a una concentración de 150 mM.

7.2.2.2. Protocolo de las Simulaciones de Dinámica Molecular Atomísticas

Los sistemas completos se relajaron mediante simulaciones de MD atomística utilizando el paquete NAMD, con el campo de fuerza CHARMM36, y con las mismas condiciones de presión, temperatura, método de integración de las ecuaciones de Newton y paso de tiempo, y

todas las especificaciones indicadas en la sección 7.1.2.2. La etapa de producción consistió en 140 ns de simulación y no se restringieron átomos.

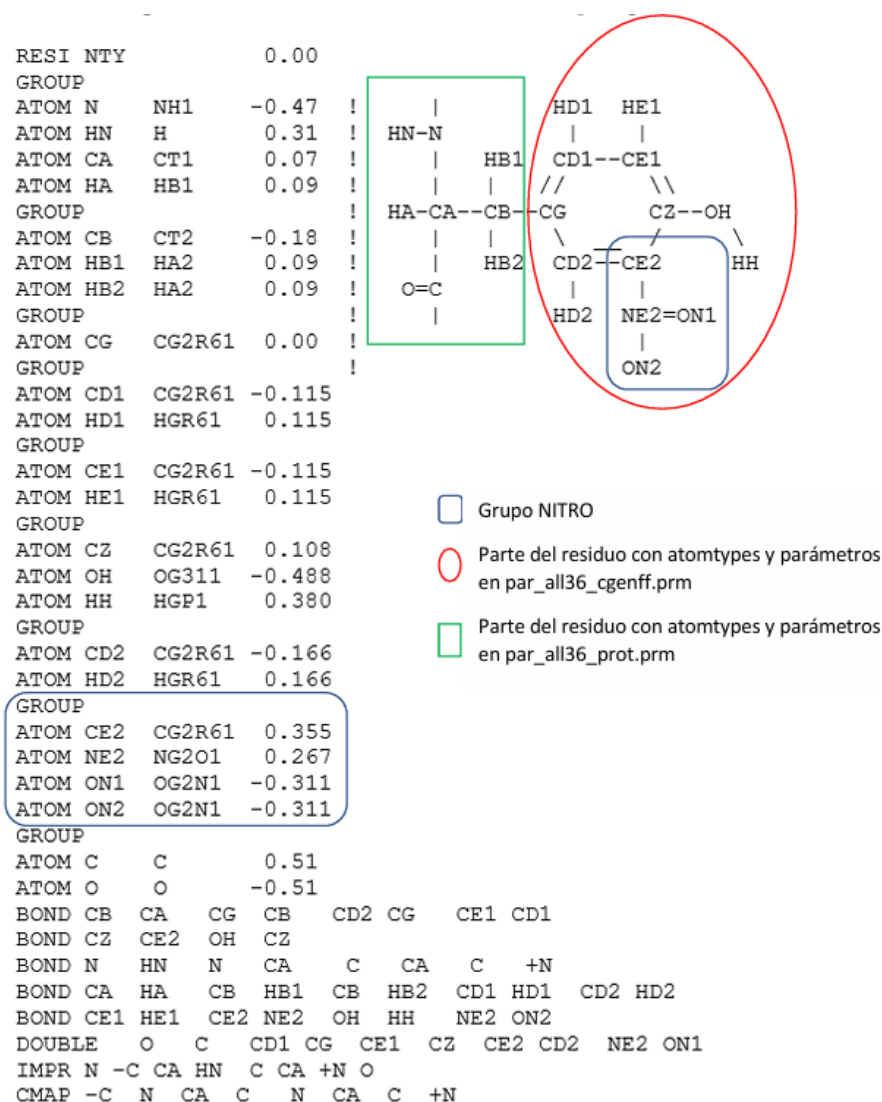


Figura 2.2. Residuo NTY en el archivo de topologías.

7.2.3. Análisis de las Trayectorias obtenidas

Para observar la evolución de la estructura general se calcularon los RMSD y RMSF. Además, se observaron y compararon los entornos de Tyr y de NO₂Tyr, incluyendo sus RMSDs. Para los ligandos presentes en los bolsillos de interacción, también se realizó la observación del entorno y se realizaron cálculos de energías de interacción con el bolsillo, con el complemento NAMD Energy, observando interacciones no enlazantes de VdW y electrostáticas. Finalmente, se obtuvo un video de la trayectoria que permite observar la evolución de la estructura de los bolsillos conteniendo a los ligandos y las NO₂Tyr presentes en el entorno. Aquí se muestran las poses inicial y final de esos sitios de interés.

Capítulo 3: Análisis de 3-Nitrotirosina en Fibrinógeno mediante LC-MS/MS

1. Introducción

1.1. Fundamentos de Espectrometría de Masas

1.1.1. *Espectrometría de Masas*

La MS caracteriza los iones moleculares basándose en su relación masa-carga (m/z) y utilizando su respuesta a campos eléctricos o magnéticos.^[185] También se puede utilizar para caracterizar y confirmar modificaciones nitrooxidativas en los residuos aminoacídicos, ya que estas alteran la masa del ion molecular. La salida de datos resultante, o espectro, se presenta como intensidad en el eje y, versus m/z en el eje x. La relación m/z es la relación entre la masa molecular y el número de cargas del ion, y la intensidad es la abundancia relativa del ion molecular.^[186] Los espectrómetros de masas contienen una fuente de ionización, al menos un analizador de masas (dependiendo de si es simple o tandem) y un detector de masas. La técnica se basa en la generación de iones en fase gaseosa del analito en la fuente de ionización, seguida de la separación según la relación m/z de los fragmentos ionizados producidos. Esto implica el uso de uno o más de uno de los varios tipos de analizadores de masas y la detección por un detector. Existen varios tipos diferentes de fuentes de ionización de MS, analizadores de masas y detectores, algunos de los cuales se comentarán a continuación.

1.1.2. *Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento para Espectrometría de Masas*

En primer lugar, las muestras deben ser separadas antes de inyectarlas en el espectrómetro de masas. Para lograr esto, la MS se conecta a un sistema de HPLC. La cromatografía se basa en diferentes fases móviles y estacionarias para separar moléculas según sus afinidades. Este sistema de cromatografía opera a alta presión para lograr una buena resolución de separación. La mayoría de las configuraciones de HPLC para proteómica utilizan HPLC en fase reversa, con una fase estacionaria hidrofóbica no polar y una fase móvil acuosa polar. Las proteínas o péptidos se eluyen de la columna utilizando un gradiente de disolvente orgánico no polar. Los respectivos eluidos se separan por su tiempo de retención en una fase estacionaria no polar, como una columna de sílice con cadena de 18 carbonos (C18). Las columnas en fase reversa son muy adecuadas para el análisis por MS, ya que ofrecen análisis variado, compatibilidad con sistemas de ionización y, lo más importante, alta reproducibilidad y eficiencia de separación.^[187]

1.1.3. Ionización por Electrospray

Los enfoques de MS del presente estudio utilizan como método de ionización la ionización por electrospray (ESI, por sus siglas en inglés). En este método el solvente se introduce en la fuente de ionización a través de una fina aguja capilar, mantenida a un alto potencial (2-4kV), lo que resulta en un fino spray de gotas. Estos iones en fase gaseosa se producen como resultado de cuatro procesos principales. (1) La formación de gotas altamente cargadas debido al potencial proporcionado por la aguja capilar. (2) La evaporación del solvente portador que es potenciada por el calentamiento de la fuente de ionización. (3) La introducción de un flujo de gas nitrógeno caliente conocido como gas de secado, que hace que el tamaño de las gotas disminuya y la densidad de carga aumente. (4) Durante la etapa final, la gota alcanza su límite de Raleigh y sufre fisión de Coulomb, donde la gota explota en gotas más pequeñas y estables. Este proceso continúa hasta que se forman iones en fase gaseosa de moléculas individuales. Cualquier vapor de solvente restante o material sin carga es barrido por gas nitrógeno, conocido como gas cortina.

La ESI puede producir iones con carga positiva y negativa mediante la adición de ácidos o bases volátiles a los solventes, ya sea proporcionando o eliminando protones. Como una técnica de ionización suave que produce proteínas intactas ionizadas, la ESI es muy adecuada para el análisis de biomoléculas como proteínas.^[188] Existen otras técnicas de ionización suave adecuadas para biomoléculas como proteínas, entre las cuales la más conocida es la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés).^[189]

1.1.4. Disociación Inducida por Colisión y Patrones de Fragmentación de Péptidos

Las técnicas de ionización suave permiten analizar los iones moleculares, como los péptidos, sin fragmentación. Sin embargo, la elucidación estructural de biomoléculas requiere la fragmentación subsiguiente del ion precursor o ion padre. Existen varias técnicas para la fragmentación de proteínas o péptidos para su posterior análisis con MS tándem; las más comunes son la disociación por transferencia de electrones (ETD por sus siglas en inglés), la disociación inducida por colisión (CID por sus siglas en inglés) y la disociación por colisión de alta energía (HCD por sus siglas en inglés). Los enfoques de MS que se exponen en el presente estudio utilizaron fragmentación por CID. Las moléculas de péptido o proteína entran en la celda de colisión y colisionan con un gas inerte, como nitrógeno o argón. La energía cinética producida se convierte en energía interna, lo que resulta en la vibración y ruptura de

los enlaces, y la fragmentación del ion molecular en iones fragmento más pequeños (iones producto o hijos).

Se pueden producir varios tipos de iones producto a partir de péptidos: los iones a, b y c corresponden a fragmentos de péptidos donde la carga reside en el extremo N-terminal, mientras que los iones x, y y z tienen la carga en el extremo C-terminal. Típicamente, la CID genera predominantemente iones fragmento de las series b e y, donde los péptidos se rompen alrededor del enlace peptídico.^[190]

1.1.5. Analizadores de Masas de Cuadrupolo y Tiempo de Vuelo

Un analizador de masas de cuadrupolo (Q) utiliza cuatro electrodos de varilla paralelos dispuestos en formación cuadrada alrededor de un eje central. Se aplica una corriente continua negativa a las cuatro varillas, mientras que una corriente alterna de radiofrecuencia positiva se superpone a dos de las varillas en cualquier momento dado, moviéndose en sentido horario alrededor de las varillas desde el eje x al eje y. La combinación de radiofrecuencia alterna y corriente continua fija varía en magnitud y permite que el cuadrupolo funcione como un filtro de iones.

Cuando se inyectan iones a lo largo del eje central z, su trayectoria a través del cuadrupolo hacia el detector depende del potencial de radiofrecuencia aplicado. Si la proporción del potencial de radiofrecuencia desestabilizador no es demasiado grande o pequeño para los iones correspondientes, estos seguirán una trayectoria en espiral clara a través del cuadrupolo hacia el detector. El equilibrio del potencial aplicado permite una selectividad precisa de masas; los iones cuyas masas no son estables con el potencial aplicado se dispersan y no son detectados. Así, los iones de la muestra se separan según la estabilidad de sus trayectorias en el campo eléctrico oscilante. Este equilibrio de potencial aplicado puede alternarse y utilizarse en modo de escaneo, lo que permite seleccionar para su detección todas las masas posibles dentro de un rango dado.^[191]

El analizador de masa de tiempo de vuelo (TOF) funciona aplicando un alto voltaje de 5000 V a la placa posterior, lo que acelera los iones y los expulsa desde la fuente de iones hacia una región de deriva. Aquí no hay campo eléctrico ni magnético adicional, por lo tanto, no hay más aceleración. Si todos los iones tienen la misma energía cinética, pero difieren en masa, los iones más ligeros llegarán al detector más rápido que los iones de mayor masa. Los iones de la muestra se separan por el tiempo que les lleva alcanzar el detector, relativo a su velocidad, la cual está relacionada con su masa.^[192]

Para igualar la energía cinética de los iones, estos pasan por un reflectrón. Este reflectrón está compuesto por anillos huecos de carga positiva con un gradiente creciente, diseñados para detener y redirigir los iones. El reflectrón termina en una rejilla donde el potencial se vuelve mayor que el potencial de aceleración original. Cuanta más energía cinética tenga el ion, más profundamente penetrará en el reflectrón y más se ralentizará. Este proceso iguala la energía cinética de los iones antes de que comiencen su viaje medido de tiempo de vuelo hacia el detector, asegurando que todos los iones de la misma masa lleguen al detector al mismo tiempo, mejorando así la resolución.

Un instrumento con sistema TOF ofrece muchas ventajas, incluyendo tasas de adquisición rápidas, continuidad espectral y un rango dinámico excepcional. Un sistema híbrido que combina un analizador de cuadrupolo con un analizador de TOF proporciona alto rendimiento en términos de sensibilidad, resolución y velocidad de adquisición de datos, denominándose Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo (QTOF). En este tipo de espectrómetro de masas se cuenta con un cuadrupolo (Q1) que actúa como un filtro de masas, seleccionando los iones precursores que serán fragmentados en la celda de colisión. Una celda de colisión (Q2) que es utilizada para la CID, donde los iones seleccionados colisionan con un gas inerte y se fragmentan. Y un analizador de TOF que proporciona una alta resolución y precisión de masas, midiendo el tiempo que tardan los iones en viajar una distancia conocida, permitiendo determinar su relación m/z con gran exactitud. Este sistema es el que se utiliza en los primeros experimentos no dirigidos del presente Capítulo (TripleTOF® 5600).

1.1.6. Analizadores de Masas de Triple Cuadrupolo y Trampa de Iones Lineal

Un sistema de Triple Cuadrupolo (QqQ) cuenta con un primer cuadrupolo (Q1) que actúa como un filtro de masas, seleccionando iones con una relación m/z específica, una segunda sección (Q2) conocida como celda de colisión, donde los iones seleccionados se fragmentan mediante CID, y un tercer cuadrupolo (Q3) que selecciona los iones fragmentados para su posterior análisis.

Una Trampa de Iones Lineal (LIT) contiene electrodos lineales, que son un conjunto de electrodos que generan un campo cuadrupolar para atrapar y manipular iones en el eje central.

Un sistema híbrido Triple Cuadrupolo – Trampa de Iones Lineal (QqQLIT) combina las ventajas de ambos tipos de dispositivos, ofreciendo mayor flexibilidad y capacidad analítica. El funcionamiento incluye una selección inicial de iones en la cual los iones generados en la fuente de ionización se introducen en el primer cuadrupolo (Q1), donde se selecciona un ion

específico según su m/z . Luego ocurre la fragmentación en la cual los iones seleccionados en Q1 se envían a la celda de colisión (Q2), donde colisionan con un gas inerte y se fragmentan en iones más pequeños. Luego ocurre la selección de fragmentos donde los iones fragmentados se envían al tercer cuadrupolo (Q3), donde se seleccionan fragmentos específicos según su m/z para el análisis posterior. Lo siguiente es la transferencia a la LIT donde los iones seleccionados en Q3 se transfieren a la LIT, donde se pueden realizar manipulaciones adicionales. Finalmente, la manipulación y análisis en la LIT incluye el aislamiento de iones (se pueden seleccionar y aislar iones específicos dentro de la trampa), la fragmentación adicional (MS^n , los iones aislados pueden ser sometidos a fragmentación adicional para obtener más información estructural), el escaneo de masa (se puede realizar un escaneo completo de m/z para identificar todos los iones presentes en la trampa), y la detección (los iones manipulados en la LIT se detectan para el análisis cuantitativo y cualitativo).

Este espectrómetro de masas híbrido QqQLIT presenta ventajas como una alta sensibilidad y especificidad, pues la combinación de QqQ y LIT permite una identificación y cuantificación precisa de compuestos con alta sensibilidad. Presenta versatilidad analítica ya que la LIT añade flexibilidad para realizar experimentos MS^n , aislamiento y fragmentación detallada de iones. Tiene una mejor resolución y capacidad de manipulación de iones debido a que la LIT permite la concentración y manipulación detallada de iones, mejorando la resolución y el análisis. Este sistema es el que se utiliza en los experimentos dirigidos del presente Capítulo (QTrap® 5500).

1.1.7. Programas de Monitoreo de Reacciones Múltiple y Seleccionada (MRM y SRM)

Los programas de MRM y SRM son modos similares de análisis en MS, donde MRM analiza múltiples iones precursor y productos, mientras que SRM analiza solo uno. El modo MRM utiliza tres cuadrupolos, dos como analizadores de masa y uno como celda de colisión. El cuadrupolo 1 (Q1) selecciona el ion precursor deseado por su masa. El cuadrupolo 2 (Q2) genera los iones fragmento de este ion precursor mediante CID. El cuadrupolo 3 (Q3) está configurado para seleccionar masas específicas de iones fragmento del ion precursor. Este método proporciona una sensibilidad aumentada, ya que solo los iones de interés pasan por los Q1 y Q3 y alcanzan el detector.^[193] En estos modos, los sistemas de QqQ tienen algunas ventajas sobre los sistemas de QTOF.

Los sistemas de cuadrupolo normalmente están limitados por su tipo de exploración, ya que al escanear a través de un rango de masas limita la tasa de adquisición y, por lo tanto, la sensibilidad. Sin embargo, en los modos MRM y SRM se supera este problema, y los sistemas

de QqQ son más sensibles que los sistemas de QTOF, debido al tiempo muerto requerido por este último para calcular el tiempo de vuelo.

Por estas razones, los sistemas QqQ son ideales para cuantificar iones de masa conocida con alta sensibilidad. Sin embargo, estos analizadores de masa están limitados en resolución de masa y en el rango de masas de 1 a 4000 m/z, en comparación con los sistemas de Q-TOF, que tienen un rango de análisis de masa de 20 a 20000 m/z.^[194,195]

Los sistemas de TOF muestran menos sensibilidad que los sistemas basados en QqQ en modos MRM o SRM. Sin embargo, para identificar analitos desconocidos y hacer una búsqueda inicial, el sistema TOF es más adecuado. Pero lo más importante, bajo condiciones normales, ofrece una mayor resolución de masa que los sistemas basados en QqQ, lo que lo hace adecuado para identificar modificaciones en aminoácidos, en modo IDA.

1.2. Espectrometría de Masas Tándem como técnica para analizar Proteínas Modificadas

La MS/MS puede utilizarse en el análisis de proteínas para confirmar secuencias peptídicas que contienen PTMs nitroxidativas. El análisis por MS mide la relación m/z de los analitos ionizados, y las modificaciones nitroxidativas en las proteínas alteran la relación m/z tanto de la proteína intacta como de los residuos donde ocurrió la modificación, permitiendo la identificación del sitio de la PTM. El método actualmente aceptado para identificar PTMs implica aislar el aminoácido modificado dentro de la secuencia proteica.^[196]

Existen dos enfoques principales para identificar modificaciones en proteínas, top-down (de arriba hacia abajo) y bottom-up (de abajo hacia arriba). El primero implica el análisis de proteínas intactas y sus productos de fragmentación en MS, mientras que el segundo implica la digestión proteolítica de proteínas en péptidos mediante proteasas como la tripsina antes del análisis. Este último es el enfoque más común en proteómica y para identificar modificaciones en proteínas en biología.

Para facilitar el análisis de datos, existen varias herramientas de búsqueda estadística como Mascot®, PEAKS®, Sequest®, ProteinPilot®, Tandem®, Ommsa® y Phenyx®, cada una con ventajas y desventajas. En la mayoría de los casos, las secuencias peptídicas se buscan en una base de datos de proteínas (datos *in silico*), y cualquier secuencia en la base de datos que coincida parcialmente con la secuencia experimental se investiga para ver si se ajusta a los datos. Las herramientas de búsqueda son susceptibles a identificaciones falsas debido a la

naturaleza tolerante al error de los motores de búsqueda, y por esta razón, la validación manual mediante secuenciación *de novo* es crucial para tener confianza en las asignaciones.

Un estudio realizado por Stevens *et al.* ilustra la importancia de la precisión de resolución de masas altas al identificar residuos de Tyr nitrados utilizando MS/MS y la necesidad de validar manualmente los datos mediante secuenciación *de novo* para evitar problemas con moléculas isobáricas (péptidos de la misma masa, constituidos por diferentes aminoácidos). El mismo estudio sugirió validar manualmente todos los picos de espectros MS/MS con una abundancia relativa de aproximadamente el 20% o más.^[197] Un estudio realizado por Petersson *et al.* destaca que el barrido de ion precursor con un analizador de masa de cuadrupolo se puede utilizar para la detección selectiva de péptidos nitrados, basado en una digestión trípica de BSA-NO₂Tyr.^[198]

Existen varias técnicas específicas de análisis de datos y modos de MS que pueden utilizarse para identificar y cuantificar modificaciones en proteínas. Estas incluyen la pérdida neutra, el barrido de ion precursor y los métodos SRM y MRM dirigidos, como se mencionó anteriormente.

En el barrido de ion precursor, el tercer analizador de masa (Q3) está fijado para detectar una masa específica de ion fragmento y escanea los iones precursores que generan este ion producto mediante fragmentación en la celda de colisión. Comúnmente, se detectan y cuantifican los iones imonio de aminoácidos oxidados como iones producto.

En el barrido de pérdida neutra, el fragmento reportero es no cargado y se monitorea escaneando con ambos analizadores de masa (Q1 y Q3) con un desplazamiento de masa correspondiente a la masa eliminada.

La búsqueda o minería de conjuntos de datos de alta resolución de experimentos no dirigidos también puede lograrse mediante XICs de ventana estrecha. Los XIC de ventana estrecha utilizan una alta resolución de masa para permitir la búsqueda de iones reporteros, con una ventana de masa muy estrecha, lo que proporciona una reducción significativa en falsos positivos de moléculas isobáricas.

2. Resultados

2.1. Desarrollo de métodos LC-MS/MS

Se logró el desarrollo de métodos LC-MS/MS para localización de sitios de nitración y su cuantificación relativa. La presencia de NO₂Tyr fue identificada mediante análisis de MS en un sistema QTOF de Fg nitrado *in vitro* y digerido en solución. Mascot pudo identificar las cadenas Aα, Bβ y γ del Fg con un promedio de cobertura de secuencia del 56%, 76% y 80%, respectivamente, y confirmó que la isoforma predominante de la cadena Aα era la 2 y de la cadena γ era la γ_A. La cobertura de secuencia de las cadenas Aα y γ es mejor de lo que se indica, ya que Mascot asumió las isoformas largas. Se identificaron veinte sitios diferentes de nitración de Tyr en las tres subunidades del Fg, de los 50 sitios presentes dentro de las isoformas predominantes del Fg. Todos los péptidos conteniendo esta modificación, y sus correspondientes péptidos no modificados, fueron validados mediante secuenciación *de novo* del espectro MS/MS. Una vez confirmado el péptido nitrado se procedió a su cuantificación relativa al péptido no modificado, utilizando el área bajo la curva sus picos en los XICs. La Figura 3.1 muestra los espectros MS/MS y los XICs de dos péptidos de interés.

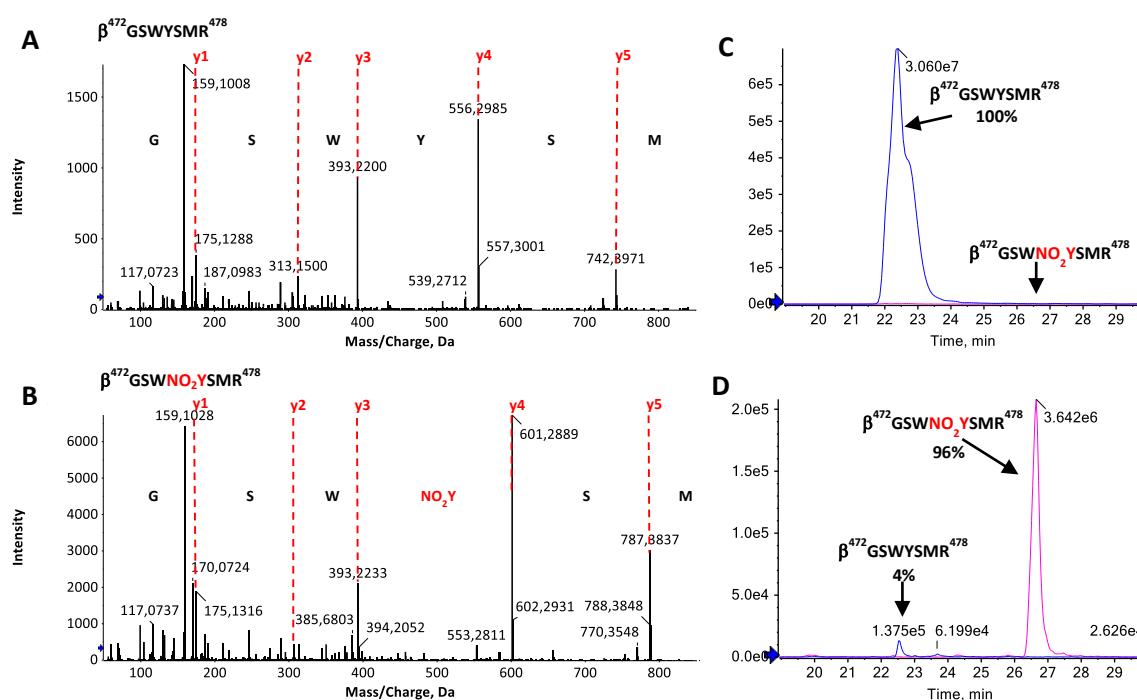


Figura 3.1. Identificación de 3-nitrotirosina en el péptido triptico $\beta^{472}\text{GSWYSMR}^{478}$ de fibrinógeno nitrado *in vitro*. Espectros MS/MS del péptido triptico $\beta^{472}\text{GSWYSMR}^{478}$ (A) y su correspondiente péptido nitrado mostrando la presencia de nitrotirosina $\beta^{472}\text{GSWNO}_2\text{YSMR}^{478}$ (B) con los iones de la serie y marcados. El cambio de masa/carga de 556.30 Da a 601.29 Da de y4 confirma la presencia de la modificación nitrotirosina en βY^{475} . Los correspondientes cromatogramas de iones extraídos de las formas nitrada y no modificada del péptido $\beta\text{GSWYSMR}$ son utilizados para la cuantificación relativa en el fibrinógeno control (C) y en el fibrinógeno tratado con peroxinitrito (D).

En general, la proporción de tratamiento más alta produjo más modificaciones y/o niveles más altos de NO₂Tyr en los péptidos en comparación con las proporciones de tratamiento más bajas, aunque no siempre hubo una clara dependencia de la dosis. La nitración en los residuos βTyr⁷¹, βTyr⁴⁷⁵ y γTyr³⁸⁹ fue la más consistentemente identificada, a pesar de que Tyr⁴⁷⁵ mostró una modificación relativamente baja en porcentaje. En la Tabla 3.1 se exponen los péptidos conteniendo NO₂Tyr identificados, con sus características y cuantificación relativa.

Fue difícil detectar la nitración del Fg en muestras clínicas mediante análisis no dirigido (IDA), lo que sugiere que el nivel de modificación era menor que en el Fg nitrado *in vitro*. Por lo tanto, para mejorar la selectividad y la sensibilidad, se desarrolló un método de análisis MS de tipo MRM en un analizador QqQLIT. Se utilizaron datos de péptidos nitrados en Fg nitrado *in vitro* del experimento anterior (modo IDA, no dirigido) para seleccionar posiciones específicas de Tyr y determinar los fragmentos iónicos a monitorear. Se seleccionaron nueve residuos de Tyr para el análisis: Tyr⁶², Tyr²⁷⁷ y Tyr⁵⁸⁹ de la cadena Aα; Tyr⁷¹, Tyr⁴⁰⁸, Tyr⁴⁵² y Tyr⁴⁷⁵ de la cadena Bβ; y Tyr³⁸⁰ y Tyr³⁸⁹ de la cadena γ. Esta selección se realizó con el criterio de incluir todas las posiciones nitradas observadas en el nivel más bajo de nitración, más dos posiciones observadas en el nivel medio de nitración y dos posiciones observadas en el nivel más alto de nitración. Para cada uno de esos residuos de Tyr, se seleccionó un péptido nativo y el péptido nitrado correspondiente, priorizando aquellos que mostraban picos XIC de mayor intensidad con relaciones señal-ruido adecuadas. Se seleccionaron tres transiciones con el objetivo de lograr una identificación correcta basada en la especificidad (presente solo en el ion principal de interés), la intensidad (mayor relación señal-ruido) e incluyendo el residuo de Tyr en cuestión, para cada uno de los iones de péptido. En la Tabla 3.2 se exponen las características de los péptidos seleccionados

Tabla 3.1. Péptidos de Fibrinógeno conteniendo 3-nitrotirosina identificados. Se muestran los péptidos de Fibrinógeno (Fg) conteniendo residuos de 3-nitrotirosina (Y roja) agrupados por cadena de Fg, indicando el % de nitración en los tres estándares de Fg nitrado (se indican las relaciones molares de ONOO⁻/Fg utilizadas).

Cadena de Fg	Relación Molar ONOO ⁻ /Fg			Sitio de Tirosina	Secuencia peptídica modificada identificada ^a	Masa teórica del péptido modificado ^b	Masa observada del péptido modificado ^c	m/z (carga)	Ion score ^d	Rt ^e (min)
	200	100	10							
Aα	% de nitración de Tirosina ^f									
	33	0	2	Y62	⁴⁹ DSDWPFCSEDEWN ^{Y+45} K ⁶³	2007.72	2007.87	670.23 (3+)	92	35.5
	55	0	0	Y95	⁸⁸ LKNSLFE ^{Y+45} QK ⁹⁷	1313.66	1313.76	657.89 (2+)	55	24.5
	69	75	0	Y277	²⁷² GGSTS ^{Y+45} GTGSETESPR ²⁸⁷	1616.66	1616.77	809.39 (2+)	83	19.2
Bβ	15	8	0	Y589	⁵⁸² QFTSSTS ^{Y+45} NRGDSTFESK ⁵⁹⁹	2085.89	2086.05	696.36 (3+)	43	21.7
	46	4	1	Y71	⁵³ REEAPSLRPAPPPISGGG ^{Y+45} R ⁷²	2151.08	2151.25	718.09 (3+)	94	22.5
	16	-	0	Y149	¹²⁵ NSVDELNNNVEAVSQTSSSSFYMY ^{Y+45} LLK ¹⁵²	3211.46	3211.71	1071.58 (3+)	69	37.9
	2	0	0	Y172	¹⁶⁴ DNENVVNE ^{Y+45} SSELEK ¹⁷⁸	1812.77	1812.90	907.46 (2+)	61	29.8
	25	-	0	Y222	²¹² LESDVSAQME ^{Y+45} CR ²²⁴	1631.66	1631.77	816.89 (2+)	79	28.6
	14	0	0	Y315	³¹⁴ N ^{Y+45} CGLPGEYWLGN ^{Y+45} DK ³²⁸	1829.77	1829.91	915.96 (2+)	87	32.8
	21	0	0	Y375	³⁵⁴ AHYGGFTVQNEANKYQISVNK ^{Y+45} R ³⁷⁶	2731.31	2731.48	911.50 (3+)	131	25.0
	24	0	1	Y408	³⁹⁶ TMTIHNGMFFST ^{Y+45} DR ⁴¹⁰	1880.78	1880.92	627.98 (3+)	102	28.0
	1	0	0	Y447	⁴⁴⁶ YY ^{Y+45} WGGQ ^{Y+45} TWDMAK ⁴⁵⁸	1757.68	1757.82	879.91 (2+)	13	32.8
	9	0	0	Y452	⁴⁴⁶ YYWGGQ ^{Y+45} TWDMAK ⁴⁵⁸	1712.69	1712.82	857.42 (2+)	71	32.3

	3	0	11	Y475	⁴⁷² GSW ^{Y+45} SMR ⁴⁷⁸	930.37	930.42	466.22 (2+)	33	26.4
	14	0	0	Y135	¹³⁵ ^{Y+45} LQEIYNSNNQK ¹⁴⁶	1557.71	1557.80	779.91 (2+)	41	23.3
	7	0	0	Y140	¹³⁵ ^{Y+45} LQEI ^{Y+45} NSNNQK ¹⁴⁶	1602.69	1602.81	802.41 (2+)	37	26.5
	13	0	0	Y288	²⁸³ TSTAD ^{Y+45} AMFK ²⁹²	1178.49	1178.57	590.29 (2+)	54	26.6
Y	23	0	0	Y375	³⁶⁵ CHAGHLNGV ^{Y+45} YQGG ^{Y+45} SK ³⁸²	2100.87	2101.02	701.35 (3+)	74	22.0
	53	0	0	Y380	³⁶⁵ CHAGHLNGVYYQGG ^{Y+45} SK ³⁸²	2055.89	2056.02	515.01 (4+)	68	20.8
	22	-	3	Y389	³⁸³ ASTPNG ^{Y+45} DNGIHWATWK ³⁹⁹	1937.89	1938.04	970.03 (2+)	108	34.1

^a Los números en superíndice indican la posición del residuo al comienzo y al final de la secuencia. El residuo de tirosina modificado se muestra en rojo.

^b Las masas teóricas se calculan a partir de la secuencia de péptidos.

^c Las masas observadas se calculan a partir de la relación m/z del ion observado en el espectro de masas.

^d El puntaje de ion es el puntaje promedio Mascot MOWSE para los péptidos individuales.

^e Rt es el tiempo de retención del péptido durante la cromatografía.

^f La cuantificación relativa del péptido nitrado se calculó como un porcentaje del péptido total de esa secuencia (nitrado + no modificado).

– indica una posición de la tirosina no cubierta.

Tabla 3.2. Péptidos tripticos de Fibrinógeno seleccionados para el análisis MRM y SRM.

Cadena	Posición de Tirosina	Secuencia del péptido de Fg ^a	Ion precursor m/z (carga)	Masa del ion producto (serie)	Energía de colisión (volts)	Rt (min)
Aα	Y62	⁴⁹ DSDWPFCSDEDWNYK ⁶³	982.45 (2+)	424.25 (y3) ^b 610.35 (y4) 1216.57 (y9)	47.14	34.6
		⁴⁹ DSDWPFCSDEDWNY ⁴⁵ K ⁶³	1004.95 (2+)	318.12 (b3) 655.34 (y4) 1101.51 (y8)	48.24	36.7
	Y277	²⁷² GGSTSYGTGSETESPR ²⁸⁷	786.90 (2+)	862.45 (y8) 1020.54 (y10) 1183.62 (y11)	37.56	18.3
		²⁷² GGSTSY ⁴⁵ GTGSETESPR ²⁸⁷	809.40 (2+)	862.45 (y8) 1020.54 (y10) 1228.61 (y11)	38.66	20.8
	Y589	⁵⁸² QFTSSTSYNR ⁵⁹¹	595.81 (2+)	727.39 (y6) 814.43 (y7) 915.49 (y8)	28.19	19.8
		⁵⁸² QFTSSTSY ⁴⁵ NR ⁵⁹¹	618.31 (2+)	772.38 (y6) 859.42 (y7) 960.47 (y8)	29.30	23.0
Bβ	Y71	⁵⁴ EEAPSLRPAPPPISGGGYR ⁷²	651.05 (3+)	596.32 (y6) 806.48 (y8) 903.54 (y9)	29.25	25.2
		⁵⁴ EEAPSLRPAPPPISGGGY ⁴⁵ R ⁷²	666.05 (3+)	641.31 (y6) 833.94 (y ⁺⁺ 16) 851.47 (y8)	29.97	27.0
	Y408	³⁹⁶ TMTIHNGMFFSTYDR ⁴¹⁰	612.98 (3+)	554.30 (y4) 641.34 (y5) 788.42 (y6)	27.42	29.8
		³⁹⁶ TMTIHNGMFFSTY ⁴⁵ DR ⁴¹⁰	627.98 (3+)	599.29 (y4) 686.33 (y5) 833.41 (y6)	28.14	31.9

	Y452	⁴⁴⁶ YYWGGQYTWDMAK ⁴⁵⁸	556.95 (3+)	349.22 (y3) 464.25 (y4) 650.35 (y5)	24.73	32.8
		⁴⁴⁶ YYWGGQ ^{Y+45} TWDMAK ⁴⁵⁸	857.42 (2+)	959.48 (y7) 1144.60 (y9) 1201.60 (y10)	41.01	33.7
	Y475	⁴⁷² GSWYSMR ⁴⁷⁸	443.73 (2+)	393.22 (y3) 556.30 (y4) 742.40 (y5)	20.74	26.2
		⁴⁷² GSW ^{Y+45} SMR ⁴⁷⁸	466.22 (2+)	393.22 (y3) 601.29 (y4) 787.38 (y5)	21.85	29.5
Y	Y380	³⁶⁵ CHAGHLNGVYYQGGTYSK ³⁸²	671.35 (3+)	424.22 (b⁺⁺8) 612.35 (y6) 1066.57 (y9)	30.23	21.7
		³⁶⁵ CHAGHLNGVYYQGGT ^{Y+45} SK ³⁸²	515.01 (4+)	424.22 (b ⁺⁺ 8) 657.34 (y6) 946.50 (b9)	23.75	23.4
	Y389	³⁸³ ASTPNGYDNGIHWATWK ³⁹⁹	632.02 (3+)	505.32 (y4) 691.42 (y5) 804.51 (y6)	28.34	33.9
		³⁸³ ASTPNG ^{Y+45} DNGIHWATWK ³⁹⁹	970.03 (2+)	434.27 (y3) 691.41 (y5) 840.47 (y⁺⁺14)	46.53	35.7

^a Los números en superíndice corresponden a la posición del aminoácido en la proteína madura para los residuos de inicio y fin. Los residuos modificados se muestran en rojo.

^b Las transiciones mostradas en negrita fueron seleccionadas para el método SRM.

El método MRM se evaluó con Fg-NO₂Tyr1 y Fg comercial como control negativo. Todos los residuos seleccionados fueron encontrados en el Fg nitrado, y no se encontró ninguno en el Fg comercial. Dado que la búsqueda de 3 iones producto por cada péptido precursor resultaba muy costosa en términos de tiempo, se desarrolló el método SRM, utilizando los mismos iones precursores, y solo una transición (la de mayor intensidad). La Figura 3.2 muestra un ejemplo de XICs obtenidos en modo MRM y SRM para un péptido particular.

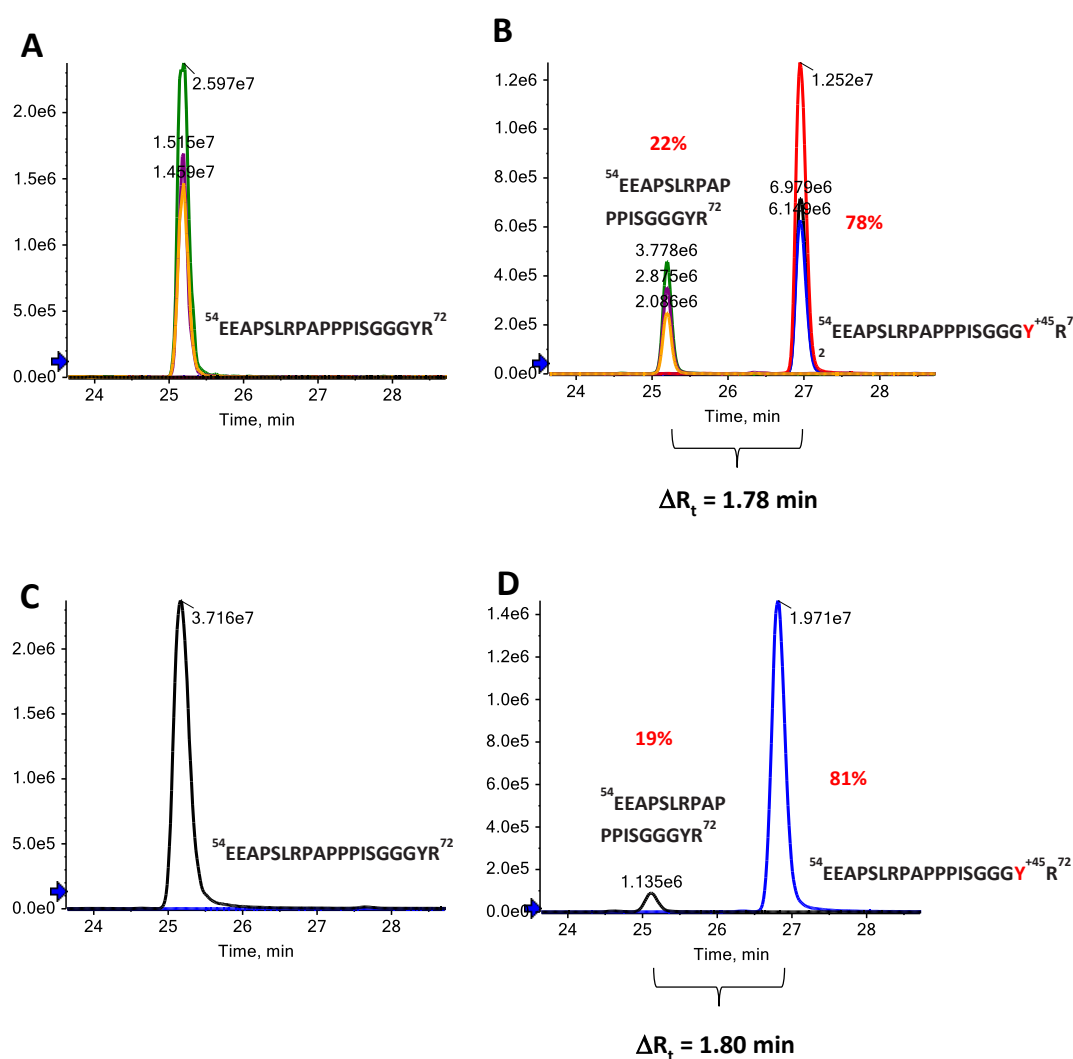


Figura 3.2. Comparación de los análisis MRM y SRM del péptido β^{54} EEAPSLRPAPPPISGGGYR⁷² del fibrinógeno nitrado *in vitro*. Cromatogramas de iones extraídos del péptido β^{54} EEAPSLRPAPPPISGGGYR⁷² que contiene el residuo de tirosina 71, obtenidos mediante análisis MRM del péptido de fibrinógeno no tratado (A) y nitrado (B); y los obtenidos mediante análisis SRM de fibrinógeno no tratado (C) y nitrado (D). Se muestran las áreas bajo las curvas de las transiciones seleccionadas (que en A y B son 3, y en C y D es una), y el porcentaje relativo calculado de cada péptido. Se observó un ligero desplazamiento en el tiempo de retención (ΔR_t) absoluto debido a la variación cromatográfica entre los experimentos (se muestra la diferencia en los tiempos de retención entre el péptido nativo y el modificado).

2.2. Cuantificación de Fibrinógeno Nitrado en plasma con método LC-MS/MS

Se realizó la cuantificación de nitración en Fg de pacientes con ACVi comparando con controles mediante método LC-MS/MS en modo SRM desarrollado.

El método SRM desarrollado se aplicó para analizar Fg enriquecido de muestras de plasma pertenecientes a dos grupos clínicos: pacientes con ACVi y pacientes de control no inflamatorio. Para cada muestra, se calcularon los porcentajes de NO₂Tyr para cada una de las posiciones de Tyr seleccionadas detectadas. Se compararon estadísticamente los niveles medios de nitración en cada uno de los residuos de Tyr, en ambos grupos clínicos. Una prueba de Kolmogorov-Smirnov rechazó la distribución gaussiana de los datos resultantes, y luego se utilizó una prueba de Mann-Whitney U para comparar los dos grupos clínicos entre sí (n = 24 en cada grupo). La Figura 3.3 muestra boxplots para cada residuo de Tyr analizado, comparando los dos grupos.

Al comparar los grupos de pacientes con ACVi y los pacientes de control no inflamatorio, se encontró una diferencia significativa para tres residuos específicos de tirosina: β Tyr⁴⁵², β Tyr⁴⁷⁵ y γ Tyr³⁸⁰. Para los residuos de tirosina β Tyr⁴⁵² y β Tyr⁴⁷⁵, los porcentajes de NO₂Tyr observados en las muestras del grupo de control no inflamatorio fueron muy bajos, similares a los observados para las muestras de Fg no modificado. Aunque se observó cierta nitración en el residuo γ Tyr³⁸⁰ en las muestras del grupo control, se demostró un nivel significativamente más alto en el grupo de ACVi. Los residuos de tirosina α Tyr⁶², α Tyr⁵⁸⁹ y γ Tyr³⁸⁹ no mostraron diferencias entre los grupos de ACVi y control, con niveles de nitración similares a las muestras de Fg no tratado. Para los residuos α Tyr⁶² y γ Tyr³⁸⁹, los niveles de nitración fueron bajos, excepto en algunas muestras. Para el residuo de tirosina α Tyr⁵⁸⁹ y β Tyr⁴⁰⁸, hubo un alto background, lo que probablemente indica interferencia de la matriz.

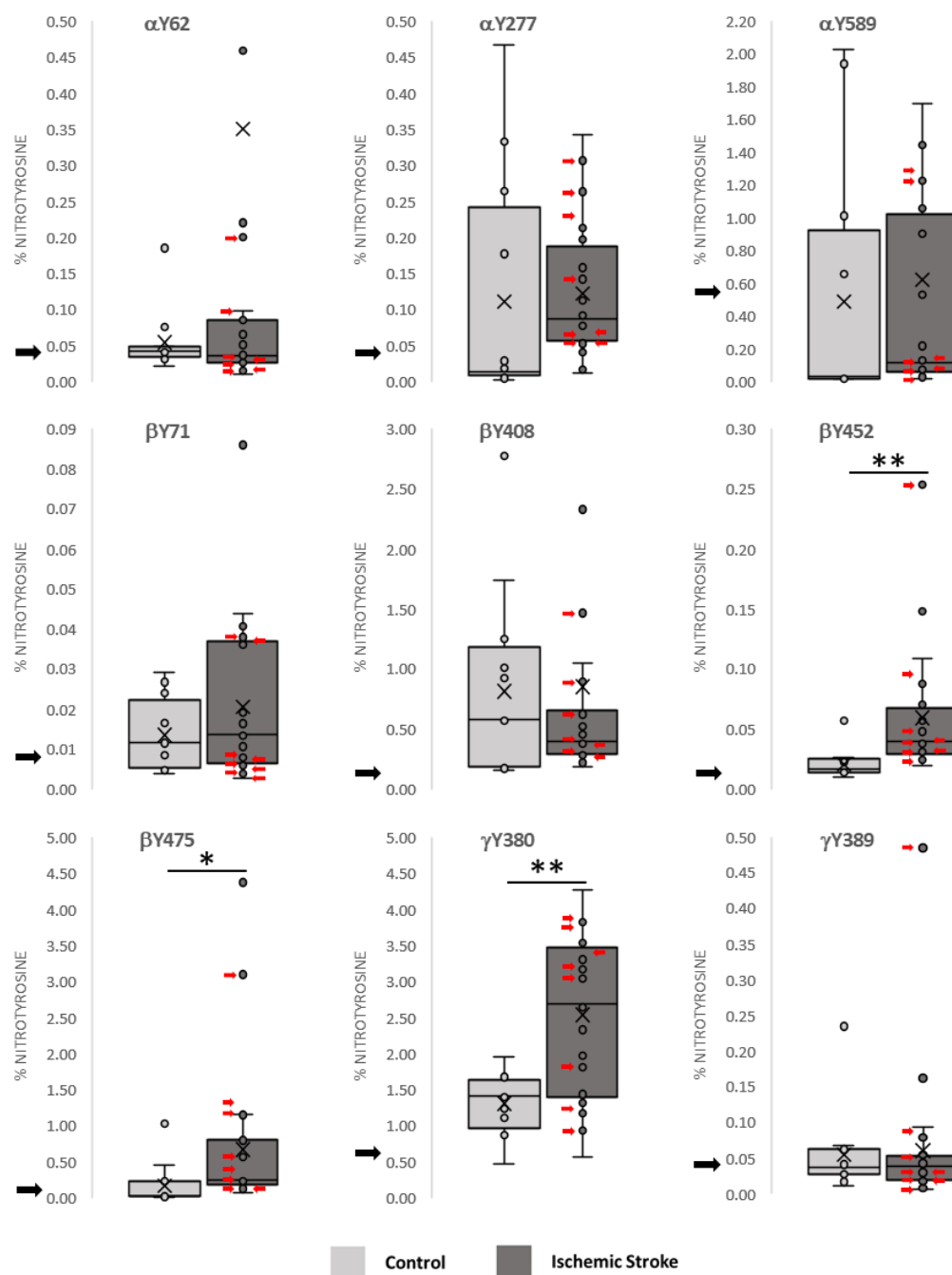


Figura 1.3. Boxplots del porcentaje de nitración para cada residuo de tirosina estudiado, en las muestras clínicas. Los boxplots comparan pacientes con ACVi (Ischemic Stroke) e individuos controles (Control) para todos los residuos de tirosina analizados. La cadena de fibrinógeno de origen se indica con un prefijo α , β or γ antes del número del residuo de Tyr (Y). Los asteriscos indican los valores P arrojados por el test de Mann-Whitney U en los casos que se obtuvo una diferencia significativa: * $p < 0.003$, ** $p < 0.001$. Para mayor claridad, tres puntos de datos no se muestran en los gráficos, todos en el grupo ACVi (6.7 % en $\alpha Y62$, 5.4 % en $\alpha Y589$ and 7.5 % en $\beta Y408$; pacientes fumadores). Las flechas negras en los ejes y señalan el valor medio del fibrinógeno no tratado. Las flechas rojas indican datos de pacientes fumadores. El rectángulo central abarca desde el primer cuartil hasta el tercer cuartil (el rango intercuartil), un segmento dentro del rectángulo muestra la mediana, la cruz muestra la media y los "bigotes" por encima y por debajo de la caja muestran las ubicaciones del mínimo y máximo. Los valores atípicos fueron excluidos en la figura para una mejor presentación, pero se incluyeron en el análisis estadístico.

Con el fin de explorar cualquier asociación potencial entre los residuos de NO₂Tyr detectados y la condición de ACVi, se generaron curvas de características operativas del receptor (ROC) para evaluar la capacidad de cada posición de NO₂Tyr para predecir el ACVi, ya sea de manera individual o en diferentes combinaciones. La presencia de NO₂Tyr en la posición β Tyr⁴⁵² mostró la mejor asociación con la enfermedad, con el mayor área bajo la curva (AUC) de 0.920 (95 % CI: 0.807 a 1.034). En cambio, no se observó asociación para los residuos α Tyr⁶², β Tyr⁷¹, β Tyr⁴⁰⁸ y γ Tyr³⁸⁹. Además, se investigó la asociación entre el ACVi y diferentes combinaciones de posiciones de NO₂Tyr. Los mejores resultados se observaron cuando se combinaron β Tyr⁴⁵², β Tyr⁴⁷⁵ y γ Tyr³⁸⁰, con un AUC de 0.896 (95 % CI: 0.790 a 1.002), ligeramente superior al AUC obtenido cuando γ Tyr³⁸⁰ se combinó ya sea con β Tyr⁴⁵² o β Tyr⁴⁷⁵.

Por último, se comparó el patrón de nitración de los residuos de Tyr seleccionados, cuando la nitración fue realizada *in vivo* (ACVi), *ex vivo* (plasma nitrado) e *in vitro* (Fg nitrado). Se observó que el perfil de nitración *in vivo* difiere del *in vitro* o *ex vivo*. El residuo más nitrado *in vivo* fue el γ Tyr³⁸⁰ que contribuyó en aprox. la mitad de la nitración total, seguido del β Tyr⁴⁰⁸ con un aprox. 20%. En contraste, las condiciones *in vitro* generan una distribución más homogénea de la nitración, dentro de esos nueve residuos seleccionados. Por otro lado, comparando la nitración *ex vivo* con la *in vitro*, aquella presenta como sitios más nitrados el α Tyr⁵⁸⁹ y el γ Tyr³⁸⁹, mientras que *in vitro* las más nitradas fueron los tres residuos de Tyr de la cadena A α .

Los detalles de todos los resultados relativos a este Capítulo, incluidos las curvas ROC y los perfiles de nitración se encuentran publicados en Medeiros *et al.*^[184]

3. Discusión

El enfoque de este Capítulo fue la identificación y cuantificación de sitios de modificación en el Fg humano generados *in vitro* después del tratamiento con ONOO⁻, y generados *in vivo* después de un ACVi. El objetivo era identificar modificaciones estables en los péptidos del Fg que pudieran ser buenos marcadores potenciales de isquemia e inflamación. La hipótesis era que se pueden identificar de manera consistente modificaciones nitroxidativas específicas de secuencia y dependientes de la concentración, similares a las que podrían esperarse durante un ACVi, en el Fg humano después del tratamiento con ONOO⁻.

Aunque se cree que la producción de ONOO^- y la formación de NO_2Tyr ocurren en el ACVi,^[153] hasta el momento no se han realizado estudios que investiguen la nitración de residuos específicos de Tyr del Fg en esta condición ni su valor como marcador diagnóstico. Por lo tanto, en este estudio primero se mapearon los sitios de formación de NO_2Tyr en Fg tratado con ONOO^- *in vitro* utilizando LC-MS/MS, y se demostró que a una relación molar de 200:1 ONOO^- :Fg, 20 de los 49 residuos de Tyr observados fueron modificados. En términos del número de sitios modificados y porcentaje de NO_2Tyr por péptido, fue generalmente menor con las relaciones de tratamiento más bajas. El análisis identificó 7 sitios de nitración de Tyr que no han sido reportados previamente: αTyr^{62} , αTyr^{222} , βTyr^{315} , βTyr^{375} , γTyr^{288} , γTyr^{375} y γTyr^{380} . Luego se desarrollaron métodos dirigidos para detectar la nitración de los residuos más susceptibles (MRM y SRM), y se aplicó el método SRM al Fg enriquecido de muestras de plasma de pacientes con ACVi, y de pacientes con condiciones no inflamatorias según los bajos niveles de PCR. Con este método se pudo proporcionar la primera evidencia que demuestra que el porcentaje de nitración de Tyr en Fg aumenta en las primeras 36 horas del ACVi, en comparación con condiciones no isquémicas y no inflamatorias, y que la nitración de residuos específicos o combinaciones de residuos puede tener potencial como herramienta diagnóstica. El análisis de la nitración de Fg *in vitro* y la comparación con la nitración bajo condiciones fisiopatológicas proporciona algunas perspectivas científicas interesantes.

El mapeo de la nitración de Tyr en Fg tratado *in vitro* se llevó a cabo utilizando un enfoque no dirigido de LC-MS/MS, lo que permitió investigar la susceptibilidad dependiente de la concentración de ONOO^- de las diferentes cadenas y de los residuos dentro de ellas a la nitración de Tyr. Hasta donde podemos determinar, este es el primer estudio que cuantifica como porcentaje de modificación el nivel de nitración en péptidos específicos de Fg utilizando XICs de un enfoque de LC-MS/MS IDA. La dependencia de la concentración de nitración de Fg por ONOO^- en relaciones molares de 1.7:1 a 170:1 ha sido reportada previamente por Nowak *et al.*^[199] utilizando WB con anticuerpos policlonales anti- NO_2Tyr , y también observaron una alta susceptibilidad de los residuos de Tyr de la cadena A α a la modificación. Tres estudios previos utilizaron LC-MS/MS para investigar la nitración de Fg. Meredith *et al.* informaron que Tyr^{277} en la cadena A α y Tyr^{135} en la cadena γ eran los residuos de Tyr más susceptibles a la nitración por SIN-1 (3-morfolinosisidnonimina, un generador de ONOO^-), aunque no se reportaron valores de porcentaje de nitración. El residuo αTyr^{277} también fue el más altamente modificado en nuestro estudio, pero γTyr^{135} fue modestamente nitrado en un

14% para el tratamiento más alto. Luo *et al.* identificaron 15 sitios de NO₂Tyr en la cadena γ de los cuales Tyr¹²², Tyr²⁸⁸, Tyr³⁰⁰, Tyr³⁷⁴ y Tyr³⁸⁹ fueron los más susceptibles, pero no cuantificaron el grado de modificación en residuos específicos.^[156] Tang *et al.* utilizaron una relación molar de ONOO⁻:Fg de ~330, y reportaron siete residuos de Tyr nitrados en la cadena A α (dos de ellos en la isoforma menos común), diez sitios de NO₂Tyr en la cadena B β y nueve en la cadena γ , de los cuales α Tyr²⁷⁷, β Tyr⁷¹, β Tyr¹⁷², β Tyr¹⁸², γ Tyr¹³⁵ y γ Tyr³⁸⁹ fueron los más nitrados.^[157] Este estudio no utilizó la intensidad de señal MS primaria para calcular el grado de nitración de péptidos, sino que reportó el número de espectros MS/MS identificados para los péptidos nitrados o nativos utilizando el algoritmo SEQUEST, aparentemente sin secuenciación *de novo*. Esto, junto con la mayor proporción de ONOO⁻ que utilizaron, puede haber contribuido a un mayor número de posiciones nitradas reportadas en comparación con nuestros hallazgos. Un tercer estudio utilizó la captura de afinidad de Fg nitrado y sus péptidos trípticos para enriquecer péptidos nitrados, lo que llevó a un enfoque en la cadena B β , donde se detectaron consistentemente 2 residuos diferentes, β Tyr³²² y β Tyr⁴⁵².^[150] Sin embargo, el uso de la captura de péptidos significó que no se pudo determinar el porcentaje de modificación de estos péptidos.

Aunque la nitración de Tyr pudo detectarse en la relación de tratamiento más baja con ONOO⁻, no se detectó NO₂Tyr en Fg de muestras clínicas mediante el enfoque no dirigido, lo que probablemente refleje el bajo porcentaje de modificación presente. Para abordar esta limitación, otros autores emplearon un paso de captura con anticuerpos contra NO₂Tyr,^[150,150200,201] o HPLC de intercambio catiónico^[202] para el enriquecimiento de proteínas o péptidos nitrados antes del análisis de LC-MS/MS, pero, como se mencionó anteriormente, esto puede introducir sesgos. En contraste, en el presente trabajo se utilizó un análisis dirigido de MS/MS para mejorar la sensibilidad, incluyendo transiciones para detectar modificaciones observadas en el tratamiento más bajo con ONOO⁻ (Tyr⁶² de la cadena α , Tyr⁷¹, Tyr⁴⁰⁸ y Tyr⁴⁷⁵ de la cadena β , y Tyr³⁸⁹ de la cadena γ) así como otras que fueron consistentemente nitradas (Tyr²⁷⁷ y Tyr⁵⁸⁹ de la cadena α , Tyr⁴⁵² de la cadena β y Tyr³⁸⁰ de la cadena γ). Este método SRM permitió la detección de residuos de NO₂Tyr en muestras de Fg nitradas con ONOO⁻ y en muestras clínicas, y no en las muestras de Fg sin tratar. Para tres de los residuos de Tyr analizados (Tyr⁴⁵² e Tyr⁴⁷⁵ en la cadena β y Tyr³⁸⁰ en la cadena γ), se observó un nivel de nitración relativo significativamente mayor en Fg de plasma de pacientes con ACVi en comparación con Fg de plasma de pacientes con condiciones no inflamatorias. Es interesante

que el grupo de ACVi contuviera algunas muestras con un porcentaje de nitración alto para la mayoría de los residuos de Tyr analizados; aunque aparecían como valores atípicos y no eran estadísticamente relevantes, podrían reflejar un subconjunto de pacientes más gravemente afectados que podrían explorarse más a fondo en un conjunto de muestras más grande.

El análisis de curvas ROC sugirió claramente una asociación entre la nitración de residuos específicos de Tyr (βTyr^{452} ; $\beta\text{Tyr}^{452}+\beta\text{Tyr}^{475}+\gamma\text{Tyr}^{380}$; $\beta\text{Tyr}^{452}+\gamma\text{Tyr}^{380}$; $\beta\text{Tyr}^{475}+\gamma\text{Tyr}^{380}$) y la cohorte de ACVi. Esto respaldaría la hipótesis de que el Fg es un objetivo de nitración durante el ACVi, y concuerda con hallazgos previos que indican que la nitración del Fg afecta la polimerización del Fg, la arquitectura del coágulo y las propiedades físicas tanto *in vitro*^[144] como *in vivo*.^[150]

La ubicación de NO_2Tyr en el Fg también ha sido analizada en otras condiciones patológicas. Parastatidis *et al.* realizaron un análisis LC-MS/MS de Fg nitrado en fumadores y no fumadores; el paso de inmunoenriquecimiento para péptidos nitrados resultó en la detección principalmente de péptidos de la cadena β , con βTyr^{322} y βTyr^{452} reportados como los principales sitios de nitración.^[150] Curiosamente, aunque la βTyr^{452} nitrada fue un predictor importante de ACVi en nuestro estudio, no estuvo muy nitrada *in vitro*. También observamos un péptido que contiene βTyr^{322} en el análisis no dirigido de Fg tratado con ONOO^- , pero el sitio de nitración fue βTyr^{315} . Esta diferencia puede reflejar el enfoque metodológico distinto, la patología diferente de la cohorte estudiada, o que las reacciones nitroxidativas que ocurren *in vivo* difieren de las que ocurren *in vitro*. Como ya se comentó, *in vivo*, el ONOO^- no es el único agente nitrante, estando presente otros capaces de producir NO_2Tyr como NO^* , NO_2^* , HNO_2 y NO_2Cl . Otro estudio que utilizó IP informó que la cadena $\text{B}\beta$ del Fg tendía a presentar reactividad positiva a anticuerpos policlonales anti- NO_2Tyr en pacientes con síndrome de ARD.^[145] Estos hallazgos pueden explicarse por el hecho de que la cadena $\text{B}\beta$ contiene más residuos Tyr que las otras dos cadenas, por lo que hay más sitios posibles de nitración, pero también respalda nuestra observación de que dos de los tres residuos de Tyr con mayor porcentaje de nitración en el ACVi provenían de la cadena $\text{B}\beta$. Un análisis de los objetivos de nitración plasmática en la enfermedad renal crónica en etapa terminal, una condición que exhibe altos niveles de inflamación y estrés nitroxidativo, encontró que las tres cadenas del Fg estaban nitradas junto con varias otras proteínas plasmáticas, pero no mapeó las ubicaciones de los residuos de NO_2Tyr .^[147]

Si bien los datos discutidos anteriormente muestran que los residuos de Tyr seleccionados para el análisis fueron indicadores útiles de nitración en pacientes con ACVi (nitración *in vivo*), descubrimos que el perfil de nitración de residuos (el porcentaje de contribución de residuos específicos a la nitración total del Fg) fue bastante diferente para el Fg nitrado *in vitro* o *ex vivo*. En particular, unos pocos residuos específicos de NO₂Tyr (γ Tyr³⁸⁰, β Tyr⁴⁰⁸ y α Tyr⁵⁸⁹) predominaron *in vivo*, mientras que la distribución de la nitración *in vitro* fue más homogénea. Hay varias razones posibles por las cuales el perfil de nitración puede ser diferente. Como se mencionó anteriormente, los tratamientos de Fg y plasma *in vitro* utilizaron un buffer de bicarbonato, lo que conduce a la formación del anión peroxinitrosocarbonato y altera el perfil de PTMs nitrooxidativas. Se considera que esta concentración de bicarbonato genera niveles fisiológicos de CO₂,^[203] por lo tanto, no debería, por sí misma, explicar las diferencias con las muestras clínicas. No obstante, sería de interés realizar experimentos *in vitro* sin bicarbonato para determinar si esto resulta en un perfil de nitración similar a los hallazgos *in vivo*. Alternativamente, *in vivo*, diferentes agentes podrían ser responsables de la nitración, como el ácido peroxinitroso y las hemo peroxidasas; además, la concentración de proteínas es mayor y otras proteínas pueden competir por la nitración. Las modificaciones dominantes *in vivo* fueron aquellas que dieron un alto porcentaje de modificación *in vitro*, lo que sugiere que son más susceptibles. Otra posible causa del patrón diferencial de nitración es que la formación continua de agentes nitrantes en dosis bajas puede tener una acción diferente a un tratamiento en bolo, y el entorno local (pH, antioxidantes, competencia) así como el estado conformacional de la proteína también pueden influir en la selectividad de la nitración. Cualquiera sea la razón subyacente, esto ilustra la dificultad de reproducir el entorno nitrooxidativo fisiológico *in vitro*, y señala la necesidad de tener precaución al extrapolar datos obtenidos *in vitro* a situaciones fisiopatológicas, inclusive para el diseño analítico. Por lo tanto, una posible limitación de este estudio es que el método MS/MS dirigido se basó en residuos de Tyr observados como nitrados *in vitro*; aunque estos demostraron diferencias significativas en el ACVi, es posible que otros residuos hayan sido más extensamente modificados o hayan tenido mayor poder discriminatorio.

Una diferencia importante en el presente estudio, en comparación con la mayoría de los otros que investigan patologías relacionadas con el estrés nitrooxidativo, incluyendo la demostración mediante inmunoensayo del aumento de NO₂Tyr-Fg en el plasma de pacientes con ACVi,^[153] es que nuestro grupo control son pacientes con condiciones patológicas no inflamatorias. Esto es importante, ya que la comparación con una cohorte de voluntarios sanos probablemente

llevaría a una sobreestimación de las diferencias; además, no proporciona información sobre el valor diagnóstico de un marcador para una enfermedad específica. El hecho de que en este estudio la cohorte de control no sea un grupo sano puede explicar al menos parcialmente por qué la NO₂Tyr en βTyr⁴⁰⁸ mostró valores más dispersos en comparación con el grupo ACVi. Por otro lado, el nivel de nitración en las muestras clínicas podría depender en gran medida del tiempo transcurrido entre el evento isquémico y la toma de muestras de sangre, por lo que es interesante que se observaran diferencias en una etapa relativamente temprana (1–36 h después de los primeros síntomas), que es el período en el que el diagnóstico diferencial sería más útil. Finalmente, debido al uso de pacientes con condiciones no inflamatorias, fue difícil emparejar perfectamente algunos parámetros; específicamente, la edad, el tabaquismo y el consumo de alcohol. Estos podrían ser factores confundentes contribuyendo a las diferencias en los niveles de NO₂Tyr, aunque no hubo evidencia de que el Fg de los fumadores dentro de la cohorte de ACVi se agrupara en niveles altos de NO₂Tyr. Por lo tanto, es posible que exista una asociación entre los niveles elevados de NO₂Tyr y el ACVi.

4. Conclusión

Este es el primer estudio en investigar la presencia de NO₂Tyr-Fg en las primeras etapas del ACVi, y en utilizar un enfoque dirigido de LC-MS/MS para mostrar el aumento de nitración de residuos específicos de Tyr en una cohorte de ACVi en comparación con una con patología no inflamatoria. Los datos sugieren que el NO₂Tyr-Fg puede ser un biomarcador de procesos isquémicos agudos que podría ayudar con un diagnóstico específico y más temprano del ACVi. Sin embargo, se necesita más trabajo con un conjunto de muestras más grande y una cohorte de enfermedad no inflamatoria mejor emparejada, incluyendo fumadores, para confirmar esto y explorar el valor diagnóstico de ubicaciones adicionales de NO₂Tyr. Los diferentes perfiles de nitración de Tyr observados enfatizan el potencial del mapeo de NO₂Tyr para distinguir entre diferentes condiciones experimentales, fisiológicas o patológicas, pero también señalan la necesidad de tener cautela al extrapolar resultados *in vitro*, así como de tener estándares de Fg nitrado que se asemejen a las circunstancias fisiológicas. Para la cuantificación absoluta de NO₂Tyr, se necesitarían péptidos nitrados y nativos etiquetados isotópicamente. A pesar del enorme desafío que representa la cuantificación de residuos específicos de NO₂Tyr, herramientas más específicas podrían, en última instancia, reducir la mortalidad, los déficits neurológicos y el daño sistémico asociados con el diagnóstico tardío.^[204]

Capítulo 4: Análisis de 3-Nitrotirosina en Plasma mediante ELISA

1. Introducción

1.1. Fundamentos de ELISAs

Aunque los enfoques de MS son capaces de proporcionar información muy detallada sobre las proteínas nitradas, son complejos y requieren mucho tiempo para llevarse a cabo, y por estas razones los enfoques basados en anticuerpos para medir la nitración de proteínas son mucho más populares. El ELISA es un tipo bien establecido de inmunoensayo que tiene muchas aplicaciones, incluida la detección de proteínas modificadas. El ensayo se basa en anticuerpos conjugados a una enzima que se unen por fuerzas no enlazantes a un antígeno, y la cuantificación de la reacción enzima-sustrato respectiva se logra frecuentemente mediante espectrofotometría. La adición del sustrato provoca una reacción mensurable, cuya magnitud es proporcional a la cantidad de antígeno unido a la placa.^[205,206]

Brevemente, existen cuatro variaciones de los inmunoensayos tipo ELISAs. (1) Los ELISAs directos implican la unión del antígeno a la fase sólida, seguido por un anticuerpo marcado con una enzima. Este tipo de ensayo generalmente dificulta la medición de muestras complejas, ya que las proteínas contaminantes compiten por los sitios de unión al plástico. (2) Los ELISAs indirectos también implican la unión del antígeno a la fase sólida, pero en este caso, el anticuerpo primario no está marcado. Luego se añade un segundo anticuerpo conjugado con una enzima, dirigido al primer anticuerpo. Este formato se usa con mayor frecuencia para la detección de anticuerpos específicos en sueros. (3) Un tercer tipo de ELISA es el ensayo de competencia o inhibición, que implica la adición simultánea de anticuerpos o proteínas “competidores”. La disminución de la señal en las muestras donde se añade el segundo anticuerpo o proteína da un resultado altamente específico. (4) El último tipo de ensayo es el ELISA sándwich o de captura. Los ELISAs sándwich implican la unión de un anticuerpo de captura a un soporte de fase sólida. Luego se añaden muestras que contienen antígeno conocido o desconocido en una matriz o tampón que minimizará la unión a la fase sólida. Luego se añade un anticuerpo marcado con una enzima para la detección. El ELISA sándwich es el método que proporciona los resultados más específicos y sensibles para antígenos encontrados en concentraciones muy bajas.^[207,208]

1.2. Consideraciones de los Inmunoensayos para Analizar Proteínas Modificadas

Los inmunoensayos, al igual que todos los ensayos, tienen ventajas y desventajas, la mayoría de las cuales dependen de la especificidad de los anticuerpos utilizados. Hay disponibles

anticuerpos dirigidos a una variedad de residuos que contienen modificaciones, incluyendo anti-NO₂Tyr. Los anticuerpos son conocidos por su capacidad de reaccionar cruzadamente con compuestos que son estructuralmente similares a su analito/molécula objetivo. A medida que el tamaño del analito/molécula objetivo disminuye, aumenta la probabilidad de reactividad cruzada. Esto es relevante al considerar péptidos pequeños y residuos de aminoácidos modificados, ya que se consideran moléculas pequeñas. Moléculas de bajo peso molecular (<1000 kDa), como péptidos y aminoácidos modificados, no pueden provocar una respuesta inmune por sí mismas. Por lo tanto, requieren la modificación mediante su unión a portadores más grandes como proteínas completas. Un portador común es la KLH, que está filogenéticamente alejada de las proteínas de mamíferos y, por lo tanto, puede conjugarse a una molécula de bajo PM para aumentar su masa e inmunogenicidad.^[209] Un estudio realizado por Franze *et al.* produjo 6 anticuerpos con alta afinidad por la NO₂Tyr, todos los cuales utilizaron una proteína portadora para mejorar la inmunogenicidad, y se probaron en su capacidad para detectar proteínas nitradas en inmunoensayos como ELISA.^[210] El anticuerpo monoclonal 1A6 complementario de la NO₂Tyr está bien caracterizado y disponible comercialmente. Sin embargo, no está claro si este anticuerpo reconoce todas las proteínas que contienen residuos de Tyr nitrados. Ese estudio destacó el efecto de la adsorción competitiva de la proteína nativa en ensayos inmunoquímicos directos, donde la proporción de proteína nativa suele ser mayor que la modificada, y la capacidad limitada de unión a la placa puede saturarse antes de que se una toda la proteína. Por lo tanto, es difícil obtener una representación precisa de la proporción de NO₂Tyr en una muestra. Una forma de evitar este problema es utilizar el ensayo de sándwich, que evita este efecto y se cree que puede detectar cantidades mínimas de proteína nitrada en muestras, incluso en presencia de un exceso alto de proteína nativa. La naturaleza del ELISA de sándwich significa que la proteína nitrada se captura exclusivamente de la muestra en la placa antes de añadir el anticuerpo detector. Además, parece que las afinidades de los anticuerpos por las proteínas nitradas no solo están gobernadas por el número de residuos de NO₂Tyr por molécula de proteína, sino también por su posición en la estructura, con sitios de unión más o menos favorables.

Otra consideración importante que resalta la naturaleza cruzada de muchos anticuerpos disponibles comercialmente es cómo las técnicas tipo inmunoensayo muestran variabilidad entre muestras de laboratorio. Esto es cierto tanto para la especificidad de los anticuerpos como para las variaciones en la afinidad de los anticuerpos.^[211] También deben considerarse múltiples otros factores al comparar resultados entre laboratorios; por ejemplo, la afinidad entre

el anticuerpo y la placa de microtitulación, dado que existen variaciones significativas entre tipos de placas.^[212]

Cuando se consideran mezclas de proteínas, el ELISA es como máximo semicuantitativo. Esto se relaciona con la conformación de la proteína y la capacidad de un anticuerpo dado para acceder y unirse al epítipo de interés, lo cual puede verse afectado por el entorno molecular, como el pH. Tanto el estudio realizado por Khan *et al.* como el de Duncan señalaron que una baja especificidad anticuerpo-antígeno conduce a datos deficientes, y que los anticuerpos complementarios a la NO₂Tyr muestran variaciones en su especificidad, dependiendo de los aminoácidos adyacentes al residuo de NO₂Tyr.^[143,213]

1.3. Factores de Riesgo Cardiovascular

Un factor de riesgo es cualquier característica, condición o comportamiento que aumenta la probabilidad de que una persona desarrolle una enfermedad o sufra un evento adverso en salud, como un ataque cardíaco, cáncer o ACVi. Los factores de riesgo pueden ser modificables, como el tabaquismo, la mala alimentación y el sedentarismo, o no modificables, como la edad, el sexo y la genética. Identificar y controlar los factores de riesgo es clave en la prevención y manejo de enfermedades. Los FRC convencionales y modificables para el ACVi incluyen HTA, dislipidemia, DM, tabaquismo y arritmias (particularmente fibrilación auricular).^[214] Los FRC no modificables incluyen antecedentes familiares y personales de ACVi, edad avanzada y sexo masculino, existiendo una acción sinérgica entre todos ellos.^[215] También existen asociaciones entre la presencia de FRC y parámetros bioquímicos alterados como la PCR y el Fg en pacientes que han sufrido un ACVi.^[216]

En este Capítulo se involucra el estudio de la presencia de FRC como potenciales influyentes en los resultados de concentración de NO₂Tyr en el plasma de pacientes con ACVi, obtenidos mediante ELISA, y evaluando su rol como posibles variables confundentes al comparar con los datos del grupo control.

2. Resultados

2.1. Desarrollo de métodos ELISA

2.1.1. *Producción de estándares de Fg-NO₂Tyr e inmunoglobulinas de conejo anti-Fg*

Para la preparación Fg-NO₂Tyr1, la presencia de residuos de NO₂Tyr se confirmó mediante WB con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-NO₂Tyr biotinilado, observando señales en las tres bandas correspondientes a las cadenas de la molécula de Fg. También se realizó WB de Fg utilizando inmunoglobulinas de conejos inmunizados con Fg como anticuerpo primario, mostrando que reconocen las tres bandas correspondientes a las cadenas del Fg. Imágenes de estos resultados se encuentran en Medeiros et al.^[217]

2.1.2. *ELISA para determinación de Fibrinógeno*

El ELISA de tipo sandwich diseñado para la detección de Fg presentó un Límite de Cuantificación Mínimo (LLOQ) de 0.01 µg/mL. El coeficiente de variación interensayo (CV) fue del 12.5%. La recuperación promedio fue del 90±4%. La Figura 4.1 ilustra el rendimiento de este método, mostrando que el rango de trabajo permanece consistente, siendo independiente de si el Fg capturado presenta o no presenta residuos de NO₂Tyr (también se analizaron diluciones seriadas de Fg-NO₂Tyr1, Fg-NO₂Tyr2 y Fg-NO₂Tyr3).

2.1.3. *ELISA para determinación de 3-Nitrotirosina en Fibrinógeno*

El ELISA de sandwich para la detección de Fg-NO₂Tyr fue utilizado para determinar su presencia en preparaciones de Fg-NO₂Tyr, y los resultados fueron concordantes con los obtenidos por espectrofotometría UV-Vis. Las Figuras 4.2a y 4.2b muestran las curvas de calibración usando los tres estándares de Fg-NO₂Tyr, que presentan comportamientos distintos, con diferentes rendimientos, demostrando que el nivel de nitración en la muestra afecta la cuantificación. También se observó que este sistema no detecta Fg no nitrado, que se utilizó como control negativo, confirmando la especificidad de este método.

Por otro lado, se analizaron diferentes mezclas de Fg nitrado con Fg no nitrado, variando la concentración de ambas preparaciones, pero manteniendo constante la concentración total de proteína, y se compararon con las mismas concentraciones de Fg-NO₂Tyr1 en ausencia de Fg no nitrado (Figura 4.3). Este experimento mostró que el Fg nativo compite con Fg-NO₂Tyr1 por la unión al anticuerpo inmovilizado en la fase sólida, lo que influye en la señal obtenida. Se calculó un LLOQ de 0.5 nM de NO₂Tyr en Fg, en caso de que solo haya Fg-NO₂Tyr en la

muestra, con un rango de trabajo que se extendió a 2.6 nM, lo que hace a un método de alta sensibilidad. El CV interensayo fue del 14%. La recuperación promedio fue del $99\pm5\%$. Aunque el método presentó una buena sensibilidad, cuando se analizaron muestras de plasma no se obtuvieron señales significativas que pudieran interpolarse en la curva de calibración. Se cree que esto se debe al efecto de la compleja matriz del plasma humano.

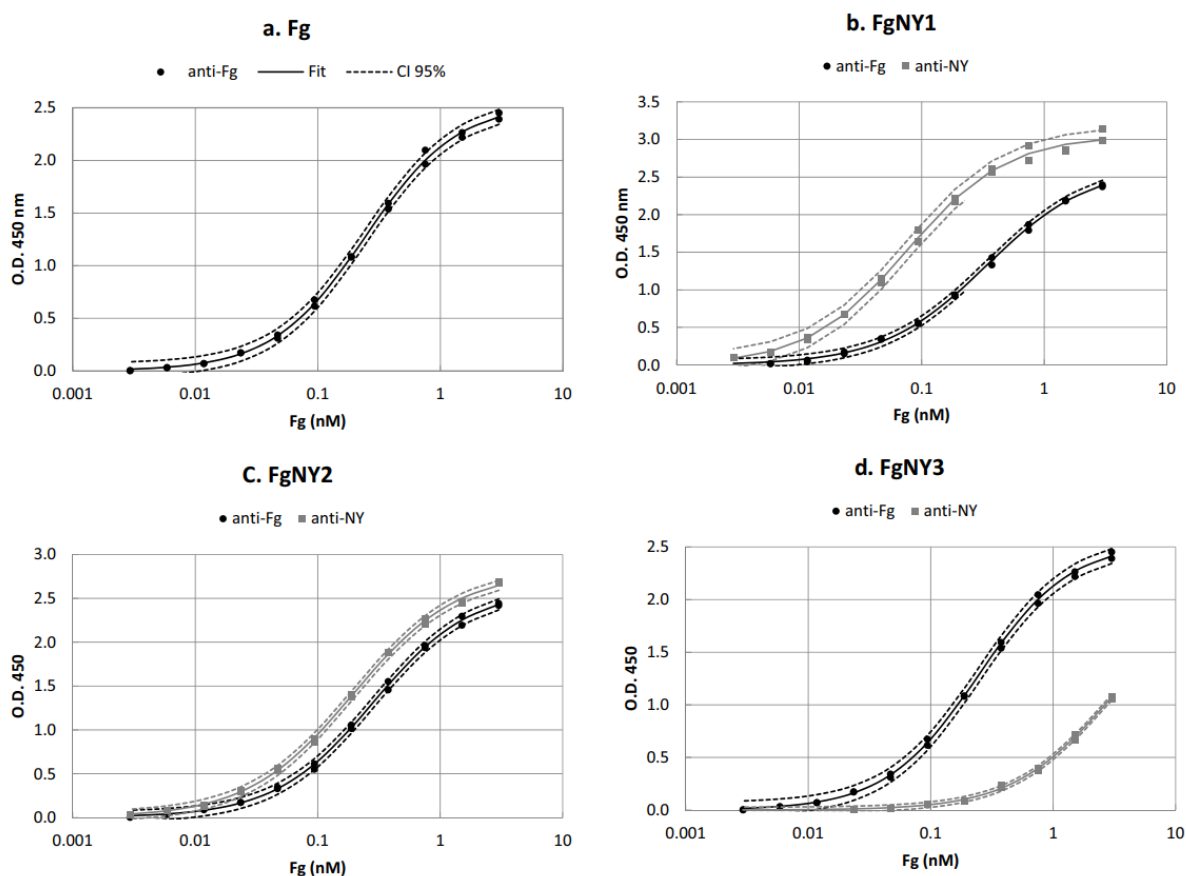


Figura 4.1. Curvas de calibración obtenidas en el ELISA sándwich para la detección de Fibrinógeno. Los gráficos muestran la densidad óptica a 450 nm en función de la cantidad de Fibrinógeno (Fg) añadido al pozo, en nM. Los círculos y cuadrados representan las medias de las DO de triplicados intraensayo. Para evaluar el impacto de la nitración del Fg en la cuantificación, también se generaron curvas de calibración con estándares de Fg nitrado, revelados con un anticuerpo policlonal anti-Fg conjugado con HRP (anti-Fg) y con un anticuerpo monoclonal anti-nitrotirosina biotinilado (anti-NY). **(a)** Fg nativo como estándar con anti-Fg como anticuerpo secundario. Los círculos negros representan los puntos de datos. **(b)** Nivel de Fg nitrado 1 (FgNY1) como estándar, revelado con anti-Fg (círculos negros) y anti-NY (cuadrados grises). **(c)** Nivel de Fg nitrado 2 (FgNY2) como estándar, revelado con anti-Fg (círculos negros) y anti-NY (cuadrados grises). **(d)** Nivel de Fg nitrado 3 (FgNY3) como estándar, revelado con anti-Fg (círculos negros) y anti-NY (cuadrados grises). Las curvas de ajuste sigmoideo se muestran como líneas continuas y el intervalo de confianza del 95% (CI95%) como líneas discontinuas en cada gráfico. Conversión a $\mu\text{g/mL}$ de Fg: $[\text{nM}] \times 340/1000$.

2.1.4. ELISA para determinación de 3-Nitrotirosina total

El ELISA de inhibición diseñado para la determinación de NO_2Tyr total presentó un LLOQ de 45 nM de NO_2Tyr en BSA, el CV interensayo fue del 20%, y la recuperación fue del $96\pm7\%$. Se presenta la curva de calibración en la Figura 4.4.

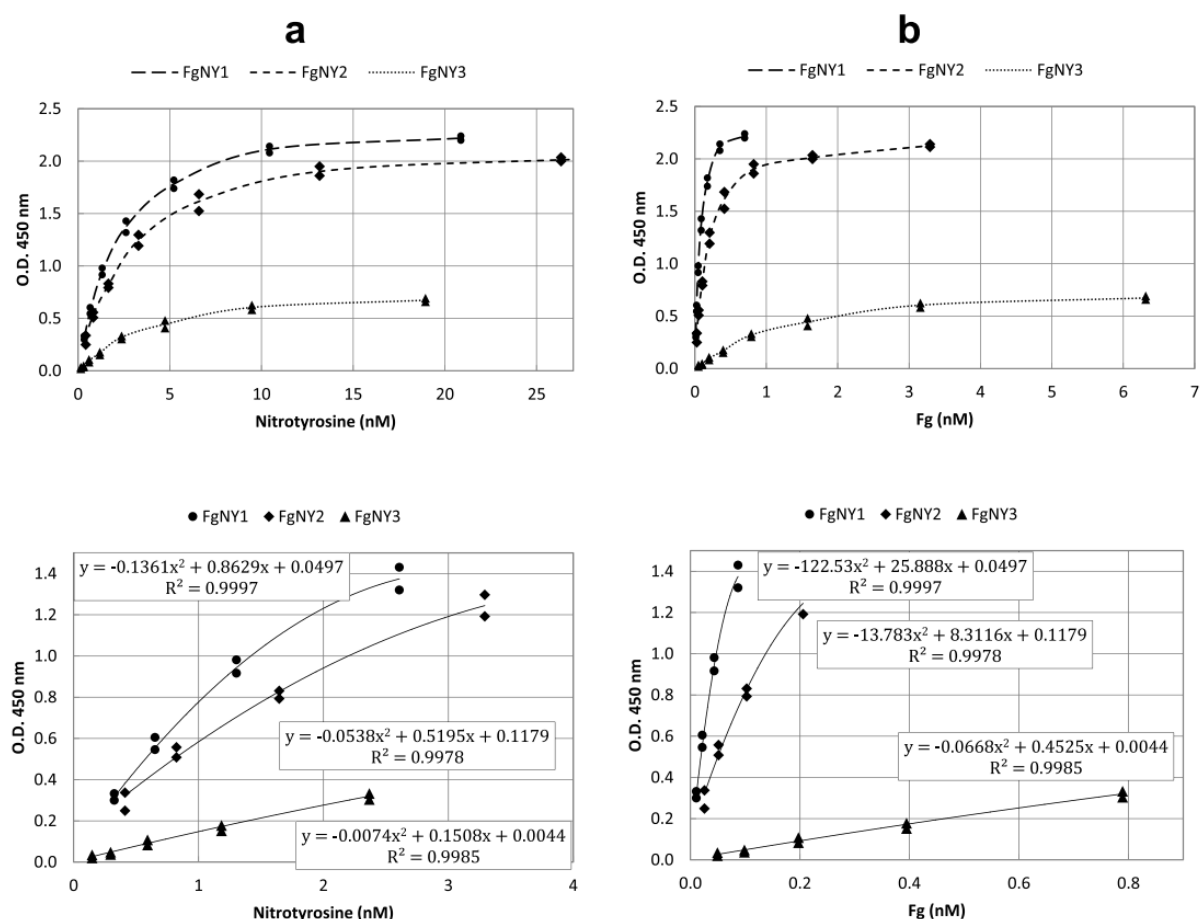


Figura 4.2. Curvas de calibración en el ELISA sándwich para la detección de Fibrinógeno nitrado. Los puntos de datos representan las medias de las densidades ópticas de triplicados intraensayo. Los gráficos muestran la densidad óptica a 450 nm en función de la cantidad de nitro tirosina **(a)** o fibrinógeno **(b)** añadidos al pozo, en nM. Se analizaron tres estándares de Fg nitrado: FgNY1 (círculos), FgNY2 (diamantes) y FgNY3 (triángulos). Los paneles inferiores de tanto **(a)** como **(b)** hacen un acercamiento en el rango del cual se obtuvo una ecuación de línea de tendencia, que se muestra, junto con su valor R^2 .

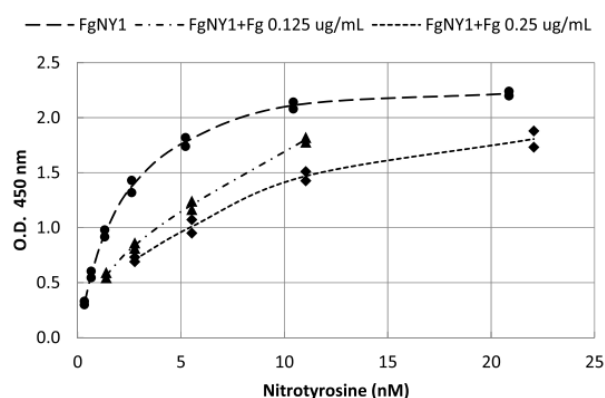


Figura 4.3. ELISA sándwich para la determinación de Fibrinógeno nitrado, efecto de la presencia de Fibrinógeno nativo. Las densidades ópticas a 450 nm en función de la concentración de nitro tirosina en nM mientras se analizan muestras de una mezcla de fibrinógeno nitrado estándar 1 (FgNY1) y fibrinógeno no nitrado (Fg), variando la concentración de ambas preparaciones de fibrinógeno, pero manteniendo la concentración total constante. Se analizaron concentraciones totales de 0.125 µg/mL (triángulos) y 0.250 µg/mL (diamantes). Además, se muestra la curva para FgNY1 en ausencia de Fg no nitrado para comparación (círculos).

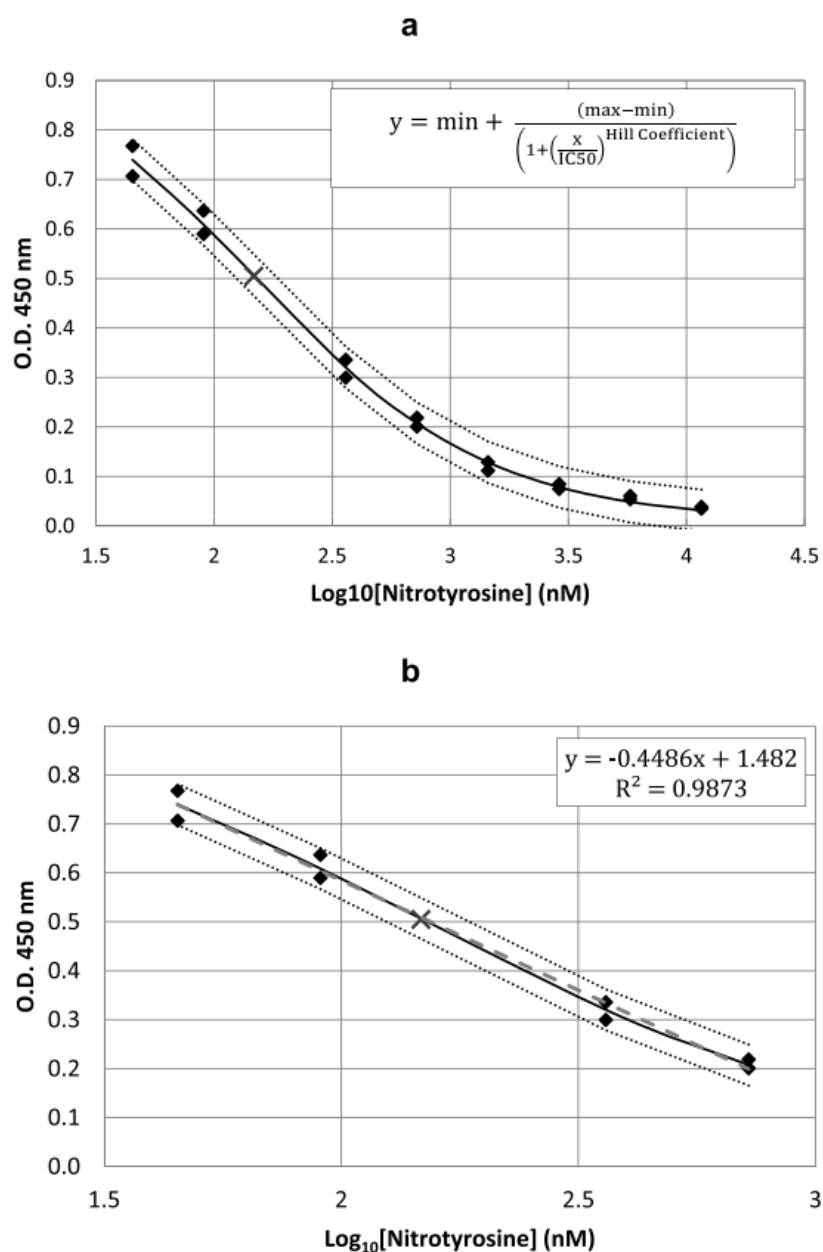


Figura 4.4. Curva de calibración del ELISA de inhibición para la determinación de 3-nitrotirosina total. (a) Curva de calibración obtenida en el ELISA de inhibición para la detección de nitrotirosina total, usando BSA nitrada (BSA-NO₂Tyr) como estándar. El gráfico muestra la densidad óptica a 450 nm en función del logaritmo decimal de la concentración de nitrotirosina en nM, cubriendo el rango total de concentraciones de BSA-NO₂Tyr analizadas. Los cuadrados negros representan puntos de datos, siendo la media de las densidades ópticas de triplicados intraensayo. La línea continua negra es un ajuste logístico de 4 parámetros, representando una curva sigmoidea. Las líneas punteadas negras representan el intervalo de confianza del 95% (CI95%), y la cruz gris indica el punto de inflexión, que es la concentración inhibitoria media (IC₅₀). Los parámetros del ajuste logístico son los siguientes: máximo (max): 1; mínimo (min): 0.01; IC₅₀: 147.25; coeficiente de Hill: -0.87; R²: 0.996. **(b)** Ampliación de la curva de calibración correspondiente al rango de trabajo que permite un ajuste de tendencia lineal entre 45 nM y 720 nM de nitrotirosina. La línea discontinua gris es la tendencia lineal usada en ese rango de densidades ópticas para simplificar los cálculos. Se proporciona la ecuación de esa línea de tendencia y su valor de R². Como se puede observar, a pesar de que el ajuste logístico de 4 parámetros es más apropiado, la línea de tendencia lineal se mantiene dentro del intervalo de confianza del 95% del ajuste logístico de 4 parámetros.

2.2. Análisis de nitración en plasma con método ELISA y correlación con FRC

Se realizó la determinación de NO₂Tyr total en plasma de pacientes con ACVi y controles con el método ELISA de inhibición. El grupo de control mostró una concentración mediana de NO₂Tyr de 2.26 µM (IQR50 1.46 - 4.63) y una relación molar con el Fg de 0.149 (IQR50 0.116 - 0.372). El grupo de pacientes con ACVi mostró una mediana de concentración de NO₂Tyr de 3.69 µM (IQR50 2.74 - 4.83) y una relación molar con el Fg de 0.297 (IQR50 0.205 - 0.382). El análisis estadístico realizado rechazó la igualdad de los valores medios de las concentraciones de NO₂Tyr, con una diferencia de 1.431 y un valor p de 0.0341. En cuanto a las relaciones molares de NO₂Tyr a Fg, la prueba de hipótesis arrojó un p de 0.0336, con una diferencia estimada de 0.147, también rechazando la igualdad de los valores medios con significancia estadística.

La concentración de Fg en el grupo control presentó una mediana de 455.0 mg/dL (IQR50 412.0-521.0), mientras que en el grupo ACVi fue de 457.0 mg/dL (IQR50 424.0-550.0). El test de hipótesis arrojó un valor p de 0.5456, con lo cual no se puede rechazar la igualdad de medianas. En cuanto a la concentración de PCR, el grupo control presentó una mediana de 2.5 mg/L (IQR50 0.8-3.1) mientras que en el grupo ACVi fue de 3.5 mg/L (IQR50 2.0-9.2). El test de hipótesis resultó en un p de 0.0168, indicando una diferencia significativa con una variación de 1.0 mg/L.

Se realizó un análisis comparativo de valores medios de nitración y variables epidemiológicas (FRC) en ambas cohortes estudiadas. La Figura 4.5 expone gráficos de columna que representan las medias o medianas con CI95% o IQR50, respectivamente (dependiendo de la distribución de frecuencia de la variable), de los valores de las variables cuantitativas estudiadas. Además, las proporciones de sexo para ambos grupos estudiados se representan en gráfico de barras. El análisis estadístico comparativo mostró que no hay evidencia estadística para rechazar la igualdad en las proporciones de sexo y las concentraciones de Fg entre los dos grupos. Sin embargo, para el resto de las variables evaluadas (edad, PCR, NO₂Tyr y NO₂Tyr/Fg), se rechazó la igualdad de valores medios, con valores p inferiores a 0.05.

En la Figura 4.6 se grafican las concentraciones de NO₂Tyr dentro del grupo ACVi, subdividiéndolo según la presencia de FRC, PCR alterada y Fg alterado. El análisis estadístico comparando valores medios mostró que no hay diferencias significativas en los valores de NO₂Tyr dentro de ninguno de los subgrupos tomados.

Continuando con el estudio de FRC dentro del grupo ACVi y su potencial influencia en los valores de NO₂Tyr, la Figura 4.7 presenta un análisis que compara la concentración de NO₂Tyr de cada subgrupo de ACVi, con los valores del grupo control que se toman como referencia en este caso, para observar la influencia de cada FRC y de la alteración de PCR y Fg en los niveles de NO₂Tyr. Se observa que los individuos con DM y niveles elevados de PCR tienen los valores más altos de NO₂Tyr en comparación con los del grupo control, mientras que los individuos mayores de 62 años y fumadores presentaron una tendencia hacia valores más altos.

Del mismo modo que en la Figura 4.6, en la Figura 4.8 se grafican las concentraciones de NO₂Tyr dentro del grupo control, considerando el sexo, la edad y la presencia de PCR alterada y Fg alterado. Se observa que ninguno de los factores considerados influye en los valores de NO₂Tyr.

Finalmente, en la Figura 4.9 se ilustra una comparación entre las concentraciones de NO₂Tyr de ambas cohortes estudiadas, diferenciando por subgrupos de edad, sexo y valores de PCR y Fg alterados.

La estadística descriptiva de las características epidemiológicas y todos los detalles correspondientes a este Capítulo se pueden encontrar en Medeiros *et al.*^[217]

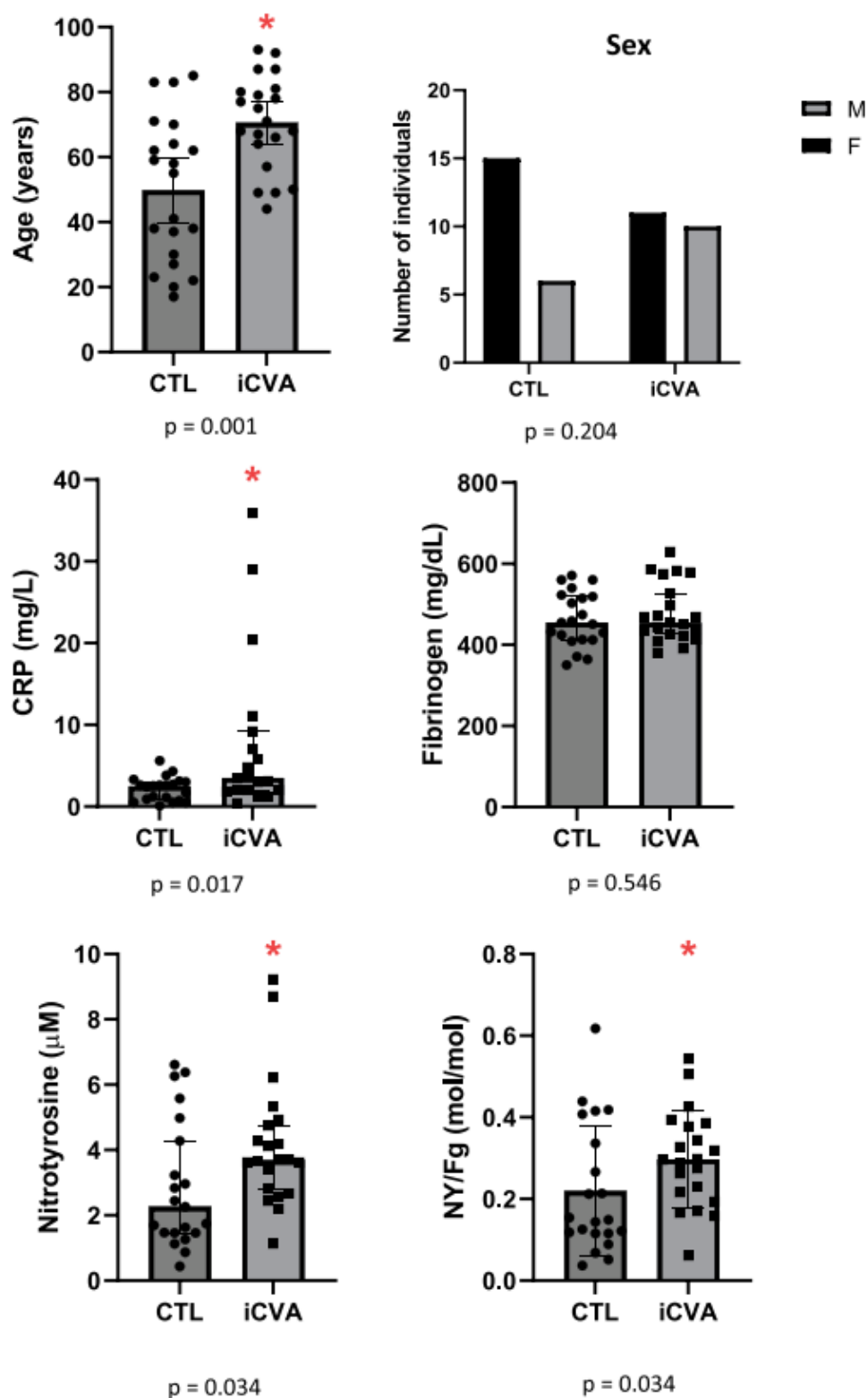


Figura 4.5. Análisis comparativo de los valores medios de las variables en las cohortes estudiadas. Los diagramas de columna comparan el grupo ACVi (iCVA) y control (CTL) en todas las variables medidas, y representan las medias o medianas, con CI95% o IQR50, respectivamente, de los valores de las variables cuantitativas estudiadas (edad, proteína C-reactiva [CRP], fibrinógeno, nitrotirosina, relación molar de nitrotirosina a fibrinógeno [NY/Fg]), y gráficos de barras que representan las proporciones de sexo para los grupos CTL y ACVi. Las estrellas rojas indican $p < 0.05$ en el análisis inferencial para la comparación de los valores medios entre grupos.

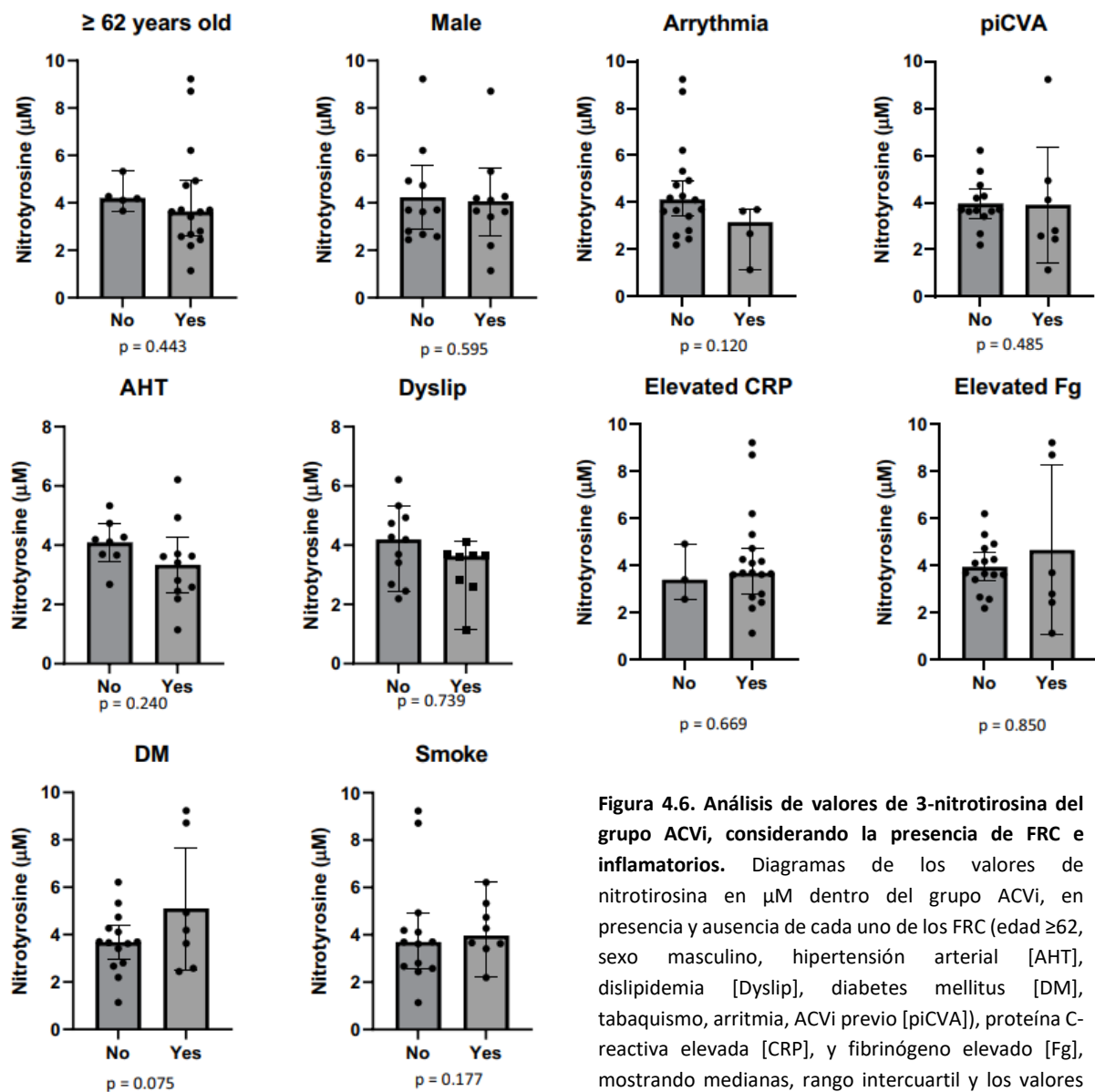


Figura 4.6. Análisis de valores de 3-nitrotirosina del grupo ACVi, considerando la presencia de FRC e inflamatorios. Diagramas de los valores de nitrotirosina en μM dentro del grupo ACVi, en presencia y ausencia de cada uno de los FRC (edad ≥62, sexo masculino, hipertensión arterial [AHT], dislipidemia [Dyslip], diabetes mellitus [DM], tabaquismo, arritmia, ACVi previo [piCVA]), proteína C-reactiva elevada [CRP], y fibrinógeno elevado [Fg], mostrando medianas, rango intercuartil y los valores de p obtenidos en el análisis inferencial.

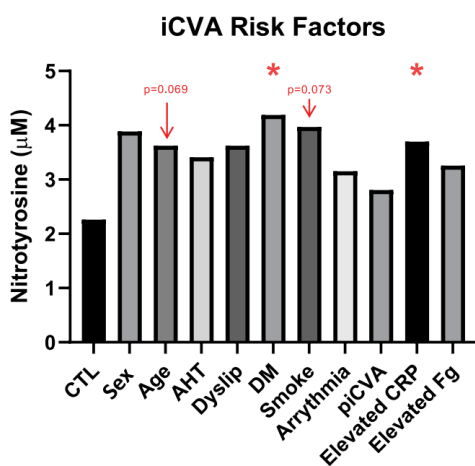


Figura 4.7. Influencia de factores de riesgo cardiovascular e inflamatorios en el grupo ACVi. Se evaluó la influencia de la presencia de cada FRC en los valores de nitrotirosina (NO₂Tyr) dentro del grupo ACVi (iCVA), comparados con los valores de NO₂Tyr dentro del grupo control. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación post hoc con la prueba de Mann-Whitney U. Los valores de p menores a 0.05 se indican con una estrella roja (p = 0.043 para la diabetes mellitus [DM] y p = 0.041 para la proteína C-reactiva elevada [CRP]), y aquellos menores a 0.1 se indican en la figura (edad y tabaquismo). Se muestran las medianas.

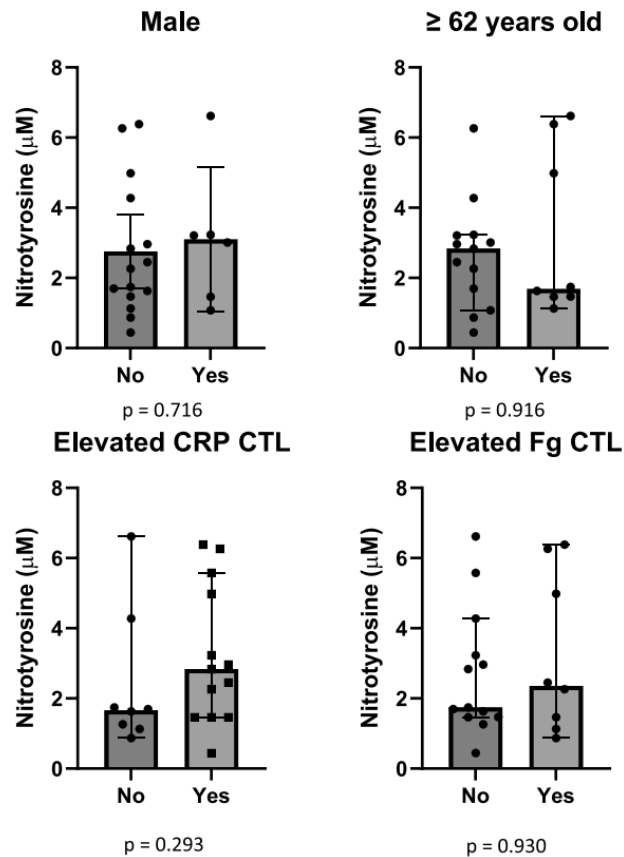


Figura 4.8. Análisis de valores de 3-nitrotirosina del grupo CTL, considerando la presencia de FRC e inflamatorios. Gráficos de columna de los valores de nitrotirosina (NO_2Tyr) en μM dentro del grupo control (CTL), en presencia y ausencia de FRC (sexo masculino, edad ≥ 62 años) y proteína C-reactiva (CRP) y fibrinógeno (Fg) alterados. Se muestran las medianas, el rango intercuartil y los valores de p obtenidos en el análisis inferencial.

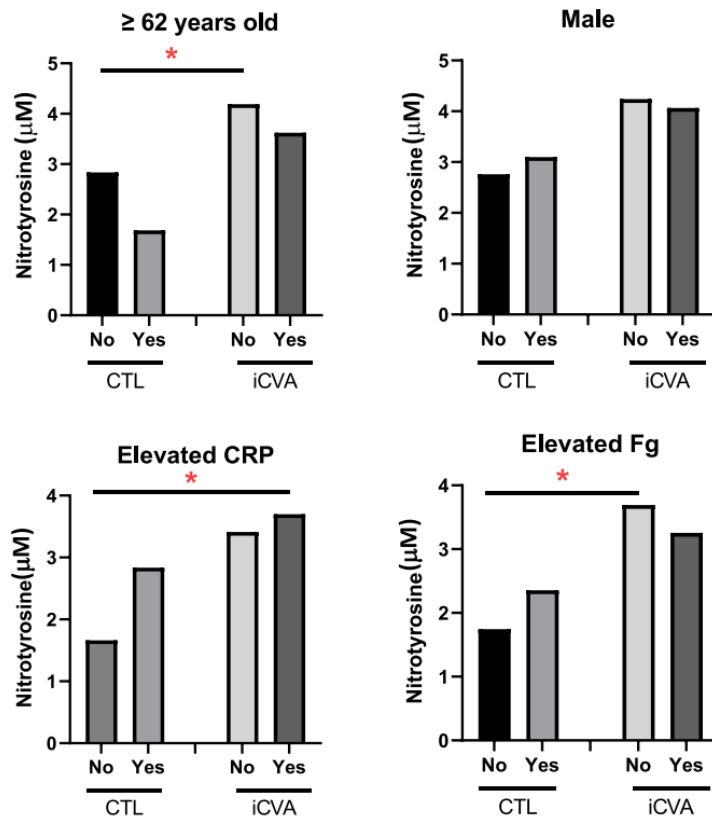


Figura 4.9. Comparación de los niveles de 3-nitrotirosina en los grupos ACVi y CTL, subdivididos según la presencia de algunos FRC. Se comparan los valores medios de 3-nitrotirosina en μM en cada cohorte estudiada, subdividida según la presencia de algunos FRC e inflamatorios. Se compara la influencia de la presencia de sexo masculino, edad ≥ 62 años, y parámetros inflamatorios (proteína C-reactiva [CRP] alterada y fibrinógeno [Fg] alterado). Las estrellas rojas representan un valor de $p < 0.05$ obtenido en el análisis inferencial.

3. Discusión

En este estudio, se desarrollaron métodos ELISA para la cuantificación de Fg, Fg-NO₂Tyr y NO₂Tyr total. Posteriormente, se analizaron muestras de plasma de pacientes con ACVi y de individuos de control utilizando el método desarrollado para la determinación de NO₂Tyr total. Se compararon los niveles de NO₂Tyr en ambos grupos y se evaluó la asociación de estos niveles con la presencia de FRC, y parámetros inflamatorios como Fg alterado y PCR alterada en ambos grupos. El objetivo final era identificar un nivel diferencial de nitración que pueda utilizarse posteriormente en la práctica clínica, proporcionando una herramienta potencial para la evaluación de pacientes con ACVi en futuros estudios prospectivos.

Se han empleado varios métodos para identificar, cuantificar y caracterizar aminoácidos y proteínas nitradas tanto *in vivo* como *in vitro*, combinando tecnologías de separación como HPLC o GC con sistemas de detección que incluyen absorbancia, fluorescencia, ensayos electroquímicos y MS.^[141] Además, se han desarrollado ELISAs para aplicaciones clínicas.^[142,143,157] Establecer una técnica efectiva para un biomarcador es crucial, lo que requiere la cuidadosa selección de anticuerpos primarios y secundarios que reconozcan específicamente al biomarcador con alta afinidad y sin reactividad cruzada.^[210] Estudios previos relevantes de proteínas nitradas en fluidos biológicos utilizando métodos ELISA incluyen a Khan *et al*,^[143] quienes desarrollaron un ELISA competitivo para la determinación de proteínas nitradas en plasma humano, y a Tang *et al*,^[157] quienes desarrollaron un ELISA de sandwich para detectar Fg nitrado *in vitro* añadido a plasma y suero humano.

El ELISA de inhibición para la determinación de NO₂Tyr libre o unida a proteínas es un método semicuantitativo sensible para analizar muestras de plasma. Es particularmente útil para manejar un número sustancial de muestras sin necesidad de un procesamiento extenso, como lo requieren los métodos de determinación HPLC y MS. Es importante señalar que las muestras analizadas son una mezcla de proteínas y aminoácidos, y la unión del anticuerpo a la NO₂Tyr está influenciada por el entorno circundante. Por lo tanto, no exhibe la misma afinidad por la NO₂Tyr libre que por la NO₂Tyr unida a proteínas, y esta afinidad puede variar según la proteína. Además, la curva de calibración se genera utilizando solo una proteína, la BSA-NO₂Tyr en este caso, lo que lo convierte en un método semicuantitativo.

Comenzando con la observación de las características epidemiológicas y las variables medidas en las poblaciones analizadas (edad, proporciones de sexo, PCR, Fg, NO₂Tyr y cociente NO₂Tyr/Fg), se destacan diferencias y similitudes (Figura 4.5). El grupo de ACVi tiene una

edad promedio más alta, atribuida al diseño experimental en el que se seleccionó un grupo de control sin FRC, lo que reduce la edad promedio en ese grupo. Dado que las condiciones vasculares tienden a desarrollarse con la edad, esto podría representar una variable confundente. La PCR mostró valores más altos en el grupo ACVi, probablemente debido al estado inflamatorio de la lesión, lo que la convierte en una posible variable confundente.

Las concentraciones de NO₂Tyr son más altas en el grupo ACVi, lo que sugiere que en individuos que experimentaron este evento agudo isquémico ocurrieron procesos que llevan a la nitración de residuos de Tyr. Un hallazgo destacado es que el grupo de control también mostró cierto nivel de nitración basal (este hallazgo también se hizo en el Capítulo 3). Por lo tanto, la presencia de nitración no parece ser un fenómeno exclusivamente relacionado con la patología; más bien, es el aumento en la nitración lo que resulta de interés. Suponiendo que la concentración de NO₂Tyr medida se originó únicamente a partir del Fg, las relaciones molares calculadas sugieren que la cantidad de residuos de NO₂Tyr por molécula de Fg es mayor en ACVi, lo que indica una mayor nitración de Fg en pacientes ACVi que en controles.

La aumentada nitración de Tyr observada en individuos del grupo de ACVi podría haber ocurrido antes del evento, durante el evento, o ambos. Una forma de abordar esta pregunta sería diseñar un experimento en el que se seleccionen individuos con las mismas características epidemiológicas que los pacientes de ACVi (edad, sexo, FRC, marcadores inflamatorios) como grupo de control. Si estos individuos tuvieran los mismos valores de NO₂Tyr que los pacientes, es más probable que la nitración se deba a la presencia de FRC y estuviera presente antes del evento. De lo contrario, si los valores fueran más bajos, es más probable que la nitración haya ocurrido durante el evento. Otro enfoque para responder a la pregunta es a través de un estudio de cohortes en el que se sigan a poblaciones con y sin FRC y se mida la nitración antes y después de que ocurra un ACVi. Este diseño permitiría examinar los cambios en los niveles de nitración a lo largo del tiempo, proporcionando información sobre la relación temporal entre la nitración y el inicio de un ACVi. Este tipo de estudios son costosos y complejos.

Para aclarar las causas del aumento observado de NO₂Tyr en ACVi, con los resultados que se obtuvieron, se analizó si esos valores mostraban una diferencia en la presencia o ausencia de algún FRC o marcador inflamatorio dentro de este grupo (Figura 4.6). El análisis estadístico arrojó resultados inconcluyentes en cuanto a los valores de NO₂Tyr cuando el individuo presentaba o no alguno de estos factores. Una situación similar ocurrió con el grupo de control,

en el que se evaluaron los factores de edad, sexo y niveles elevados de PCR y Fg, sin obtenerse resultados concluyentes (Figura 4.8).

Además, cabe señalar que el grupo control no presenta ningún FRC, y esta distinción podría ser un factor que contribuye al aumento de NO₂Tyr en ACVi en comparación con el grupo control. Sin embargo, como ya se indicó, la comparación de los niveles de NO₂Tyr dentro de los casos de ACVi, con y sin FRC, no reveló resultados concluyentes. Por lo tanto, es necesario continuar con los estudios, aumentando en tamaño muestral.

Por otro lado, también las concentraciones de NO₂Tyr fueron analizadas en individuos dentro del grupo de ACVi que presentaban FRC para observar cuál FRC contribuyó más a los niveles diferenciales de nitración. Como se muestra en la Figura 4.7, los FRC que tuvieron la mayor influencia en aumentar los niveles de NO₂Tyr fueron la DM, la PCR aumentada, la edad avanzada y el tabaquismo. En relación al tabaquismo, un estudio previo encontró una diferencia en el contenido de NO₂Tyr entre fumadores y no fumadores.^[150] Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron resultados concluyentes que apunten a una diferencia entre los individuos fumadores y no fumadores con ACVi, aunque sí se encontró esta influencia mencionada. Esto puede explicarse por el hecho de que las poblaciones de fumadores y no fumadores estudiadas son diferentes: en este caso los individuos comparados fueron pacientes con ACVi. Esto podría implicar que esta condición médica eleva los niveles de NO₂Tyr independientemente de la presencia o ausencia de fumar como FRC. Sin embargo, como ya se dijo, sí se halló una influencia del tabaquismo.

Al comparar los niveles de NO₂Tyr entre los grupos CTL y ACVi, tanto en presencia como en ausencia de FRC como la edad avanzada, el sexo masculino, la PCR y el Fg alterados (Figura 4.9), se revelaron diferencias entre los subgrupos (individuos con y sin los factores estudiados dentro de cada grupo). En cuanto a la edad, se observó una distinción en los valores de NO₂Tyr entre ACVi y CTL para individuos menores de 62 años. Esto sugiere que aquellos menores de 62 contribuyen más a la diferencia general en NO₂Tyr observada entre los grupos. No se obtuvieron resultados concluyentes para aquellos mayores de 62, lo que indica que no se puede saber como la edad estaría influyendo como variable confundente. En cuanto a la PCR alterada, solo se observó una diferencia en los valores de NO₂Tyr entre ACVi con niveles elevados y CTL con niveles normales. Esto implica que los niveles elevados de PCR pueden influir en el aumento de los niveles de NO₂Tyr, lo que es consistente con el resultado discutido anteriormente de que la PCR elevada es uno de los factores que más contribuyen al aumento

de NO₂Tyr. Finalmente, los individuos en ambos grupos con niveles normales de Fg mostraron una diferencia en los valores de NO₂Tyr, a diferencia de los individuos con niveles elevados de Fg. En otras palabras, aquellos con niveles normales de Fg muestran la mayor diferencia en NO₂Tyr entre los grupos, mientras que los niveles elevados de Fg podrían ser una variable a considerar (cuando los niveles de Fg son altos, los niveles de NO₂Tyr en el grupo CTL no difieren de los del grupo ACVi). En resumen, es más probable que los individuos menores de 62 años y aquellos con concentraciones de Fg dentro de los valores de referencia tengan valores de NO₂Tyr que puedan diferenciar entre ACVi y CTL.

Una limitación del estudio es el pequeño tamaño de la muestra y se debería repetir o ampliar aumentando el tamaño de la muestra. Otra limitación es la presencia de la edad avanzada y la PCR elevada como posibles variables confundentes, las cuales podrían abordarse seleccionando un grupo de control con una distribución de edad y valores de PCR similares a los casos. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un estado de estrés nitroxidativo en las condiciones de enfermedad estudiadas. Tanto la NO₂Tyr libre como el Fg-NO₂Tyr podrían servir como biomarcadores para procesos isquémicos agudos e inflamatorios, ofreciendo utilidad potencial en la prevención, detección temprana y diagnóstico específico del ACVi. Esto fomenta más esfuerzos de investigación.

Estos resultados que indican estrés nitroxidativo representado por un aumento en la nitración de moléculas en ACVi se alinean con los hallazgos del Capítulo 3 realizados utilizando LC-MS/MS. En ese estudio, observamos un aumento en la nitración de residuos específicos de Tyr en Fg de pacientes con ACVi en comparación con controles. La consistencia entre ambos experimentos, realizados de manera independiente, apoya la hipótesis de la presente Tesis.

4. Conclusión

En línea con el objetivo general de esta Tesis, generar conocimiento que ayude a descubrir los mecanismos detrás del evento cerebrovascular isquémico, el presente Capítulo se enfocó en la identificación de niveles de nitración diferencial, utilizando una metodología de práctico uso clínico como los métodos ELISA, para ofrecer una herramienta clínica valiosa que pueda evaluar a los pacientes con ACVi en estudios futuros. A pesar de las complejidades metodológicas en la cuantificación de residuos de NO₂Tyr, la determinación exitosa en muestras de plasma humano demostró una diferencia notable de contenido entre los pacientes con ACVi y el grupo de control. Esto subraya el desafío de implementar la determinación de NO₂Tyr en la práctica clínica, enfatizando la necesidad constante de mejorar la sensibilidad y

especificidad, especialmente al trabajar con matrices de plasma complejas. Si bien se requiere una mayor optimización, el potencial del ELISA como una herramienta analítica futura para evaluar riesgo o diagnosticar ACVi y reducir la morbilidad y mortalidad asociadas es evidente.

Capítulo 5: Fibrinoformación y Fibrinolisis en plasma de ACVi

1. Introducción

La Fb (y el Fg) puede ser caracterizada por diferentes propiedades, las más estudiadas son la cinética de formación y lisis de la Fb, la estructura, la permeabilidad, elasticidad y compactabilidad del coágulo formado.

1.1. Hemostasis Primaria y Secundaria

La hemostasis es un proceso complejo que tiene como objetivo detener el sangrado cuando se produce una lesión en un vaso sanguíneo. Este sistema implica una serie de reacciones en cascada que resultan en la formación de un coágulo de Fb, que luego es degradado para mantener el equilibrio. Además, involucra mecanismos inhibitorios y activadores que hacen que este proceso esté finamente regulado. Consta de cinco fases. (1) Fase vascular: ocurre vasoconstricción tras la pérdida de integridad de las paredes vasculares y daño de las células endoteliales vasculares por una lesión en el vaso sanguíneo. En este momento el músculo liso del vaso sanguíneo se contrae para minimizar la pérdida de sangre. (2) Fase plaquetaria (o hemostasis primaria): en primer lugar, ocurre la captura y adhesión plaquetaria donde las plaquetas se adhieren al sitio de la lesión, especialmente a las proteínas del subendotelio expuestas como el colágeno y VWF; luego ocurre la activación plaquetaria (secreción, agregación y contracción) donde las plaquetas se activan y cambian de forma (*spreading*), liberando sustancias químicas (granulaciones) que reclutan más plaquetas al sitio de la lesión; y finalmente la agregación plaquetaria donde las plaquetas se agregan, formando un tapón plaquetario temporal. (3) Fase de la coagulación (o hemostasis secundaria) en la cual se da la cascada de coagulación y la formación de Fb. La cascada de coagulación es una serie de reacciones enzimáticas en las que participan factores de coagulación, que se puede dividir, para su estudio, en tres vías: intrínseca, extrínseca y común. La vía intrínseca (también llamada vía de contacto) se activa por el contacto de la sangre con superficies cargadas negativamente (como colágeno), e incluye los factores XII, XI, IX y VIII. La vía extrínseca (también llamada vía del TF) se activa por el TF liberado por las células dañadas, e incluye el factor VII y el complejo TF-fVIIa. La vía común es la convergencia de ambas vías en la activación del factor X. Esto lleva a la conversión de protrombina (factor II) en trombina (factor IIa). En la formación de Fb la trombina convierte el Fg en Fb al clivar los FpA y FpB, que se polimeriza para formar una red insoluble que estabiliza el coágulo plaquetario. La Figura 5.1 muestra los procesos que ocurren hasta este punto.^[218] (4) Fase de retracción del coágulo: las plaquetas contraen el coágulo para reducir su tamaño y facilitar la reparación del tejido. (5) Fase de

fibrinolisis: una vez que el vaso sanguíneo está reparado, el coágulo de Fb es degradado por el sistema fibrinolítico, principalmente mediante la acción de la plasmina.

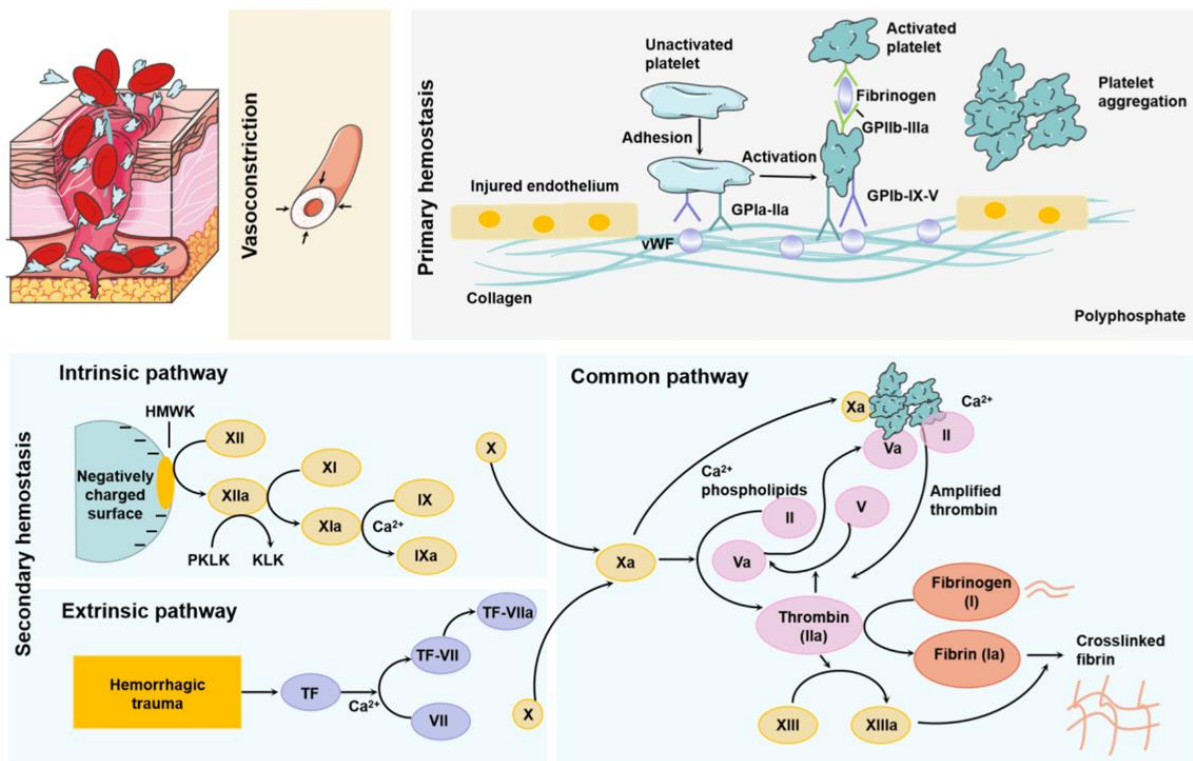


Figura 5.1. Mecanismo de la hemostasis primaria y secundaria. Ante una lesión del endotelio ocurre vasoconstricción y se activan la hemostasis primaria y secundaria. La hemostasis primaria involucra la activación, adhesión, secreción, agregación y contracción plaquetaria. El modelo de la hemostasis secundaria plantea dos vías, extrínseca (vía TF) e intrínseca (de contacto) que convergen en una vía común. En la vía intrínseca se ensamblan el fXII, la precalicreína (PKLK) y el cofactor de alto peso molecular (HMWK), lo que lleva a que el fXII sea activado por HMWK a fXIIa, mientras que la PKLK es activada por fXIIa a calicreína (KLK). El fXIIa generado activa el fXI a fXIa, que luego convierte el fIX a fIXa. En la vía extrínseca el complejo TF-VIIa en la superficie celular activa el fIX y/o el fX a través de una proteólisis limitada. Finalmente, la vía común promueve la producción de trombina (fIIa), que transforma Fg (fI) en Fb (fIa), activa al fXIII e indirectamente activa las plaquetas para mantener la reacción, entre otras funciones. Extraído de "Hemostasis Strategies and Recent Advances in Nanomaterials for Hemostasis" de J. Du et al.^[218]

1.2.Fibrinolisis

La fibrinolisis es el proceso fisiológico continuo de ruptura del coágulo de Fb y, normalmente, está estrictamente regulado para mantener el equilibrio entre la formación y la lisis de la Fb. Este equilibrio asegura la hemostasis en caso de daño en la pared del vaso, mientras que previene la formación excesiva de Fb y la obstrucción del suministro de sangre. Como ya se indicó, al activarse el sistema de coagulación, el Fg circulante se convierte en Fb, y el coágulo de Fb se estabiliza mediante entrecruzamiento por el fXIIIa. La plasmina es la principal proteasa fibrinolítica y circula en la sangre en su forma de zimógeno, el plasminógeno. La Fb

reticulada proporciona una superficie de unión para el plasminógeno, que luego es convertido en plasmina por el tPA (también existe en menor proporción un activador del plasminógeno de tipo urokinasa, uPA). La fibrinólisis está regulada por las proteínas antifibrinolíticas, α_2 -AP, el PAI-1 y -2, y el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI). Finalmente, la estructura del propio coágulo de Fb influye en la fibrinólisis, ya que se ha encontrado que los coágulos de Fb más densos con poros más pequeños son menos susceptibles a la lisis, probablemente porque la unión del plasminógeno y del tPA a la Fb se ve obstaculizada por el menor tamaño de los poros. La Figura 5.2 muestra un esquema del proceso fibrinolítico.

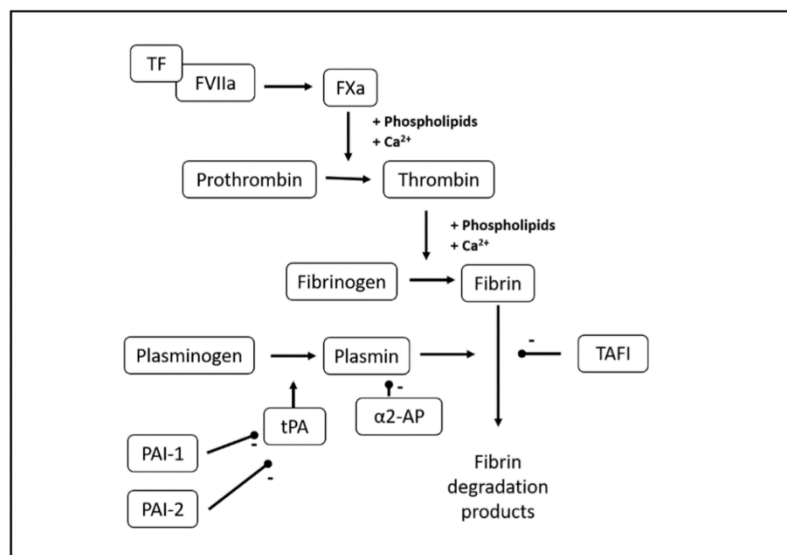


Figura 5.2. Resumen del proceso fibrinolítico. Al activarse el sistema de coagulación, el Fg circulante se convierte en Fb. La plasmina es la principal proteasa fibrinolítica y circula en la sangre como plasminógeno. El plasminógeno es convertido en plasmina por el activador de plasminógeno tisular o tipo urokinasa (tPA/uPA), siendo tPA el más abundante. La fibrinólisis está regulada por las proteínas antifibrinolíticas α_2 -antiplasmina (α_2 -AP), el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1 y -2), y el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI). Extraído de "Fibrin Clot Formation and Lysis in Plasma" de J. Larsen y A. Hvas.^[163]

La fibrinólisis alterada ocurre en una variedad de contextos clínicos. Sin embargo, los ensayos de coagulación rutinarios actuales, como el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) y el tiempo de protrombina (PT), no son sensibles a la fibrinólisis. Los productos de degradación de Fb circulantes en niveles altos indican un aumento en el recambio de Fb, pero usualmente reflejan más una actividad procoagulante aumentada con formación de Fb que una hiperfibrinólisis. Por lo tanto, resultaría útil un método para evaluar la capacidad fibrinolítica en la investigación y en el laboratorio clínico.

1.3. Estudios de Formación, Lisis y Estructura del Coágulo

La cinética de formación del coágulo se puede estudiar determinando la densidad óptica (DO) en función del tiempo, obteniéndose perfiles de turbidez que son curvas sigmoideas o exponenciales que son caracterizadas mediante tres parámetros: la fase lag, la pendiente y la DO máxima.^[25,219] La fase lag sólo está presente en las curvas sigmoideas y se corresponde al tiempo de inicio de la coagulación. La pendiente representa la velocidad de fibrinoformación. Y la DO máxima está asociada a la densidad de la estructura final de la Fb. En la Figura 5.3 se muestra un ejemplo de esta curva de formación de coágulo.

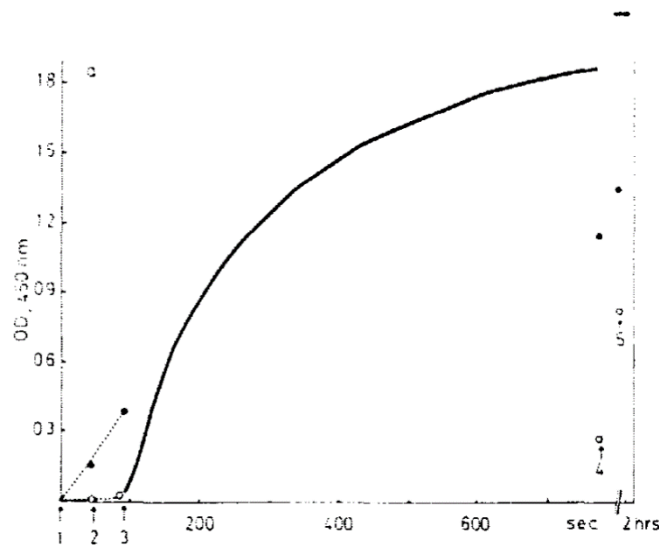


Figura 5.3. Perfil de turbidez durante la coagulación. Se observa la DO a 450 nm en función del tiempo en segundos (sec) durante la formación del gel de fibrina en presencia de fibrinógeno y trombina. En los momentos indicados con flechas (1, 2 y 3) se tomó una muestra de la mezcla para determinar fibrinopéptido A (FpA, círculos negros) y fibrinopéptido B (FpB, círculos vacíos). Se puede observar la forma sigmoidea de la curva, la fase lag y la DO máxima. Además, se puede observar que el FpA se libera antes que el FpB. Extraído de "Fibrin gel structure and clotting time" de B. Blombäck y M. Okada.^[219]

La dinámica de formación y lisis del coágulo, así como propiedades de este, se pueden estudiar mediante tromboelastometría (TEM). Esta es una técnica que estudia las propiedades cinéticas y viscoelásticas del coágulo en tiempo real, y es especialmente útil en situaciones clínicas donde se necesita una evaluación rápida y detallada del estado de coagulación del paciente, como en cirugías complejas, manejo de trauma y cuidados intensivos. Esta técnica provee información a través de diferentes parámetros: tiempo de coagulación (CT) definido como el tiempo de inicio de formación del coágulo, que es el tiempo que transcurre entre que comienza la medida hasta que la amplitud del coágulo alcanza los 2 mm; el tiempo de formación del coágulo (CFT) es el tiempo desde que empieza a formarse el coágulo hasta que alcanza 20 mm

de amplitud; la amplitud 5 minutos luego del CT (A5); la máxima firmeza del coágulo (MCF) que es la máxima amplitud del coágulo y da información acerca de su fuerza y estabilidad, que dependen de la interacción con plaquetas activadas y Fg, y su valor normal es mayor a 50 mm; la lisis máxima (ML) describe el grado de fibrinólisis relativo a la MCF alcanzada (porcentaje de firmeza perdida), representa la estabilidad del coágulo y su valor normal es un 15 % de la MCF a los 60 minutos de la formación del mismo; y el índice de lisis a los 30 minutos (LI30) que mide la degradación del coágulo 30 minutos después de la MCF. El principio fundamental es la detección de los cambios en la resistencia al movimiento de una sonda dentro de la muestra de sangre entera (analiza la parte plasmática y celular de la coagulación) a medida que se forma y se degrada el coágulo.

Tiene varios modos, dependiendo de los reactivos que se agreguen. Cuando se agrega TF para activar la vía extrínseca de la coagulación se genera una figura denominada ExTEM, cuando se activa la vía intrínseca mediante el agregado de ácido elágico se obtiene InTEM, y cuando se agrega citocalasina D que inhibe la acción plaquetaria se obtiene FibTEM. ExTEM evalúa los cambios viscoelásticos en la polimerización de Fb y la resistencia contráctil plaquetaria, inducidos mediante la activación de la vía extrínseca de la coagulación. FibTEM también se basa en la activación de la vía extrínseca, incluyendo un inhibidor de la contracción plaquetaria, lo que hace que las propiedades viscoelásticas de los coágulos formados por ExTEM se deben a la polimerización de la Fb y plaquetas, mientras que en FibTEM se debe sólo a la contribución del Fg para formar la malla de Fb. Existen otros modos como el ApTEM (agregado de aprotinina que es un inhibidor de plasmina, responsable de la fibrinólisis), y el HepTEM (agregado de heparinasa, un inhibidor de heparina). Cada uno de estos, ensayados en conjunto siguiendo un adecuado algoritmo diagnóstico, ayuda a dilucidar causas de sangrado o trombosis. La Figura 5.4 muestra TEMs normales en diferentes modos.^[220]

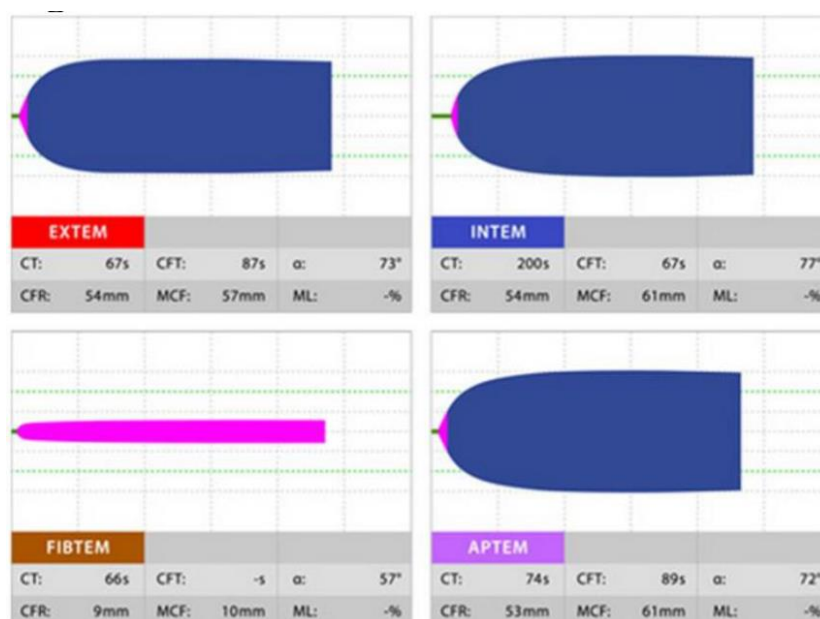


Figura 5.4. Tromboelastogramas normales. Se observa la cinética de la hemostasis de un trombo normal, mediante el tromboelastograma en cuatro modos diferentes (ExTEM, InTEM, FibTEM y ApTEM), donde se pueden ver los parámetros asociados. Extraído de “Tromboelastometría” de D. González.^[220]

La estructura de la Fb se puede evaluar por microscopía electrónica de barrido o microscopía confocal.^[22] Así, puede cuantificarse el número de ramificaciones por unidad de área y diferenciarse los tipos (bilaterales o equilaterales). Existe una clasificación para las diferentes estructuras de las redes de Fb, que las divide en cinco grupos: redes normales o con estructura semejante a la normal, redes con una estructura menos ordenada con importante cantidad de nudos o poros, redes porosas clase A, redes porosas clase B (Fb altamente ramificada, con grandes poros y fibras delgadas y frágiles), y redes muy ramificadas sin grandes poros y frágiles.^[221] El grado de entrecruzamiento puede ser evaluado mediante electroforesis en gel y la permeabilidad se estudia midiendo el flujo de un fluido a través del gel, utilizando el coeficiente de permeabilidad específica como parámetro.

Las propiedades viscoelásticas, cuantificadas por estudios reométricos,^[222] evalúan la consistencia de la Fb a través del módulo elástico y el módulo viscoso. El primero está asociado a la dureza y rigidez del material y el segundo con la deformabilidad y viscosidad del componente fluido. Estos estudios evalúan la respuesta del material a pequeñas deformaciones sin alterar su estructura, a diferencia del estudio de compactabilidad que cuantifica el colapso de las fibras ante grandes deformaciones.^[223]

Para evaluar además otra de las características de la Fb, su lisabilidad, se puede utilizar un método densitométrico cinético, registrando la DO en función del tiempo y determinando el

tiempo de lisis luego de la formación del coágulo, agregando de un agente trombolítico como tPA.^[224] Este método es el que se utiliza en los experimentos del presente Capítulo, e implica la generación de curvas de fibrinoformación y fibrinolisis del coágulo, de los cuales se derivan parámetros como la fase lag (tiempo hasta la formación inicial de Fb), tiempo de coagulación (Tc, tiempo que transcurre entre que termina la fase lag y se llega a la absorbancia máxima); absorbancia máxima (máxima concentración de Fb en la cubeta), integral o área bajo la curva (formación neta de Fb), y el tiempo de lisis al 50% (tiempo desde el pico hasta el 50% de la lisis del coágulo). En la Figura 5.5 se muestra un ejemplo de curva de fibrinoformación y fibrinolisis de coágulo.^[163]

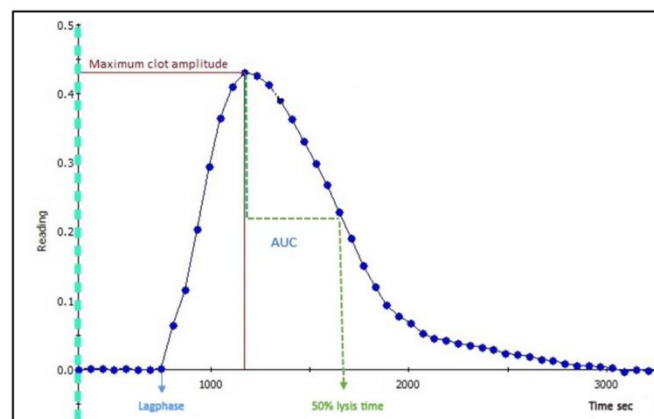


Figura 5.5. Curva de fibrinoformación y fibrinolisis de coágulo esperada. Se observa la forma y los parámetros derivados de una curva de fibrinoformación y fibrinolisis de coágulo. La forma y los valores de referencia de los parámetros puede variar considerablemente con el tipo y la concentración de activadores de la coagulación, tPA y Ca^{2+} utilizados. Extraído de “Fibrin Clot Formation and Lysis in Plasma” de J. Larsen y A. Hvas.^[163]

2. Resultados

Se realizaron los estudios funcionales de fibrinoformación y fibrinolisis en pacientes con ACVi y en controles sin ACVi ni antecedentes de ACVi (CSFR y CCFR). Se evaluó la formación del coágulo *ex vivo* y se obtuvieron curvas de fibrinoformación y fibrinolisis que permiten visualizar el comportamiento de la formación y lisis del coágulo de cada muestra. La Figura 5.6 muestran las curvas obtenidas en una de las corridas realizadas.

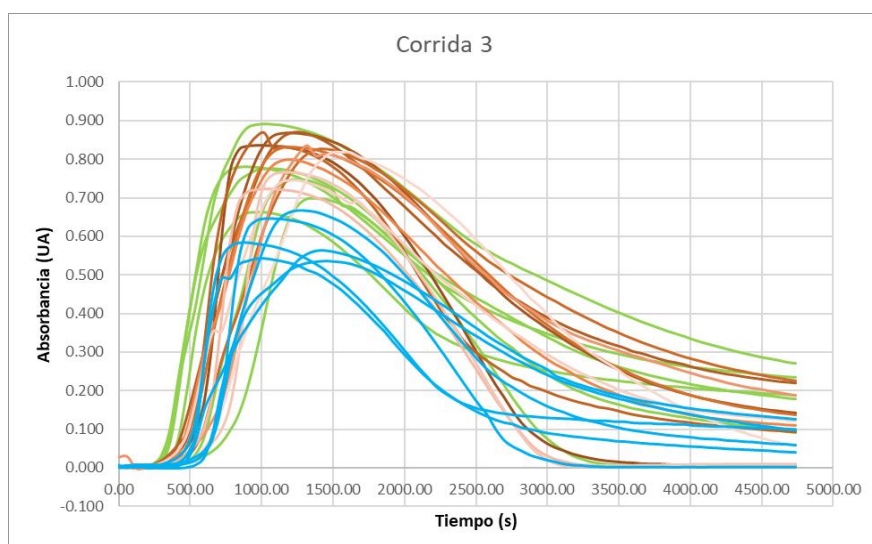


Figura 5.6. Curvas de fibrinoformación y fibrinolisis de coágulo obtenidas. Se observan todas las curvas obtenidas en la corrida 3. Controles sin factores de riesgo (CSFR): verde. Controles con factores de riesgo (CCFR): azul. ACVi: diferentes tonalidades de naranja. Se puede ver una forma similar para los 3 grupos.

Se puede observar que las curvas de fibrinoformación y fibrinolisis presentan la forma esperada, con una fase lag, una pendiente positiva que indica el comienzo de la formación del coágulo, un pico, y finalmente una pendiente negativa que se va volviendo menor. En cuanto a los parámetros derivados como pico de absorbancia, integral bajo la curva y 50% del tiempo de lisis, estos se encuentran cercanos a los intervalos de referencia planteados por Neergaard-Petersen *et al.*^[225] que se muestran en la Tabla 5.1, con la interpretación de las posibles alteraciones.

Tabla 5.1. Interpretación de parámetros derivados de curvas de formación y lisis de coágulo

Parámetro	Interpretación	Intervalo de referencia	Alteraciones
Absorbancia máxima (UA)	Máxima concentración de Fb alcanzada en el pocillo.	0.18 – 0.74	↑: Actividad procoagulante aumentada; alto Fg plasmático. ↓: Actividad procoagulante disminuida, puede deberse a bajos niveles plasmáticos de factores de coagulación o Fg
Integral (UA*s)	Formación neta de Fb. Equilibrio entre la formación y descomposición de Fb.	219 – 1051	↑: Actividad procoagulante aumentada; actividad anticoagulante endógena disminuida; capacidad fibrinolítica disminuida ↓: Actividad procoagulante o estabilidad del coágulo disminuida, puede deberse a bajos niveles circulantes de factores de coagulación, Fg o fXIII; actividad fibrinolítica aumentada
Lisis 50%	Tiempo desde que se alcanza la máxima concentración de Fb hasta que se lisa el 50% del coágulo.	309 – 1565	↑: Capacidad fibrinolítica disminuida, puede deberse a bajos niveles circulantes de plasminógeno, altos niveles de PAI-1 y/o TAFI o tratamiento antifibrinolítico ↓: Actividad fibrinolítica aumentada, puede deberse a altos niveles plasmáticos de tPA o uPA

En el presente trabajo se hizo foco en el tiempo de fibrinoformación o coagulación (Tc), en la altura de pico (o absorbancia máxima) y en el tiempo de fibrinólisis (Tf).

En cuanto a los Tc (desde el comienzo de formación del coágulo hasta el máximo del pico) se observa una media $\pm$ IC95% de 679 ± 79 s para los CSFR, 707 ± 69 s para los CCFR y 877 ± 64 s para los ACVi. El test estadístico realizado comparando los Tc de los grupos CSFR y CCFR arrojó un p de 0.61. Comparando los Tc del grupo CCFR y ACVi se obtuvo un p de 0.0006. Entre los grupos CSFR y ACVi el p fue de 0.0003. El valor del Tc es mayor en el grupo ACVi con significancia estadística (Figura 5.7).

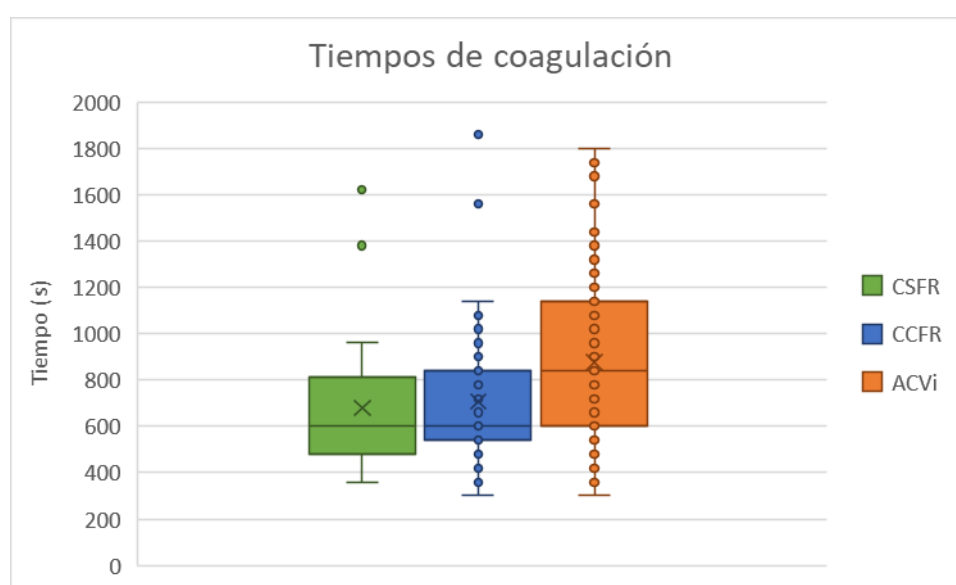


Figura 5.7. Distribución de tiempos de coagulación en cada grupo clínico estudiado. Distribución de tiempos de coagulación (Tc) para cada grupo. Se toma como Tc desde que comienza el proceso de formación del coágulo hasta el tiempo del pico máximo. CCFR y CSFR: $p = 0.61$. CCFR y ACVi: $p = 0.0006$. Existe una diferencia significativa entre grupo ACVi y grupos CCFR y CSFR, observándose valores más elevados para ACVi. CSFR: verde. CCFR: azul. ACVi: naranja.

En cuanto a la absorbancia máxima obtenida para cada grupo, el grupo CSFR presentó una media $\pm$ IC95% de 0.6684 ± 0.0549 UA, el grupo CCFR 0.7091 ± 0.0646 UA y el grupo ACVi 0.7676 ± 0.0524 UA. El análisis estadístico arrojó un p de 0.36 al comparar los grupos CSFR y CCFR, y un p de 0.12 al comparar los grupos CCFR y ACVi, no observándose diferencias significativas (Figura 5.8).

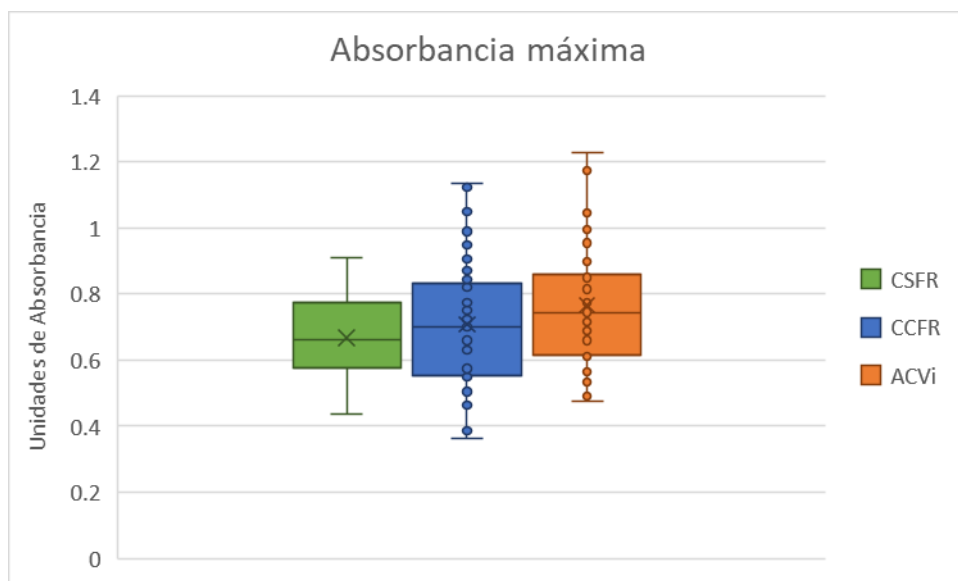


Figura 5.8. Distribución de absorbancia máxima en cada grupo clínico estudiado. Distribución de alturas de pico para cada grupo. CCFR y CSFR: $p = 0.36$. CCFR y ACVi: $p = 0.12$.

También se estudió la relación entre la altura de pico obtenida y la concentración de Fg medida mediante el método de Clauss, observándose una tendencia a correlación lineal, con un R^2 de 0.45 (Figura 5.9).

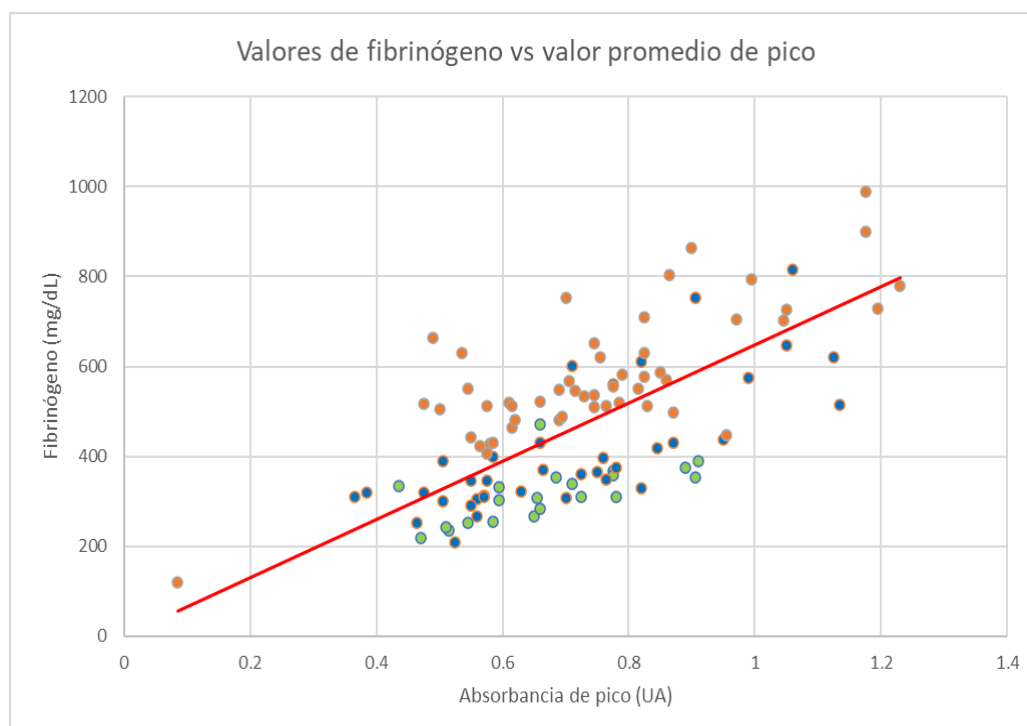


Figura 5.9. Correlación de la absorbancia máxima con la concentración de Fibrinógeno en cada individuo estudiado. Concentración de fibrinógeno en función de la absorbancia máxima, para cada muestra. Se observa una tendencia lineal al relacionar ambos valores, la cual se muestra en la línea roja. CSFR: verde. CCFR: azul. ACVi: naranja.

Los valores de Fg determinados con el método de Clauss (VR 200 – 400 mg/dL) fueron de 316.7 ± 24.3 mg/dL en el grupo CSFR (valores normales), 412.6 ± 45.4 mg/dL en el grupo CCFR (valores ligeramente aumentados), y 589.7 ± 36.3 mg/dL en el grupo ACVi (valores aumentados).

Finalmente, comparando los Tf (duración de la lisis) se observa una media $\pm$ IC95% de 1371 ± 140 s para los CSFR, 1340 ± 101 s para los CCFR y 1602 ± 124 s para el grupo ACVi. El análisis estadístico arrojó un p de 0.43 al comparar los Tf entre los grupos CSFR y CCFR, un valor p de 0.0017 al comparar los Tf entre CCFR y ACVi, y un valor p de 0.018 entre CSFR y ACVi. El grupo ACVi presenta un valor medio mayor a los otros dos grupos, con diferencia estadísticamente significativa (Figura 5.10).

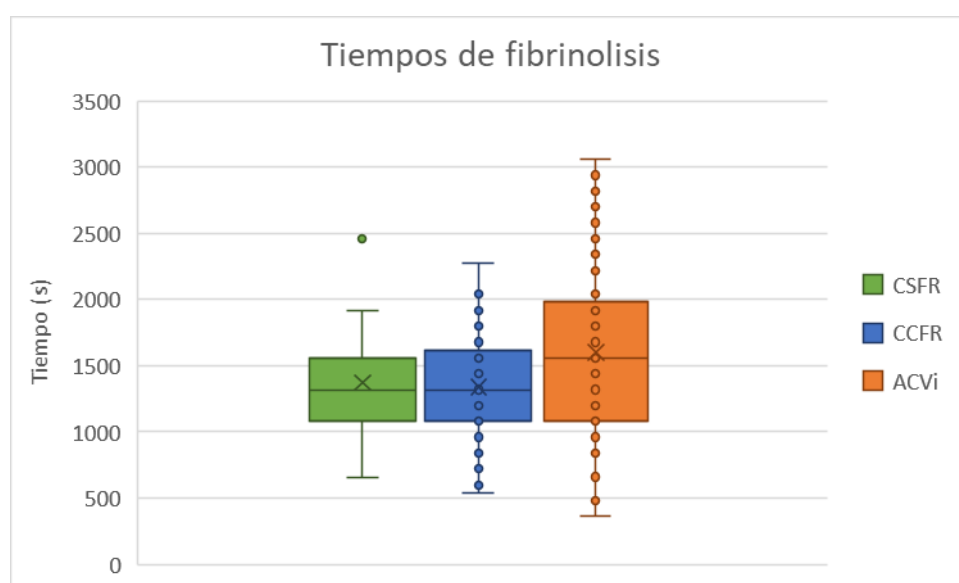


Figura 5.10. Distribución de tiempos de fibrinólisis en cada grupo clínico estudiado. Distribución de tiempos de lisis para cada grupo. Se toma como tiempo de lisis desde el tiempo del pico máximo (donde comienza la lisis) hasta el tiempo final. CCFR y CSFR: $p = 0.43$. CCFR y ACVi: $p = 0.0017$. CSFR y ACVi: $p = 0.018$. Existe una diferencia significativa entre grupo ACVi y grupos CCFR y CSFR, observándose valores más elevados para ACVi. CSFR: verde. CCFR: azul. ACVi: naranja.

Al analizar las relaciones Tf/Tc, se obtuvieron valores de 2.280 ± 0.292 para el grupo CSFR, 2.199 ± 0.238 para el grupo CCFR, y 1.952 ± 0.146 para el grupo ACVi, sin observarse diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.61$ entre CSFR y CCFR, y $p = 0.11$ entre CCFR y ACVi).

3. Discusión

La forma de la curva, la tasa de formación y lisis de Fb, y por lo tanto los valores de referencia para los parámetros derivados, varían considerablemente según el tipo y las concentraciones finales de los activadores de la coagulación, del tPA y del Ca^{2+} utilizados. De hecho, se ha demostrado que la activación con TF (como es este caso) resulta en una mayor formación neta de Fb que con trombina, con una formación máxima de Fb más alta, una integral más alta y un tiempo de lisis más prolongado.^[226] El ensayo también es sensible a la concentración de tPA, ya que una concentración final más alta de tPA aumenta la lisis neta, lo que conduce a una integral disminuida y tiempos de lisis más cortos. Todo esto hace que la comparación entre laboratorios sea difícil, y que los valores de referencia encontrados en bibliografía se tomen solamente como guía. Cabe señalar que también se ha descrito una considerable variación entre laboratorios incluso con el mismo protocolo y plasma de referencia, lo que indica que este ensayo de formación y lisis del coágulo es sensible incluso a pequeñas diferencias en el equipo, los reactivos y las habilidades manuales.^[227] Por lo tanto, es recomendable el establecimiento de intervalos de referencia locales, para implementar el ensayo con éxito en el laboratorio de investigación. En nuestro caso se contó con el conjunto de muestras control para comparar.

Se observaron curvas de fibrinoformación y fibrinolisis que permiten visualizar la tendencia de la formación y lisis de un coágulo. En los parámetros derivados Tc, absorbancia máxima y Tf, y en la relación Tf/Tc, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CSFR y CCFR. Cuando se compara con el grupo ACVi, se encuentran diferencias con significancia estadística para el Tc y para el Tf, siendo mayor en el grupo ACVi, en ambos casos. Este resultado es concordante con el hecho de que no hay diferencias al comparar las relaciones Tf/Tc entre controles y ACVi. Estos hallazgos apuntan a que los tiempos de coagulación serían mayores en los pacientes con ACVi, es decir que el tiempo que transcurre entre que comienza a formarse el coágulo y este alcanza su máxima turbidez es mayor; y que a su vez la lisis de este coágulo ocurre de forma más lenta. Según la Tabla 5.1, una lisis aumentada indica que por algún motivo la capacidad fibrinolítica está disminuía.

Otro hallazgo interesante es que la altura de pico de las curvas correlaciona positivamente con la concentración de Fg determinada por el método de Clauss, en todos los grupos estudiados. Y, si bien esos valores de absorbancia no mostraron diferencias significativas, la absorbancia máxima del grupo ACVi es mayor, al igual que la concentración de Fg de este grupo, que se encuentra por encima de los valores de referencia. Estas observaciones coinciden con lo que

indica la Tabla 5.1, que la absorbancia máxima aumentada puede ser causada por un incremento en la concentración de Fg plasmático.

Estos resultados pueden interpretarse como que en los pacientes ACVi el coágulo se forma durante más tiempo, alcanzando una altura de pico consistente con la cantidad de Fg que contienen, y luego tarda más tiempo en ser degradado. Cabe repetir que, sin embargo, la altura de pico no resultó ser diferente a la de los grupos controles.

Se han realizado estudios de este tipo en condiciones clínicas cardiovasculares como síndrome coronario agudo, enfermedad arterial coronaria, trombosis venosa profunda, embolismo pulmonar, y ACVi, donde el hallazgo frecuente fue un aumento en el tiempo de lisis.^[228,229] También se observó este aumento del Tf en DM, disfunción hepática y sepsis.^[230,231,232] En el caso de coágulos de pacientes ACVi, Undas *et al.*^[233] realizaron además estudios de permeación y microscopía electrónica y reportaron que estos presentan una red menos porosa y por tanto menos susceptible a fibrinólisis, siendo más compacta, con una mayor masa de coágulo y con fibras más gruesas. En otro trabajo, se reporta propiedades alteradas de coágulos de pacientes con síndrome coronario agudo, haciéndolos más resistentes a la fibrinólisis, y correlaciona estas características con estrés oxidativo, apuntando al Fg como responsable de las observaciones, por su susceptibilidad a PTMs oxidativas, que generan cambios en la funcionalidad del proceso hemostático.^[234]

Con la premisa de que el Fg de los pacientes con ACVi estaría nitrado, apoyada por los resultados expuestos y discutidos en los Capítulos 3 y 4, resulta interesante preguntarse cómo afectaría esta modificación a la fibrinoformación y fibrinólisis, y si esto es algo que estamos observando. Se han realizado estudios funcionales y de imagen en coágulos conteniendo Fg nitrado *in vivo* e *in vitro*, encontrándose cambios en la cinética, arquitectura, rigidez y fibrinólisis. Parastatidis *et al.*^[150] observaron un aumento en la absorbancia y turbidez final en muestras conteniendo Fg nitrado, un aumento en la velocidad inicial de formación del coágulo, lo cual asocian a una aceleración de la agregación lateral, y un aumento en la firmeza del coágulo, lo cual se asocia a disminución en la tasa de fibrinólisis. Sus hallazgos apuntan a una consecuencia funcional de la nitración del Fg, hacia una ganancia de función de este. Esos hallazgos concuerdan en parte con lo reportado por Vadseth *et al.*^[148] que al analizar la polimerización de muestras de pacientes con enfermedad coronaria arterial, y muestras de Fg nitrado *in vitro*, hallaron una fase de latencia más corta, un rápido aumento de la velocidad

inicial y una turbidez final aumentada. Una diferencia de este reporte con el anterior mencionado, es que no se observó alteración en la lisis.

Otro estudio interesante a comentar es el realizado por Ill-Raga *et al.*,^[153] quienes mediante TEM analizaron trombos formados en condiciones nitroxidantes, y observaron un aumento en el tiempo de formación de Fb, disminución en la firmeza y amplitud del coágulo, e inhibición en la fibrinólisis haciendo los coágulos más estables. Cabe aclarar que en este estudio los cambios observados pueden deberse a una nitración global de proteínas y factores de la cascada de la coagulación y fibrinólisis. Los autores plantean que la nitración de Fg enlentece la formación del coágulo, a la vez que lo hace más resistente a fibrinólisis y que este proceso puede ser una respuesta protectora para modular la coagulación de modo de permitir una perfusión parcial en las etapas iniciales de la hemostasis, pero que en etapa más avanzada del proceso estabiliza el coágulo.

Como se puede ver, los resultados en cuanto a la funcionalidad del Fg cuando está nitrado resultan controversiales, y esto puede deberse a las condiciones de nitración ensayadas, ya que en algunos estudios se utilizan muestras nitradas *in vivo* por el proceso fisiopatológico de distrés nitroxidativo, mientras que otras se tratan de Fg aislado nitrado *in vitro*. En el caso de lo expuesto en el presente Capítulo, el Fg habría sido nitrado *in vivo*, y los resultados se asemejan a lo reportado por Ill-Raga *et al.* Sin embargo, existe la necesidad de seguir estudiando la fibrinoformación y fibrinólisis, para corroborar estos resultados. También sería útil la observación de la estructura del coágulo, y la determinación de nitración en el mismo.

4. Conclusión

El presente Capítulo tuvo como objetivo el estudio de la funcionalidad del coágulo formado *ex vivo* a partir de plasma de paciente con ACVi. Existen múltiples reportes que indican una alteración en las características funcionales observables de estos coágulos, que se atribuyen a cambios estructurales, sin haber demasiada evidencia de la causa de esos cambios. Resulta interesante observar las alteraciones funcionales del coágulo, pues se evidencian clínicamente como una situación protrombótica debido a hipercoagulabilidad o a hipofibrinólisis, o hemorrágica debido a hipocoagulabilidad o hiperfibrinólisis. Del mismo modo, resulta interesante conocer las causas de esos cambios, que pueden ser alteraciones estructurales, causadas a su vez por situación de inflamación y distrés nitroxidativo. Este Capítulo hace las veces de pivote entre los dos anteriores en los que se generó evidencia de la existencia de nitroxidación en el Fg y plasma de pacientes con ACVi; y los dos siguientes, donde se ahondará

en la composición del coágulo formado *in vivo* (trombo) y se observará mediante experimentos *in silico* cómo la existencia de residuos de NO₂Tyr afecta la estructura regional de la molécula de Fg.

Capítulo 6: Análisis de 3-Nitrotirosina en Trombos de ACVi

1. Introducción

1.1. Composición de los Trombos

La introducción exitosa de la trombectomía endovascular ha cambiado notablemente el sistema de atención y la estrategia de tratamiento para el ACVi, incluyendo mejoras en cuanto a una extensión de la ventana terapéutica, el uso de imagenología avanzada para la selección de pacientes, el desarrollo de nuevas técnicas de trombectomía, el diagnóstico y el triaje prehospitario de los pacientes, y el surgimiento del concepto de centro de tratamiento de ACVi. Con todo esto ha habido una mejora en los resultados clínicos de los pacientes con ACVi y su pronóstico.^[235] Además, ha permitido el acceso a los trombos frescos, con la posibilidad de su investigación para el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas que permitan evaluar el contenido del trombo, la etiología del ACVi, la eficacia de la trombectomía,^[236,237] las complicaciones de esta y el tratamiento.^[238,239,240]

Estudios histológicos han mostrado una gran diversidad estructural en los trombos. Esta heterogeneidad está relacionada al lugar e instauración del trombo, por lo que las características del trombo pueden de alguna manera representar el mecanismo fisiopatológico de formación del mismo, que incluye factores como la hemodinámica, el flujo sanguíneo, el cizallamiento (shear) y la turbulencia en el sitio. Un trombo formado en una región de injuria endotelial es diferente al formado en un flujo sanguíneo estático o recirculante.^[241,242] Existen antecedentes que han mostrado que la proporción del contenido de eritrocitos o GR a agregados de Fb/Plaquetas (FP), pueden asociarse a la etiología del ACVi y el pronóstico.^[243,244] Tradicionalmente se sostiene que un trombo de origen cardíaco es dominante en GR y Fb debido a un flujo lento, mientras que el de origen arterial es dominante en plaquetas debido a un flujo rápido. Sin embargo, estudios más recientes con muestras más grandes mostraron que la dominancia de GR se observaba en los trombos arteriales o no cardíacos y la dominancia de FP en los trombos cardíacos.^[245,246]

Los leucocitos o glóbulos blancos (GB) también suelen estar presentes en el trombo. La enseñanza tradicional sobre la formación del trombo se ha centrado en plaquetas, GR y Fb. Sin embargo, los GB tienen un importante rol en la trombosis. Estudios recientes han demostrado el papel de los neutrófilos y las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs por su sigla en inglés) en la formación del trombo.^[247] Las NETs son estructuras en forma de red de fibras de ADN que comprenden histonas y gránulos que son liberados por neutrófilos activados. El papel principal de las NETs es atrapar y eliminar patógenos. Se ha demostrado que estas desempeñan

un papel importante en la trombosis arterial y venosa.^[248,249] Junto con la red de Fb, las NETs forman un andamio del trombo. También están activamente involucradas en la trombosis mediante su interacción con plaquetas, GR y moléculas de adhesión plaquetaria como el Fg, el VWF y la fibronectina. Existe una creciente comprensión de los mecanismos protrombóticos mediados por los GB (tromboinflamación).^[250] La tromboinflamación es un proceso patológico que relaciona la formación de trombos y la inflamación. Este término se utiliza para describir la interacción y la retroalimentación entre los mecanismos de coagulación y los procesos inflamatorios. En la tromboinflamación, los elementos de la respuesta inflamatoria, como las células inmunitarias y las citoquinas, pueden activar la coagulación sanguínea, mientras que los componentes de la coagulación, como el Fg y las plaquetas, pueden promover la inflamación. Este proceso es especialmente relevante en enfermedades cardiovasculares como ACVi donde la formación de trombos y la inflamación de los vasos sanguíneos juegan un papel crucial, así como en enfermedades autoinmunes, sepsis, y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Los trombos de ACVi son complejos y variados. Los componentes celulares y moleculares pueden estar presentes en diferentes proporciones en diferentes trombos, e incluso dentro de un mismo trombo. Aún queda mucho por aprender sobre qué relaciones existen entre la composición del trombo, las diversas características de la oclusión y los resultados del tratamiento. Una mejor comprensión de los tipos de trombos y sus características puede ser un avance significativo en el cuidado del ACVi. En última instancia, utilizar esta información para entender cómo interactúan los trombos con los medicamentos, los dispositivos de recuperación y el entorno puede permitir anticipar el comportamiento del trombo antes del tratamiento y ajustar las estrategias del mismo en consecuencia. Así como ayudar a avanzar en el desarrollo de tecnología para mejorar las opciones terapéuticas. Los enfoques interdisciplinarios que cubran aspectos clínicos, de ingeniería y científicos de la investigación sobre trombos serán clave para avanzar en la comprensión de estos y mejorar la atención del ACVi.

1.2.Fundamentos de SDS-PAGE

La SDS-PAGE es una técnica comúnmente utilizada en bioquímica, biología molecular, genética y biotecnología para separar macromoléculas biológicas como ADN, ARN y proteínas, según su tamaño. El principio básico implica utilizar SDS, un detergente surfactante aniónico que rompe enlaces no covalentes, para desnaturalizar las proteínas y proporcionarles

a las moléculas una carga negativa uniforme. Esto permite que las biomoléculas sean separadas en un gel de poliacrilamida según su tamaño, cuando se aplica un campo eléctrico.

Las muestras se preparan diluyéndolas adecuadamente en un buffer de muestra conteniendo glicerol para aumentar la densidad, azul de bromofenol para observar la migración de la muestra a través del gel, y SDS, y calentándolas 5 minutos a 95°C para su desnaturalización. Además, se suelen añadir agentes reductores de tiol como β -mercaptoetanol o DTT para reducir los enlaces disulfuro y eliminar las estructuras de orden superior en las muestras de proteínas. El SDS se une a las proteínas (~ 1.4 g de SDS se une a 1 g de polipéptido), rompiendo las estructuras secundarias y terciarias, linearizándolas y dotándolas de una carga negativa uniforme proporcional a su longitud (Figura 6.1). Esto significa que la relación m/z de los péptidos desnaturalizados es similar y su movilidad ya no depende de su estructura nativa, sino solo de su masa molecular. La concentración final de proteína debe ser >0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y entre 3-5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para obtener resultados óptimos.

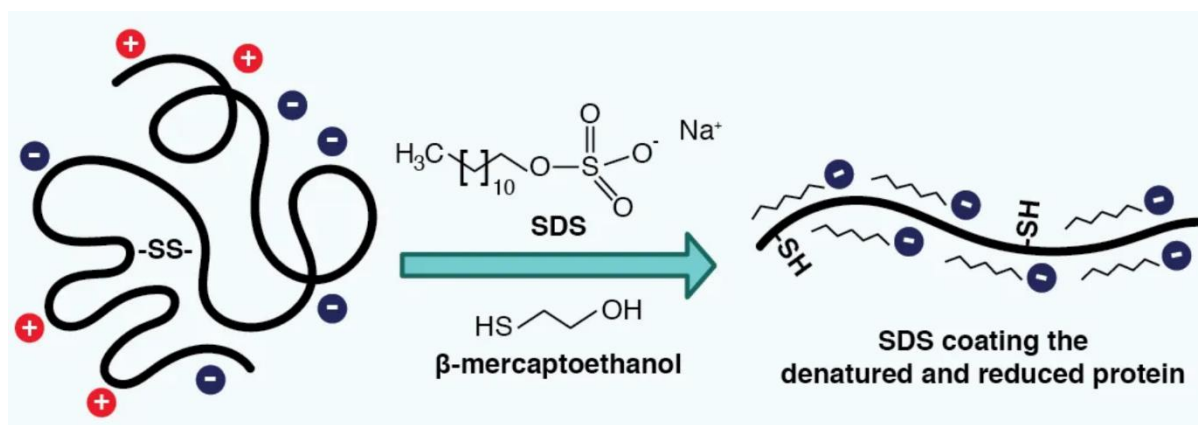


Figura 6.1. Dodecilsulfato de Sodio uniéndose a un polipéptido. Se agrega SDS a una muestra para ayudar a desnaturalizar las proteínas, así como para proporcionarles una carga negativa uniforme y una estructura 3D similar. Un agente reductor, como el β -mercaptoetanol, reduce los enlaces disulfuro, afectando aún más la estructura de la proteína.

Posteriormente se prepara un gel de poliacrilamida, que actúa como una malla tridimensional. Las propiedades del gel también afectan la movilidad de los complejos SDS-polipéptido. Los geles para PAGE están compuestos por una red polimérica inerte de acrilamida con un tamaño de poro definido, y se fabrican mediante la reticulación de acrilamida y bisacrilamida al añadir el agente de polimerización persulfato de amonio (APS) y el agente catalizador N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). El tamaño de los poros puede ajustarse alterando la concentración del gel, según el rango de tamaños de proteínas que se desea separar. Este actúa como un tamiz selectivo por tamaño, facilitando la separación de proteínas según su peso

molecular. Los geles de bajo porcentaje tienen poros grandes, permitiendo que la mayoría de las proteínas pasen a través de ellos, y por lo tanto pueden resolver proteínas de alto peso molecular. En contraste, los geles de alto porcentaje tienen poros pequeños, restringiendo severamente el paso de proteínas grandes y son, por lo tanto, mejores para resolver proteínas de bajo peso molecular. Además, los geles de gradiente proporcionan un rango de concentraciones de poliacrilamida dentro de un mismo gel, permitiendo resolver simultáneamente proteínas de diferentes tamaños. La Figura 6.2 muestra la estructura química del gel de poliacrilamida. El gel se monta típicamente de manera vertical entre dos cámaras de buffer y se conecta a los electrodos.

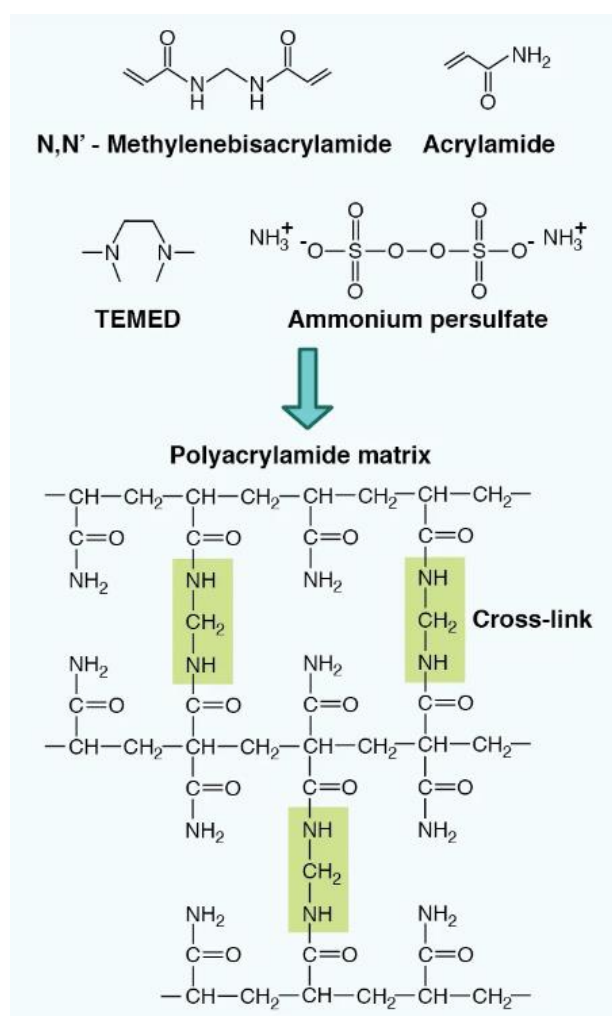


Figura 6.2. Estructura química de la matriz de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se preparan a partir de acrilamida y bisacrilamida reticuladas tras la adición del agente de polimerización persulfato de amonio y el agente catalizador TEMED.

Las muestras preparadas se cargan en pocillos en el gel y se aplica un campo eléctrico para realizar la electroforesis, de 100 – 200 V por 30 minutos – 2 horas. La electroforesis se refiere al movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico y requiere dos electrodos de carga opuesta (ánodo y cátodo) separados por un medio conductor (el buffer). Cuando moléculas cargadas, como proteínas y ADN, se exponen a un campo eléctrico bajo estas condiciones,

migran hacia el electrodo con su carga opuesta. La movilidad de las moléculas en la electroforesis en gel está dictada por la carga, tamaño y forma de las moléculas, así como por las condiciones de la electroforesis. Estas incluyen la fuerza iónica, el pH y la composición del buffer, la fuerza del campo eléctrico y las propiedades del gel. Es crucial que las muestras se carguen uniformemente a lo largo del gel y que se incluya buffer de muestra en todos los pocillos, incluyendo aquellos sin muestra, para asegurar que la electroforesis se realice correctamente.

Debido a la carga negativa proporcionada por el SDS, los polipéptidos migran hacia el ánodo (electrodo positivo). Las proteínas más pequeñas migran más rápidamente a través de los poros del gel, mientras que las proteínas más grandes se mueven más lentamente. Una vez que se ha completado la electroforesis, las proteínas han migrado a diferentes distancias según su tamaño, las mas pequeñas se encontrarán en la parte baja del gel, mientras que las más grandes se quedarán en la parte alta. Luego el gel se tiñe con un colorante específico para visualizar las proteínas. Cada banda en el gel corresponde a una proteína diferente o a una mezcla de proteínas de tamaño similar. Las posiciones de las bandas en el gel permiten determinar el tamaño aproximado de las proteínas en la muestra comparándolas con un marcador de peso molecular conocido que se ejecuta en paralelo. La Figura 6.3 muestra un esquema del proceso electroforético.

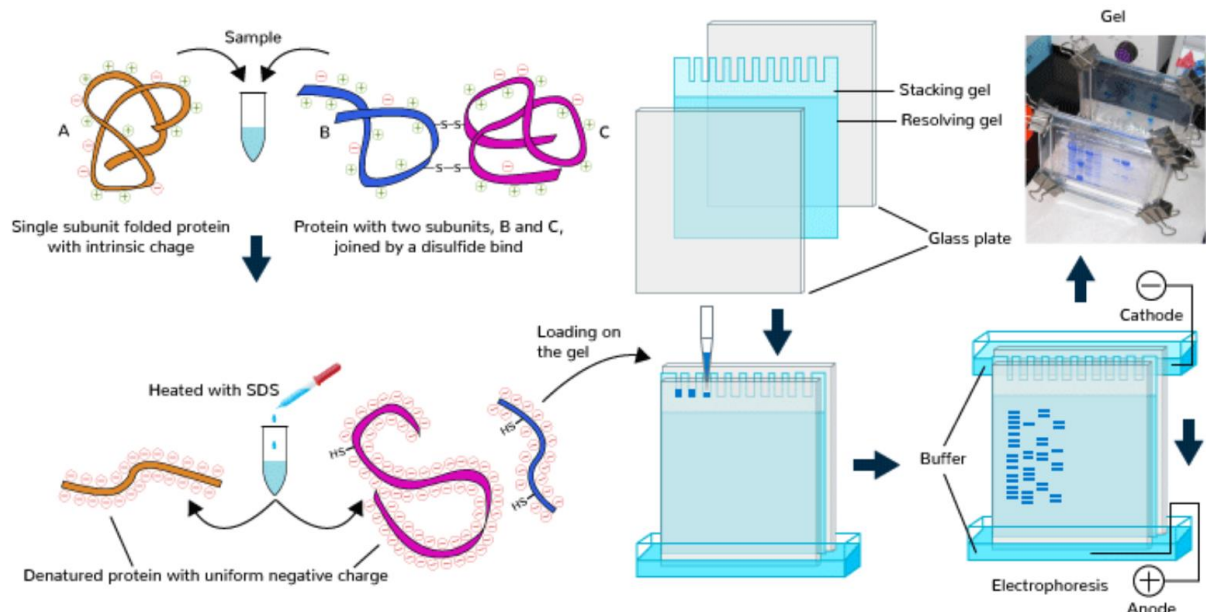


Figura 6.3. Flujo de trabajo de un experimento de SDS-PAGE. En primer lugar, se prepara la muestra agregando el surfactante aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS), un agente reductor para los enlaces disulfuro, y calentando a 95°C. De esta manera los péptidos de las proteínas desnaturalizadas y cargadas negativamente de forma uniforme se cargan en un gel de poliacrilamida con una sección menos concentrada al inicio (stacking gel) y una porción principal de una concentración de acuerdo al peso molecular de los polipéptidos que se quieren separar (resolving gel). Finalmente se procede a la electroforesis aplicando un voltaje que impulsa a los polipéptidos cargados negativamente hacia el ánodo, de forma que ocurre la separación según peso molecular.

Además de SDS-PAGE, también se puede usar una forma no desnaturalizante de electroforesis llamada PAGE nativa para separar proteínas. La PAGE nativa separa las proteínas según su relación m/z y forma, y por lo tanto puede proporcionar información sobre complejos proteicos. Una tercera forma de electroforesis llamada PAGE bidimensional (2D-PAGE) separa las proteínas en dos dimensiones. En la primera dimensión, se separan según su punto isoeléctrico, el pH en el cual no tienen carga neta, usando el enfoque isoeléctrico. En la segunda dimensión, se separan por masa. Esta técnica proporciona información más detallada para experimentos de proteómica.

Una desventaja de la SDS-PAGE es que, aunque es eficaz para separar proteínas por tamaño, no proporciona información sobre la estructura, función o PTMs de las proteínas. Además, algunas proteínas pueden no desnaturalizarse completamente o pueden formar agregados incluso en presencia de SDS. Sin embargo, resulta muy útil y sigue siendo utilizada en diversas aplicaciones, como la caracterización de proteínas, el análisis de pureza, la cuantificación de proteínas y la preparación de muestras para análisis adicionales, como Western Blotting. Esta técnica es fundamental en laboratorios de investigación y diagnóstico debido a su capacidad para separar y analizar proteínas de manera precisa y reproducible.

1.3. Fundamentos del Western Blotting

El WB es una técnica ampliamente utilizada para detectar y analizar proteínas específicas en una muestra compleja. Resulta sorprendente saber que su desarrollo se remonta a no hace mucho tiempo, finales de la década de 1970. De hecho, las metodologías esenciales del WB, incluida la SDS-PAGE^[251] y los anticuerpos monoclonales con especificidad de antígeno,^[252] se establecieron en 1970 y 1975, respectivamente. En 1975, Edwin Southern inventó la técnica conocida como “Southern Blot”, en la que los fragmentos de ADN se separan mediante electroforesis según su tamaño y luego se transfieren a una membrana de nitrocelulosa para su detección.^[253] Esta metodología fue rápidamente seguida dos años después por la invención del “Northern Blot”, que podía detectar moléculas específicas de ARN utilizando sondas de ADN marcadas radiactivamente.^[254] Inspirado por el Northern Blot, W. Neal Burnette, un postdoctorado en el Fred Hutchinson Cancer Research Center, desarrolló un método para visualizar proteínas separadas por SDS-PAGE utilizando anticuerpos monoclonales. Denominó a este método “Western Blot”, en alusión a sus predecesores. Curiosamente, el manuscrito que detallaba esta técnica fue inicialmente rechazado, con los revisores criticando el nombre del método como “flippant and frivolous whimsy”.^[255] A pesar de esto, el documento

fue ampliamente circulado y finalmente publicado en 1981.^[256] Los grupos de investigación de George Stark en la Universidad de Stanford y de Harry Towbin en el Instituto Friedrich Miescher en Suiza publicaron técnicas de inmunotransferencia similares aproximadamente al mismo tiempo.^[257,258] Desde entonces, el WB, también conocido comúnmente como inmunoblot, se ha convertido en una técnica esencial y ubicua en los laboratorios de biología y medicina de todo el mundo.

El WB se basa en la separación electroforética de proteínas de una mezcla compleja según su masa, la transferencia de estas proteínas a una matriz sólida y la inmunodetección de proteínas específicas de interés en la matriz utilizando anticuerpos.

Primero se prepara la muestra mediante SDS-PAGE. Posteriormente las proteínas separadas en el gel se transfieren a una membrana (generalmente de nitrocelulosa o PVDF) mediante un proceso de transferencia electroforética, con el mismo principio de migración de moléculas cargadas negativamente hacia el ánodo. Este paso es crucial para inmovilizar las proteínas en una superficie sólida, donde pueden ser reveladas con anticuerpos. Este proceso es necesario porque las proteínas son más accesibles a los anticuerpos en la superficie de estas membranas y los geles de PAGE son difíciles de manipular una vez retirados de sus moldes. Después de la transferencia, se puede usar una tinción de proteína total, como Ponceau S, para visualizar la eficiencia de la transferencia.

Para el electroblotting húmedo, el gel y la membrana se colocan juntos, con papel de filtro absorbente y esponjas, y se fijan en un cassette para evitar la formación de burbujas de aire entre el gel y la membrana. El "sándwich" se sumerge verticalmente en un buffer de transferencia conductor y se expone a un campo eléctrico. Bajo estas condiciones, las proteínas cargadas negativamente migran fuera del gel hacia el electrodo cargado positivamente y se inmovilizan en la membrana. El electroblotting húmedo es un método de transferencia de alta eficiencia que es adecuado para transferir proteínas de bajo a alto peso molecular (>100 kDa), pero es un proceso que consume tiempo, típicamente requiriendo entre ~1 hora (100 V) y toda la noche (30 V) a 4°C. La Figura 6.4 muestra un esquema del sándwich de transferencia.

Las membranas más comunes utilizadas para la inmunotransferencia son la nitrocelulosa y el PVDF. La nitrocelulosa puede inmovilizar proteínas y glicoproteínas con alta eficiencia a través de interacciones hidrofóbicas, pero no puede ser reprocesada muchas veces debido a la fragilidad de la nitrocelulosa. Al igual que la nitrocelulosa, el PVDF tiene una alta capacidad de unión a proteínas; sin embargo, el PVDF es altamente hidrofóbico y debe ser prehumedecido

con metanol antes de su uso. Al ser menos quebradizo que la nitrocelulosa, las membranas de PVDF pueden ser reprocesadas muchas veces. Tanto las membranas de nitrocelulosa como las de PVDF están disponibles en una variedad de tamaños de poro. Mientras que las membranas con tamaño de poro de 0.45 μm son generalmente aplicables a la mayoría de los experimentos, las membranas con tamaño de poro de 0.1 – 0.2 μm son más adecuadas para la transferencia de proteínas de bajo peso molecular.

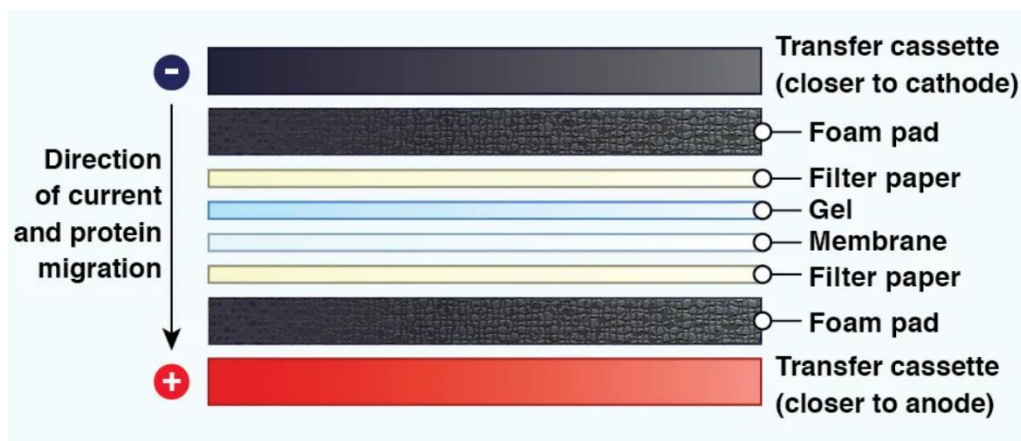


Figura 6.4. Organización de un "sándwich" de transferencia para el electroblotting húmedo. Durante la transferencia, las proteínas cargadas negativamente migrarán fuera del gel, hacia el electrodo cargado positivamente y se transferirán a la membrana.

Para la inmunodetección, primero la membrana se incuba con una solución bloqueadora para cubrir los sitios no específicos y prevenir la unión no específica de anticuerpos en pasos posteriores. Dado que las membranas de fase sólida utilizadas en la inmunotransferencia tienen una alta afinidad por las proteínas, los anticuerpos aplicados a la membrana pueden adherirse a ella de manera inespecífica. Para prevenir esta unión de fondo y mejorar la relación señal-ruido en el paso de detección, la membrana debe bloquearse antes de la incubación con anticuerpos. Los reactivos a utilizar para el bloqueo y el tiempo de incubación deben determinarse empíricamente. Los agentes de bloqueo comunes incluyen leche descremada y BSA. Estos pueden solubilizarse en solución salina tamponada con Tris (TBS) o PBS, y se puede añadir 0.1% de Tween-20 para ayudar a prevenir interacciones inespecíficas. En particular, se debe usar TBS si el método de detección utiliza fosfatasa alcalina (AP), ya que PBS puede interferir con la actividad enzimática de AP. No se debe usar azida sódica en los tampones si se va a utilizar un anticuerpo secundario conjugado con HRP, ya que la azida inactiva la HRP.

Para la detección con anticuerpos se lleva a cabo una incubación con anticuerpo primario y una incubación con anticuerpo secundario. Entre los pasos de incubación con anticuerpos, la membrana debe lavarse con TBS + 0.1% Tween 20 (TBST) o PBS + 0.1% Tween 20 (PBST) para eliminar los anticuerpos no unidos y reducir la señal de fondo. Mientras que un lavado insuficiente puede resultar en una alta señal de fondo, un lavado excesivo puede reducir la relación señal-ruido. Para la incubación con anticuerpo primario la membrana bloqueada se incuba con un anticuerpo primario específico que reconoce la proteína de interés, en una dilución óptima que se debe determinar empíricamente (aunque hay rangos recomendados), por 1 hora a temperatura ambiente o de un día para el otro a 4°C. Este anticuerpo se une específicamente a la proteína objetivo en la membrana. Para la incubación con anticuerpo secundario la membrana se incuba con un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario según su especie e isotipo (esto permite además una amplificación de la señal pues varios anticuerpos secundarios pueden unirse al primario), por 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario está conjugado con una enzima (como HRP) o un fluoróforo para permitir la detección.

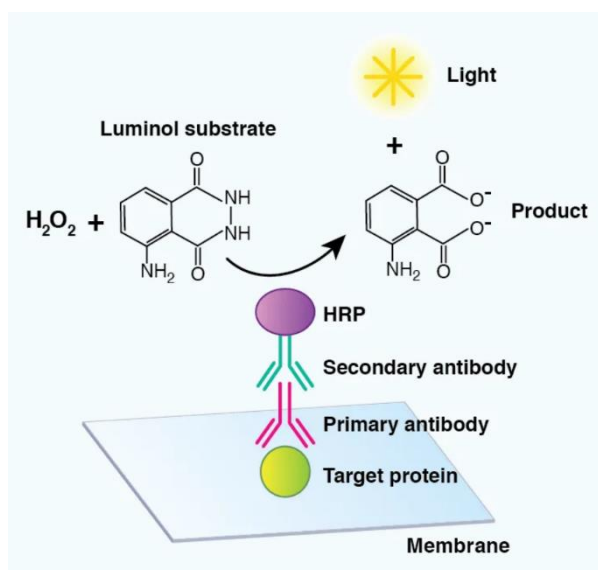


Figura 6.5. Detección de proteínas objetivo usando un sustrato basado en quimioluminiscencia. Un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) convertirá el luminol en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en una señal quimioluminiscente y un producto de descomposición (3-aminofalato), lo que permite la visualización de una proteína objetivo.

Para la detección se realiza una reacción enzimática o de fluorescencia. Si el anticuerpo secundario está conjugado con una enzima, se añade un sustrato adecuado que la enzima convierte en un producto detectable (luminiscente o colorimétrico). Si está conjugado con un fluoróforo, la detección se realiza mediante un escáner o cámara de fluorescencia. La Figura

6.5 muestra un ejemplo de reacciones de detección. El resultado de la reacción se visualiza y se documenta. Las bandas correspondientes a la proteína de interés aparecen en la membrana y su intensidad puede ser cuantificada.

Para el análisis de los resultados, estos se comparan con controles positivos y negativos para asegurar la especificidad y validez de la detección. Y la intensidad de las bandas puede ser cuantificada por densitometría mediante software de procesamiento de imágenes para determinar la cantidad relativa o absoluta de la proteína de interés.

El WB es una técnica específica pues se basa en el uso de anticuerpos que reconocen específicamente la proteína de interés. Además, es muy sensible ya que esta técnica puede detectar proteínas en concentraciones muy bajas debido a la amplificación de la señal mediante el anticuerpo secundario conjugado con una enzima. Y es robusta pues con el uso de controles adecuados y condiciones de bloqueo efectivas se minimizan las uniones no específicas y se mejora la precisión del ensayo. La Figura 6.6 muestra el flujo de trabajo completo en un experimento de WB típico.

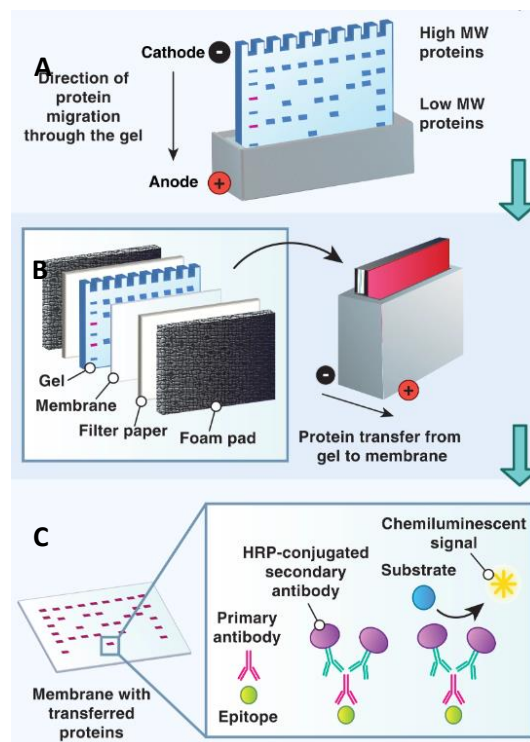


Figura 6.6. Flujo de trabajo en un experimento de Western Blot típico. Luego de la preparación de la muestra que implica desnaturalización y reducción, se procede a la electroforesis en gel (A). En este punto se carga una cantidad adecuada de muestra en el gel y se procede a la electroforesis para que las proteínas se separen de acuerdo a su peso molecular. Luego se realiza la transferencia a membrana (B) para lo cual se prepara un sándwich con el gel cercano al cátodo (-) y la membrana cercana al ánodo (+), para que las proteínas cargadas negativamente migren desde el gel hacia la membrana. En (C) se muestra la inmunodetección, posterior a una tinción de proteína total para chequear la eficiencia de la transferencia.

Se trata de una herramienta poderosa para el análisis cualitativo y cuantitativo de proteínas, ampliamente utilizada en investigación biomédica, diagnóstico clínico y desarrollo de fármacos.

1.4.Fundamentos de la Inmunoprecipitación

La IP es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular y bioquímica para aislar y purificar una proteína específica de una muestra compleja utilizando un anticuerpo que se une específicamente a esa proteína.

La IP se desarrolló inicialmente como una adaptación de la cromatografía de afinidad en columna tradicional, que implica permitir que la muestra, el lavado y otras soluciones pasen a través de una columna empaquetada con resina porosa (típicamente agarosa en forma de perlas) sobre la cual se ha inmovilizado un anticuerpo específico para el objetivo. Sin embargo, en lugar de usar una columna empaquetada, la IP utiliza una pequeña cantidad de resina de agarosa en un tubo de microcentrífuga, y los pasos de incubación se realizan por lotes. También se pueden utilizar perlas magnéticas.^[259]

El primer paso en la IP es seleccionar un anticuerpo que sea específico para la proteína de interés. Este anticuerpo debe tener una alta afinidad y especificidad para la proteína objetivo. Luego se procede a la preparación de la muestra: la muestra biológica, que puede ser un lisado celular, un extracto tisular o un fluido biológico, se prepara de manera que las proteínas estén en solución. La muestra puede contener detergentes y otras sustancias para ayudar a solubilizar las proteínas y mantenerlas estables.

El anticuerpo específico para la proteína de interés se añade a la muestra y este anticuerpo se unirá a la proteína objetivo, formando un complejo antígeno-anticuerpo. Se continúa con la captura del complejo antígeno-anticuerpo: para aislar el complejo antígeno-anticuerpo, se utilizan soportes sólidos, como perlas de agarosa o perlas magnéticas, que están recubiertas con proteínas (como proteína A, proteína G o anticuerpos secundarios) que pueden unirse a la región Fc del anticuerpo. Otro flujo de trabajo posible es la incubación del anticuerpo con las perlas para su inmovilización mediante unión no covalente (también puede ser covalente agregando ciertos reactivos), y luego se incuba con la muestra conteniendo la proteína objetivo para la formación del complejo antígeno-anticuerpo-perla.

Aunque el enfoque del anticuerpo pre-inmovilizado es más comúnmente utilizado para la IP, el uso de anticuerpo libre para formar complejos inmunes es beneficioso si la proteína objetivo

está presente en bajas concentraciones, si el anticuerpo tiene una afinidad de unión débil para el antígeno o si la cinética de unión del anticuerpo al antígeno es lenta.

Posteriormente la mezcla se somete a varios lavados para eliminar proteínas y otros componentes no específicos que no están unidos a las perlas, que implican centrifugación en caso de perlas de agarosa, y un imán en caso de perlas magnéticas. Este paso es crucial para reducir el ruido de fondo y aumentar la pureza de la proteína inmunoprecipitada.

La proteína de interés, ahora unida a las perlas a través del anticuerpo, se separa del soporte sólido en un proceso denominado elución. Esto se puede hacer mediante la adición de un tampón de elución que desnaturaliza las proteínas o mediante condiciones que disocian específicamente el complejo antígeno-anticuerpo.

Por último, se procede al análisis. La proteína inmunoprecipitada puede analizarse mediante técnicas como SDS-PAGE, WB o MS para identificar y caracterizar la proteína y sus posibles PTMs.^[260]

Esta técnica se utiliza en el presente Capítulo, para enriquecer pools de trombos lisados en proteínas conteniendo NO₂Tyr, utilizando un anticuerpo anti-NO₂Tyr unido a perlas magnéticas. La Figura 6.7 presenta un esquema de trabajo para la IP utilizando perlas magnéticas.

Las partículas magnéticas han reemplazado en gran medida a las perlas de agarosa como el soporte preferido para la IP y otros procedimientos de purificación por afinidad a microescala. Las partículas magnéticas son sólidas y esféricas, y la unión del anticuerpo se limita a la superficie de cada perla. Aunque no tienen la ventaja de un centro poroso para aumentar la capacidad de unión, las perlas magnéticas son significativamente más pequeñas que las perlas de agarosa (diámetro de 1 a 4 μm), lo que colectivamente les da una superficie suficiente para una unión de anticuerpos de alta capacidad.

Se utilizan imanes de alta potencia para localizar las perlas magnéticas al costado del tubo de incubación y alejarlas para permitir la aspiración de la matriz de la muestra sin el riesgo de aspirar también los complejos inmunes unidos a las perlas. La separación magnética evita la centrifugación, que puede romper las uniones débiles entre el anticuerpo y el antígeno y causar la pérdida de la proteína objetivo. Facilitan el pipeteo manual de las soluciones de las perlas, y hay instrumentación disponible para automatizar completamente los procedimientos con perlas magnéticas.

La IP es una herramienta poderosa para estudiar las interacciones proteína-proteína, identificar proteínas asociadas a una proteína de interés y analizar PTMs como fosforilaciones, acetilaciones y nitraciones, entre otras.

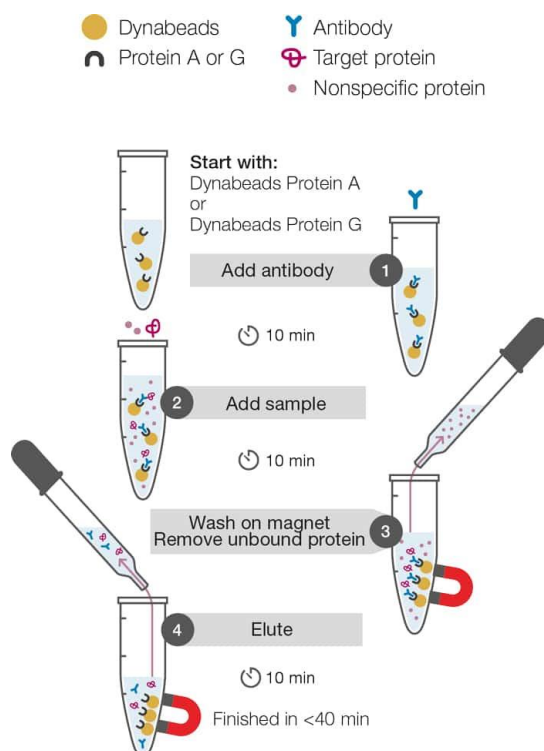


Figura 6.7. Flujo de trabajo en un experimento de inmunoprecipitación con perlas magnéticas. Un anticuerpo (monoclonal o policlonal) contra una proteína específica se pre-inmoviliza en las perlas magnéticas acopladas a proteína G o A, y luego se incuba con la muestra que contiene la proteína objetivo. Durante el período de incubación, la agitación suave de la muestra permite que el antígeno objetivo se una al anticuerpo inmovilizado. Los complejos inmunes inmovilizados se recogen del lisado con la aplicación de un imán, se eluyen del soporte y se analizan según la naturaleza del antígeno objetivo. Cada paso implica una incubación, seguida por la recolección de las perlas y la eliminación de la solución. Los pasos de lavado también se incluyen después de cada paso de incubación. La elución durante el paso final típicamente implica calentar las perlas en un tampón de carga de muestras para la SDS-PAGE, lo que resulta en la desnaturalización de las proteínas (incluyendo el anticuerpo).

1.5. Análisis por Espectrometría de Masas: Orbitrap

En este Capítulo se realiza análisis mediante LC-MS/MS, utilizando un espectrómetro de masas híbrido que combina las tecnologías de LIT (que se detalló en el Capítulo 3) y el analizador de masas Orbitrap (LIT-Orbitrap).

La tecnología Orbitrap es una técnica avanzada de MS utilizada para el análisis preciso y de alta resolución de iones. Fue desarrollada por Alexander Makarov mientras trabajaba en Thermo Fisher Scientific. El concepto se presentó por primera vez en 2000 y se integró en los instrumentos comerciales de MS de Thermo Fisher Scientific a mediados de la década de 2000.

La tecnología ha evolucionado y mejorado desde entonces, convirtiéndose en una herramienta fundamental en el campo de la proteómica y otros campos de investigación analítica.^[261]

La tecnología Orbitrap se basa en la captura de iones en un campo electrostático creado entre un electrodo central con forma de huso y un electrodo exterior cilíndrico. Los iones son inyectados en el detector Orbitrap, donde se mueven en trayectorias orbitales alrededor del electrodo central debido a la combinación de fuerzas electrostáticas. La frecuencia de oscilación de los iones es proporcional a su relación m/z .

A medida que los iones oscilan, generan una corriente de imagen que se detecta y se convierte en una señal eléctrica. La señal se transforma mediante una Transformada de Fourier (FT) para obtener un espectro de masas con alta resolución y precisión. Esta tecnología permite obtener una resolución masiva muy alta, típica en el rango de 100000 a 1000000 para una relación m/z de 200, y una precisión en la determinación de masas mejor que 2 partes por millón (ppm). La Figura 6.8 muestra la geometría del Orbitrap y una trayectoria de ion estable.

Presenta como ventajas una alta resolución y precisión en la determinación de masas, un amplio rango dinámico, y la capacidad para analizar una amplia variedad de moléculas, desde pequeños metabolitos hasta proteínas grandes y complejas.

Como ya se dijo, en este Capítulo se utiliza un equipo LIT-Orbitrap, que es un espectrómetro de masas híbrido, aprovechando las ventajas de ambos tipos de analizadores de masas para proporcionar alta sensibilidad, alta resolución y capacidad de realizar MS en tándem. El funcionamiento implica una ionización inicial de la muestra, mediante ESI (luego de la separación mediante HPLC). Los iones generados se introducen en la LIT, que captura y almacena los iones. Aquí dentro los iones de interés se pueden fragmentar dentro de la trampa lineal mediante CID. Esta etapa de fragmentación proporciona información estructural sobre los iones. Los iones seleccionados o fragmentados en la LIT se transfieren al Orbitrap.

Para el análisis en el Orbitrap los iones entran en él, donde se mueven en órbitas alrededor del electrodo central. Como ya se dijo, la frecuencia de oscilación de los iones, que depende de su relación m/z , genera una corriente de imagen detectada por el sistema. Y esta señal se convierte en un espectro de masas mediante una FT, proporcionando datos de alta resolución y precisión. Los datos del espectro de masas obtenidos del Orbitrap se analizan para identificar y cuantificar las moléculas presentes en la muestra. La combinación de la LIT y el Orbitrap permite realizar experimentos de MS/MS de alta resolución, proporcionando información detallada sobre la estructura de las moléculas.

El LIT-Orbitrap es una herramienta poderosa en el campo de la MS, utilizada en diversas áreas de la investigación científica debido a su capacidad para proporcionar datos de alta resolución y precisión, junto con una alta sensibilidad y capacidad de fragmentación.

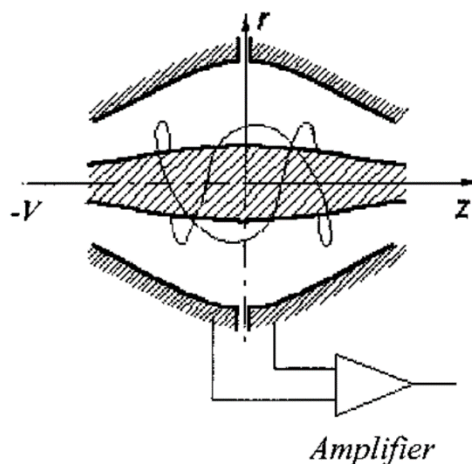


Figura 6.8. Geometría del analizador de masas Orbitrap. La trampa consiste en un electrodo externo en forma de barril y un electrodo central en forma de huso a lo largo del eje z . Las trayectorias estables combinan la rotación alrededor del electrodo central con oscilaciones a lo largo del eje, resultando en una espiral intrincada. La corriente de imagen se detecta en los electrodos externos divididos y se amplifica mediante un amplificador diferencial. El voltaje de la señal inducida por las oscilaciones de los iones puede obtenerse utilizando el teorema de reciprocidad de Green. El teorema proporciona la relación entre la carga de imagen Q inducida en los electrodos por una carga q en un punto, y el cambio de potencial $\Delta\phi$ inducido en el mismo punto por el voltaje ΔU aplicado a los mismos electrodos en ausencia de cualquier carga. La corriente de imagen se amplifica y procesa mediante FT. Imagen extraída de "Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis" de A. Makarov.^[261]

2. Resultados

Se realizó la búsqueda de proteínas nitradas en trombos de pacientes con ACVi tratados con trombectomía mecánica. Once trombos fueron analizados mediante SDS-PAGE y WB, y un grupo de ellos mediante LC-MS/MS después de IP con anticuerpos anti-NO₂Tyr.

2.1. Caracterización de Trombos

Los trombos analizados mostraron diferencias en cuanto a características como tamaño, textura y color, y esto se refleja en sus patrones de proteínas cuando el sobrenadante y el extracto de cada trombo se procesaron en SDS-PAGE. Los trombos mostraron una amplia variación en su composición, con patrones de proteínas diferentes para cada uno, como se observa en el gel. Además, el patrón de proteínas no es el mismo en el sobrenadante y en el extracto del mismo trombo. En la Figura 6.9 se muestran algunos ejemplos de trombos analizados y los SDS-PAGE de sus extractos y sobrenadantes.

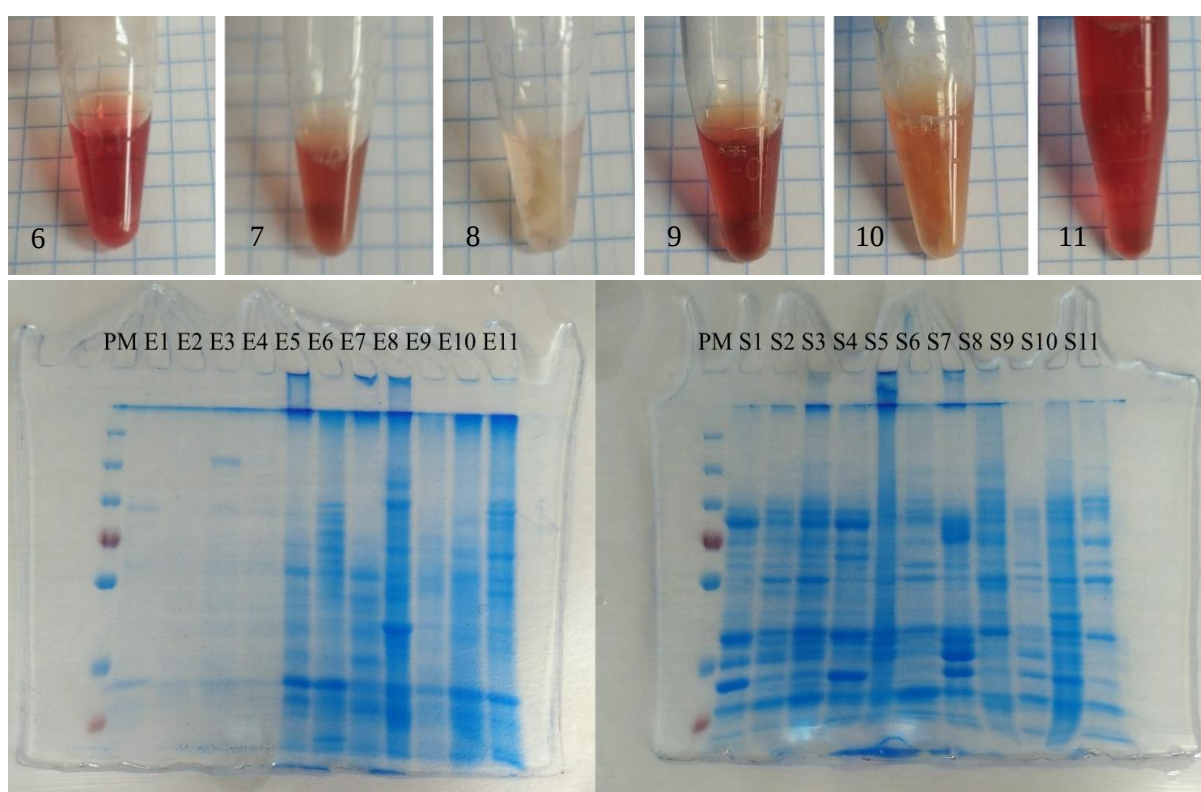


Figura 6.9. Caracterización electroforética de los trombos estudiados. Arriba: algunos de los trombos analizados. Abajo: SDS-PAGE 10% en condiciones reductoras de extractos (E) y sobrenadantes (S) de los 11 trombos analizados, teñidos con Coomassie blue.

Se realizaron también WB utilizando como anticuerpo primario anti-NO₂Tyr, anti-cadena α de Fg y anti-cadena β de Fg. El revelado de las membranas mostró la presencia de fragmentos de Fg de variados tamaños, como era de esperarse, así como bandas nitradas, correspondientes a Fg y otras proteínas. El análisis mediante WB mostró que parece haber residuos de NO₂Tyr en los trombos, principalmente en los sobrenadantes, en cantidades bajas. También se observaron fragmentos de Fg de las cadenas A α y B β con varios PM, tanto en los extractos como en los sobrenadantes. En la Figura 6.10 se muestran las imágenes de WB.

2.2. Inmunoprecipitación y análisis mediante LC-MS/MS

En primer lugar, se probó el método de IP con perlas magnéticas utilizando un estándar de Fg-NO₂Tyr y Fg sin nitrar. Los sobrenadantes y eluídos obtenidos en los diferentes pasos, así como un control, se cargaron en un gel para SDS-PAGE, y se realizó WB con anti-NO₂Tyr. Se obtuvo como resultados que es posible recuperar polipéptidos conteniendo NO₂Tyr, de las tres cadenas del Fg, obteniéndose además cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas de captura (no se muestran estos registros).

Previo a la IP con el anticuerpo anti-NO₂Tyr acoplado a perlas magnéticas de los trombos, se realizaron cuatro pools de estos, según criterios de color, tamaño y escala NIHSS del ACVi (Tabla 6.1). Se realizó la IP de esos pools y los productos obtenidos fueron analizados mediante SDS-PAGE en condiciones de reducción. La IP de pools de trombos, monitoreada por SDS-PAGE, mostró moléculas de pesos moleculares variados en los carriles de las muestras, no presentes en los carriles de control, lo que sugiere que ocurrió la captura de polipéptidos que contienen NO₂Tyr. La Figura 6.11 muestra este gel.

Se seleccionó uno de los productos de la IP de los pools, el del pool C, ya que mostraba varias bandas en el gel que resultaban de interés (se trata del pool con mayor índice en la escala NIHSS). Y de ese carril se seleccionaron tres bandas para realizar LC-MS/MS, con el fin de identificar proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-NO₂Tyr. El análisis de LC-MS/MS de las bandas seleccionadas en el SDS-PAGE de las proteínas inmunoprecipitadas del pool de trombos seleccionado reveló la presencia de fragmentos de proteínas relacionadas con el sistema inmunológico, el transporte de oxígeno, la hemostasis y componentes celulares y extracelulares. Estas proteínas son potencialmente nitradas, ya que fueron el producto de la IP con un anticuerpo anti-NO₂Tyr. En la Tabla 6.2 se listan las proteínas encontradas. No en todas las proteínas encontradas se identificó la modificación Y⁺⁴⁵. En la banda 1, se encontró la modificación Y⁺⁴⁵ en las siguientes posiciones: Y¹⁴⁰ de cadena γ de Fg; Y³²⁰ de MMP9; Y¹⁶¹ de IgG3 cadena pesada región constante; Y¹⁵⁸ de IgG4 cadena pesada región constante; Y¹¹³ e Y¹¹⁴ de cadena pesada región variable; Y⁷¹ e Y⁸⁵ de cadena liviana lambda constante; Y¹⁸⁰ de polipéptido 5 tipo lambda. En la banda 2: Y²⁰⁸ de inmunoglobulin heavy constant gamma 3; Y¹⁵⁷ de inmunoglobulin heavy constant gamma 2. Banda 3: Y⁸⁵ de inmunoglobulin kappa constant; Y⁷¹ e Y⁸⁵ de inmunoglobulin lambda constant 2; Y¹⁷⁹ e Y¹⁹³ de inmunoglobulin lambda-like polypeptide 5; Y⁷¹ e Y⁸⁵ de inmunoglobulin lambda constant 6; Y⁷¹ e Y⁸⁵ de inmunoglobulin lambda constant 7.

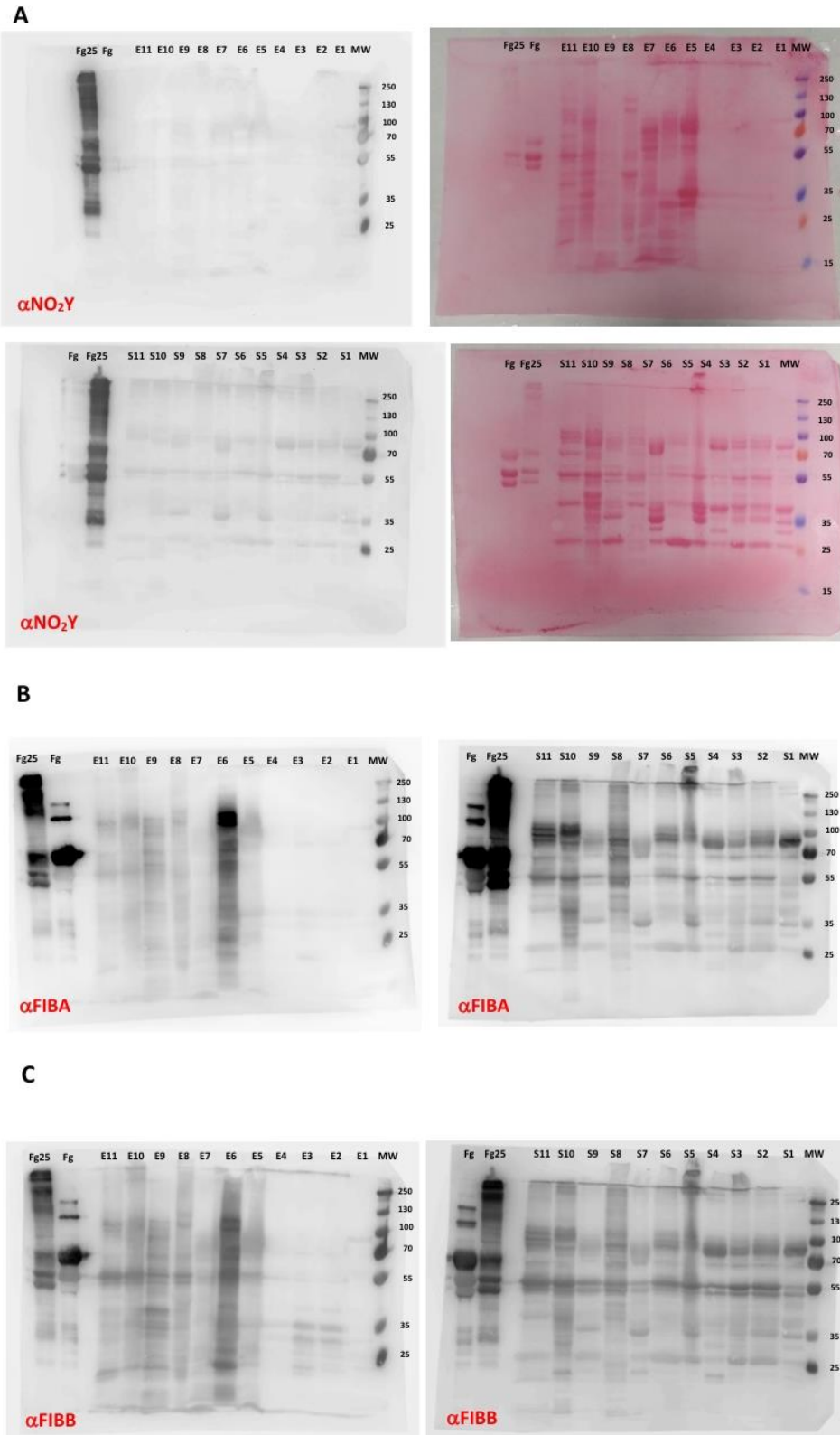


Figura 6.10. Western blotting de extractos y sobrenadantes de los trombos estudiados. A: a la izquierda se muestran los resultados del WB utilizando anti-NO₂Tyr (αNO₂Y) como anticuerpo para la inmunodetección, y a la derecha se muestra la tinción con rojo Ponceau para la detección de proteína total. Arriba están los extractos (E1-E11) y abajo los sobrenadantes (S1-S11). **B:** resultados del WB utilizando anti-cadena alfa del Fg (αFIBA) como anticuerpo para la inmunodetección. **C:** resultados del WB utilizando anti-cadena beta del Fg (αFIBB) como anticuerpo para la inmunodetección. MW: marcador de peso molecular. Como controles se corrieron Fg sin nitrar (Fg) y Fg-NO₂Tyr (Fg25).

Pool (V)	Trombos incluidos (volúmenes de E y S)	Color	Tamaño	NIHSS
A (280 μ L)	1 (S 30 μ L)	Blanco	Pequeño	10-15
	4 (S 160 μ L, E 60 μ L)	Rosa	Pequeño	
	8 (S 30 μ L)	Blanco	Grande	
B (565 μ L)	3 (S 200 μ L, E 60 μ L)	Rojo	Pequeño	15-20
	6 (S 100 μ L, E 15 μ L)	Rojo	Mediano	
	9 (S 170 μ L, E 20 μ L)	Rojo	Mediano	
C (1290 μ L)	2 (S 160 μ L, E 60 μ L)	Rojo	Grande	20-25
	11 (S 1000 μ L, E 70 μ L)	Rojo	Grande	
D (800 μ L)	10 (S 300 μ L, E 60 μ L)	Rosa	Grande	Desconocido
	7 (S 100 μ L)	Rojo	Mediano	
	5 (S 300 μ L, E 40 μ L)	Rojo	Grande	

Tabla 6.1. Pooles de trombos agrupados por color, tamaño y escala NIHSS. Se muestran los volúmenes de cada extracto (E) y sobrenadante (S) agregados a cada pool.

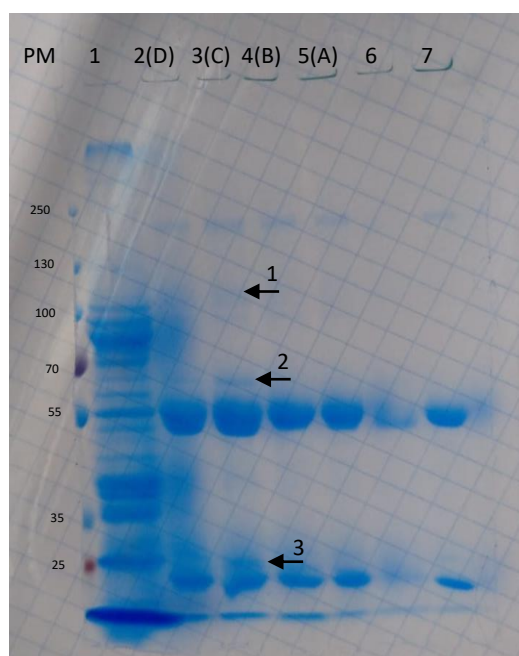


Figura 6.11. Electroforesis de inmunoprecipitados de pooles de trombos. SDS-PAGE para evaluar la inmunoprecipitación (IP) de pooles de trombos con un anticuerpo anti-NO₂Tyr. Carril 1: mezcla de 5 μ L de cada pool, antes de la IP. Carril 2: elución después de la IP del pool D. Carril 3: elución después de la IP del pool C. Carril 4: elución después de la IP del pool B. Carril 5: elución después de la IP del pool A. Carril 6: control del proceso sin añadir el anticuerpo (solo perlas y muestra, nótese que hay una cadena pesada y una cadena ligera de inmunoglobulina, correspondientes a las inmunoglobulinas humanas presentes en la mezcla de pools, que se unen a la proteína G en las perlas). Carril 7: control del proceso sin añadir la muestra (solo el anticuerpo anti- NO₂Tyr). Se muestran las bandas en el carril 3 que fueron seleccionadas para ser analizadas por LC-MS/MS (flechas).

Banda 1	Banda 2	Banda 3
Fibrinógeno cadena γ	Inmunoglobulina pesada constante	Inmunoglobulina kappa constante
Matriz metaloproteínasa-9 *	Hemoglobina subunidad beta	Inmunoglobulina lambda constante
Inmunoglobulina pesada constante	Mieloperoxidasa *	Inmunoglobulina lambda variable
Albúmina	Albúmina	Fibrinógeno cadena B β
Integrina beta 3 *	Inmunoglobulina pesada variable	Estomatina *
Inmunoglobulina kappa constante	Fibrinógeno cadena γ	Inmunoglobulina kappa variable
Alfa actinina-1 *	Hemoglobina subunidad alfa	Proteína de transporte de aniones Banda 3
Hemoglobina subunidad beta	Integrina beta-3	Hemoglobina subunidad beta
Vinculina	Fibrinógeno cadena B β	Inmunoglobulina pesada constante
Proteína de transporte de aniones Banda 3	Alfa-1-antitripsina	Fibrinógeno cadena γ
Inmunoglobulina pesada variable	Placoglobina de unión *	Anhidrasa Carbónica *
Inmunoglobulina lambda constante	Alfa-1-antiquimiotripsina	Fibrinógeno cadena A α
Inmunoglobulina lambda variable	Actina citoplasmática *	Albúmina
Integrina beta 2	Gama-glutamylciclotransferasa *	Actina citoplasmática *
Fibrinógeno cadena B β		Azurocidina *
Placoglobina de union *		Hemoglobina subunidad alfa
Estomatina *		Complemento C1q *
Hemoglobina subunidad alfa		Integrina beta
Inmunoglobulin kappa variable		Proteína zeta/delta 14-3-3 *
Miosina-9		Catepsina G
Catalasa		Proteína de reconocimiento de peptidoglicano 1
Actina citoplasmática *		Fibronectina *
Fibrinógeno cadena A α		Mieloperoxidasa *
Filamina-A *		Proteína de canal aniónico selectivo dependiente del voltaje 3 *
Cadena alfa de espectrina, eritrocítica 1 *		Scramblasa de fosfolípidos
Complemento C4-A y C4-B		Elastasa de neutrófilos
Pantetheinasa		
Glicoproteína plaquetaria 4		
Familia de transportadores de solutos 2, miembro 1 del transportador facilitado de glucosa		
Integrina alfa-IIb/beta-3		
Proteína Argonaute-2*		
Componente complemento C7		
Anhidrasa Carbónica *		
Proteína S100-A9 *		
Catepsina D		
Defensina 1 y 3 de neutrófilos*		
Alfa-2-macroglobulina *		
Antígeno de superficie leucocitaria CD47		
Ceruloplasmina *		

Célula de adhesión relacionada con el antígeno carcinoembrionario 8
Subunidad C del subcomponente C1q del complemento

Código de color
Inmunoglobulinas
Transporte de oxígeno
Hemostasis
Componentes celulares y extracelulares, adhesión
Respuesta inflamatoria

Tabla 6.2. Proteínas encontradas mediante LC-MS/MS luego de la IP del pool C. Proteínas identificadas en las tres bandas seleccionadas de la separación por SDS-PAGE de proteínas inmunoprecipitadas del pool C de trombos. Las proteínas que son relevantes de alguna manera en el tejido cerebral están indicadas con asterisco.

3. Discusión

Estudiar la composición de los trombos resulta interesante pues los hallazgos podrían ser útiles para avanzar en nuestra comprensión de la resistencia a la trombolisis y el desarrollo de nuevas terapias para el ACVi. Además, el conocimiento de la composición estructural de los trombos puede ser importante para el éxito relativo de la trombectomía mecánica.

El método de IP utilizado fue capaz de capturar Fg nitrado en un pool de Fg nitrado y no nitrado. Una desventaja de este método es que la inmunoglobulina de captura se coeluye con el antígeno de interés, y puede observarse en el gel. Además, si el mismo anticuerpo se utiliza como primario en un WB, en el paso de revelado con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRP, esas inmunoglobulinas utilizadas en la IP también serán reveladas. También se puede observar que una parte del antígeno de interés permanece en la muestra inicial, lo que podría deberse al hecho de que el anticuerpo de captura y las perlas no son suficientes para capturar la cantidad total de antígeno en la muestra. En general, el método es útil y permite la recuperación de un antígeno que está en baja concentración en la muestra inicial.

Se ha observado que los trombos cerebrales son muy heterogéneos en su naturaleza en dos aspectos. Primero, difieren claramente entre sí en tamaño, forma y color. Segundo, dentro de cada trombo hay considerable heterogeneidad, con diferentes áreas o segmentos del trombo que muestran diferentes componentes estructurales. Basándose en los principales componentes estructurales que son predominantes en los trombos, se clasifican en dos tipos distintos: áreas del trombo ricas en GR y plaquetas. Las áreas ricas en plaquetas están compuestas por

estructuras densas de Fb, plaquetas, VWF, leucocitos y ADN extracelular, mientras que la composición de las áreas ricas en GR es menos compleja, con GR empaquetados y una malla delgada de Fb llenando los espacios entre los GR empaquetados como los principales componentes estructurales.^[262] Se ha visto que la contribución de ambos tipos varía significativamente en los trombos. En la mayoría de los trombos, ambas regiones están dispersas, aunque algunos tienen límites más claramente definidos, con regiones ricas en GR rodeadas de regiones ricas en plaquetas.^[263] Esta heterogeneidad en composición que plantea la bibliografía fue observada en nuestro estudio, donde cada trombo analizado presentó un patrón electroforético particular.

Es sabido que varias proteínas se unen a la Fb y cambian las propiedades o función del coágulo a través de efectos en la formación y degradación de la Fb.^[264] Por ejemplo, las interacciones del tPA y el plasminógeno con la Fb aceleran la activación del plasminógeno para formar plasmina, la enzima principal en el proceso de fibrinólisis. La Lp(a) tiene similitudes estructurales con el plasminógeno y puede competir con este por la unión a la Fb e inhibir la formación de plasmina y eventualmente la fibrinólisis.^[265] Además, la unión de proteínas a la Fb puede tener un efecto en la estructura de las fibras de Fb. La unión de fibronectina a la Fb hace que la red de Fb tenga fibras más gruesas y poros más grandes.^[266] Los coágulos con fibras más gruesas y poros más grandes son lisados más rápidamente que los coágulos con fibras más delgadas y poros más pequeños.^[267] Por otro lado, la unión de la trombina a la Fb resulta en una menor cantidad de trombina activa en la circulación. Hay varias otras proteínas que se sabe que se unen a la Fb, incluidas la α_2 -AP, el PAI-2, la proteína relacionada con el Fg-1 derivada de hepatocitos (HFREP-1), albúmina, FGF-2, VEGF, IL-1 β , fXa, inhibidor de la vía del TF, TAFI, VWF, trombospondina, actina, fV y fXIII.^[268] Algunas de estas proteínas están entrecruzadas con la Fb por fXIIIa, por ejemplo, α_2 -AP, fibronectina, PAI-2, TAFI, VWF, trombospondina, actina y fV. También se ha observado α_2 -macroglobulina, carboxipeptidasa N, α_1 -antitripsina, haptoglobina, amiloide sérico P, y las apolipoproteínas A-1, A-IV, E y J, unidas no covalentemente a trombos de plasma formados *in vitro*.^[269] La mayoría de esas proteínas pueden ser clasificadas según su función en proteínas de la coagulación, inhibidores de proteasas y del metabolismo de las HDL. La actina es probablemente proveniente de las plaquetas. Otro estudio indicó que otro componente del trombo es el factor C3 del complemento, hallando también principalmente proteínas relacionadas a la coagulación e inflamación.^[270]

En cuanto a las proteínas encontradas, que presentan interés a nivel del tejido cerebral, se encuentran la matriz metaloproteinasa-9 (MMP-9), la integrina beta 3, la proteína zeta/delta 14-3-3, la actina citoplasmática, el Canal Aniónico Dependiente de Voltaje 3 (VDAC3), la anhidrasa carbónica (AC) y la proteína S100-A9. Estas proteínas están involucradas en diversos aspectos de la función cerebral, incluyendo la señalización, la estructura celular, la inflamación y el metabolismo. La MMP-9 está implicada en la remodelación de la matriz extracelular y se ha encontrado que juega un papel crucial en la neuroplasticidad, la inflamación y la ruptura de la BHE en el cerebro. La integrina beta 3 es un receptor que media la adhesión celular y la señalización; se expresa en el cerebro y está involucrada en la migración celular, el crecimiento neuronal y la sinapsis. La proteína zeta/delta 14-3-3 es parte de una familia de proteínas reguladoras que interactúan con proteínas implicadas en la señalización celular, el ciclo celular y la regulación de proteínas involucradas en el desarrollo y la función neuronal. La actina citoplasmática es una proteína clave en el citoesqueleto de las células; en el cerebro, la actina citoplasmática es crucial para el crecimiento y la motilidad neuronal, la sinapsis y la plasticidad neuronal. Las VDACs son proteínas que forman canales en la membrana mitocondrial externa, y VDAC3 se expresa en el cerebro y está involucrado en el metabolismo energético y la apoptosis neuronal. Las anhidrasas carbónicas son enzimas que catalizan la conversión de dióxido de carbono y agua en bicarbonato y protones; y tienen roles importantes en el cerebro, incluidos la regulación del pH y el transporte de CO₂ en el sistema nervioso central. La proteína S100-A9 es una proteína de unión al calcio que está involucrada en procesos inflamatorios y se ha encontrado que tiene funciones en la neuroinflamación y las enfermedades neurodegenerativas. Estudios han identificado estas proteínas nitradas en el cerebro, lo cual está asociado con diversas patologías neurodegenerativas y condiciones inflamatorias.

Se ha reportado la nitración de MMP-9 en condiciones inflamatorias y en enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas como DM, ACVi, esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer. La nitración puede alterar la actividad enzimática de la MMP-9, contribuyendo a la disrupción de la BHE y a la neuroinflamación.^[271,272]

La actina citoplasmática puede ser nitrada en condiciones de estrés oxidativo. La nitración de la actina se ha observado en modelos de enfermedad de Alzheimer y en otras patologías neurodegenerativas, lo que puede afectar la dinámica del citoesqueleto y la función neuronal.^[273]

La proteína S100-A9 ha sido encontrada nitrada en la enfermedad de Alzheimer y en otras enfermedades neuroinflamatorias. La nitración de S100-A9 puede afectar su función proinflamatoria y su interacción con otras proteínas.^[274,275]

La nitración de la anhidrasa carbónica se ha observado en enfermedades inmunes y neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Parkinson. La modificación postraduccional de esta enzima puede alterar su actividad y contribuir a la disfunción celular.^[276,277] Estos estudios sugieren que la nitración de proteínas puede ser un mecanismo relevante en la patogénesis de diversas enfermedades del sistema nervioso central.

En cuanto a la presencia de NO₂Tyr en trombos, hay antecedentes del estudio de trombos intracoronarios de pacientes con infarto de miocardio con elevación ST en donde se hallaron niveles de NO₂Tyr, asociados a marcadores inflamatorios. También se han encontrado moléculas de Fg nitrado en fibras de Fb de coágulos formados *ex vivo* a partir de plasma de pacientes fumadores.^[150]

En el presente estudio, cuando se realizó WB de las fracciones de los trombos, utilizando un anticuerpo anti-NO₂Tyr, se observó su presencia, tal como ocurrió en los antecedentes mencionados. Sin embargo, cabe destacar que las condiciones de los estudios previos encontrados no son como las presentadas en este Capítulo (trombos obtenidos mediante trombectomía mecánica como tratamiento a un ACVi), para las cuales no se encontraron antecedentes a la fecha. Luego de la IP y análisis por MS, nuestros resultados son similares a los reportados previamente, habiendo hallado proteínas relacionadas con el sistema inmunológico, el transporte de oxígeno, la hemostasia, inflamación y componentes celulares y extracelulares. Cabe recordar que estas proteínas podrían estar nitradas ya que fueron el producto de la IP con un anticuerpo anti-NO₂Tyr. Aunque también podrían ser una contaminación del inmunoprecipitado, lo que no quita que son proteínas que estaban en el coágulo. Esto amplía el alcance de las proteínas, nitradas o no, que pueden encontrarse en los trombos de ACVi. Estos hallazgos contribuyen a la comprensión del ACVi y ofrecen perspectivas sobre la diversidad proteómica de los trombos, allanando potencialmente el camino para futuras investigaciones de biomarcadores y aplicaciones clínicas.

4. Conclusión

El presente Capítulo ha proporcionado una visión sobre los mecanismos involucrados en el ACVi en relación con el estrés nitrooxidativo. Se ha identificado la nitración de proteínas como

una posible herramienta de biomarcadores para la evaluación clínica del ACVi, enfocándose en la identificación y caracterización de proteínas nitradas en los trombos que se forman.

El método de IP utilizado demostró ser efectivo para capturar Fg-NO₂Tyr, aunque se observaron limitaciones relacionadas con la coelución de inmunoglobulinas y la posible pérdida de antígeno durante el proceso. No obstante, el método ha sido útil para recuperar antígenos en baja concentración, ofreciendo una base para el análisis de proteínas nitradas en trombos.

El estudio ha revelado una notable heterogeneidad en los trombos cerebrales, caracterizada por diferencias en tamaño, forma, color y composición estructural. Se identificaron dos tipos principales de composiciones trombóticas: ricas en Fb y plaquetas, y ricas en GR. Esta heterogeneidad puede influir en la resistencia a la trombolisis y en la eficacia de las terapias como la trombectomía mecánica.

Además, se observó que diversas proteínas involucradas en la coagulación, inflamación y metabolismo, como la MMP-9, actina citoplasmática, proteína S100-A9, y anhidrasa carbónica, están nitradas en condiciones de distrés nitrooxidativo. Estas modificaciones postraduccionales pueden afectar la función de las proteínas y contribuir a la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas y condiciones inflamatorias. En el presente Capítulo se amplió el rango de búsqueda de NO₂Tyr, pasando de buscarla en Fg como en los anteriores Capítulos 3 y 4, a buscarla en proteínas del trombo. De este modo se pudo echar un vistazo en otras proteínas que sufren las consecuencias del distrés nitrooxidativo de un ACVi, y aunque no se profundizó demasiado en cada una de ellas, pues se excederían los objetivos de esta Tesis, resulta interesante tener conocimiento de este fenómeno.

Los resultados obtenidos al analizar trombos mediante WB y MS confirmaron la presencia de proteínas nitradas, similares a los hallazgos en estudios previos con trombos intracoronarios y coágulos *ex vivo*. Aunque las condiciones del estudio actual diferían de las anteriores, se corroboró la presencia de proteínas relacionadas con el sistema inmunológico, la hemostasia y la inflamación.

En conclusión, el estudio amplía el conocimiento sobre la composición y modificación de proteínas en trombos de ACVi, y subraya la importancia de la nitración de proteínas como un mecanismo relevante en la patogénesis del ACVi. Estos hallazgos abren nuevas vías para la investigación de biomarcadores y aplicaciones clínicas, proporcionando una base para futuras investigaciones que podrían mejorar la comprensión y el tratamiento del ACVi.

Capítulo 7: Modelado Molecular y Simulaciones de Dinámica Molecular

1. Introducción

El modelado de la molécula completa de Fg representa un avance significativo en la comprensión de esta proteína clave en el proceso de coagulación sanguínea. Hasta ahora, el modelado de Fg se había limitado a ciertas regiones o dominios específicos, dejando partes cruciales sin representar debido a la falta de estructuras cristalinas disponibles o a la complejidad de la proteína. En este trabajo, se emplearon métodos de homología y simulación de MD de CG para construir un modelo 3D completo de Fg, y se realizó una simulación de MD atómica para refinar el modelo y explorar su comportamiento dinámico. Estas simulaciones permitieron observar la flexibilidad estructural de las regiones, como las α C, que no habían sido modeladas previamente, y cómo interactúan estas áreas en el contexto de la proteína completa. La combinación de homología y MD brindó una visualización integral del Fg, proporcionando una base más sólida para estudiar su función, las interacciones intermoleculares, y las PTMs que pueden influir en su actividad.

Si bien existen técnicas experimentales para el mapeo y la cuantificación de las PTMs y su estudio en medios biológicos, no se sabe mucho de sus efectos sobre la estabilidad y dinámica de la proteína. En este contexto, los métodos *in silico* son una estrategia prometedora para el análisis preliminar y la predicción, y sirven como guía para próximos experimentos *in vivo* e *in vitro*; así como para encontrarle una explicación o causa a fenómenos observados previamente en experimentos húmedos. En otras palabras, permitirían entender el rol que juegan las PTMs en los procesos biológicos.^[278]

El modelado molecular y las simulaciones moleculares (como la MD), que se basan en campos de fuerza atómicos empíricos, son una estrategia poderosa para estudiar sistemas biológicos con alta resolución y tiempos del orden de los nano a milisegundos, y permitirán investigar las propiedades del Fg tomando en consideración el efecto de las PTMs en su estructura y estabilidad.

1.1. Fundamentos del Modelado Molecular y Simulaciones Biomoleculares

En la última década, el campo del modelado molecular y las simulaciones biomoleculares ha experimentado un crecimiento exponencial, consolidándose como una herramienta fundamental en la investigación científica. Estas técnicas permiten el estudio detallado de sistemas biológicos a nivel atómico y molecular, proporcionando una comprensión profunda de los procesos biológicos y facilitando el desarrollo de nuevas terapias y medicamentos.

Los experimentos computacionales juegan un papel cada vez más significativo en la ciencia hoy en día. El advenimiento de la computación de alto rendimiento ha permitido la experimentación virtual *in silico* como una herramienta que permite la interpolación entre experimentos de laboratorio y la teoría. Schulten introdujo el término “microscopio computacional” para describir el papel de las simulaciones computacionales en la ampliación de la investigación experimental cuando no es posible realizar mediciones directas. Él creía que la biofísica computacional ha progresado hasta el punto en que presenta una visión realista de los componentes intracelulares, a menudo con una resolución no alcanzable mediante instrumentos de laboratorio, llegando a dimensiones atómicas o incluso electrónicas.^[279] Feynman afirmó en 1964: “Ciertamente, ningún tema o campo está progresando más en tantos frentes en el momento actual que la biología, y si tuviéramos que nombrar la suposición más poderosa de todas, que lleva a uno a intentar entender la vida, es que todas las cosas están hechas de átomos, y que todo lo que hacen los seres vivos puede entenderse en términos de las sacudidas y vibraciones de los átomos”.^[280] Las simulaciones de MD son una herramienta computacional importante para entender la base física de la estructura, la evolución dinámica del sistema y la función de las macromoléculas biológicas. Catorce años más tarde, se publicó la primera simulación de MD de una macromolécula biológica, a saber, el inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI).^[281] Aunque la estructura de rayos X relativamente precisa de BPTI estaba disponible en ese momento, su función fisiológica era desconocida.

Las simulaciones computacionales que utilizan métodos de modelado molecular son herramientas que proporcionan una visión profunda del comportamiento y las propiedades de un sistema de interés. El modelado molecular abarca una variedad de métodos teóricos y técnicas computacionales que se utilizan para representar y simular el comportamiento de moléculas y sistemas moleculares. Estos métodos son construidos en base a principios de mecánica clásica molecular (llamados métodos de campo de fuerza [FF]) o de mecánica cuántica (llamados métodos de química cuántica [QC]). Desde la mecánica cuántica hasta la dinámica molecular clásica, estos métodos permiten predecir las propiedades físicas y químicas de los sistemas biológicos y comprender sus mecanismos de acción. Los métodos experimentales a menudo están limitados en la medición de variables observables que son el resultado del comportamiento colectivo promedio de un número muy grande de moléculas y de escalas de tiempo largas (en comparación con el movimiento molecular). Los enfoques de modelado molecular pueden lograr altas resoluciones espaciales y temporales, que, en principio, son muy a menudo difíciles de obtener en un experimento. Mediante el uso de

software especializado y algoritmos avanzados, se pueden construir modelos 3D precisos de proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas, así como simular sus interacciones y movimientos en diferentes condiciones ambientales. Por esta razón, tales métodos podrían considerarse como microscopios computacionales que nos permiten acercarnos a los procesos y observarlos a escala molecular. Además, los modelos computacionales permiten examinar cualquier sistema, condición o propiedad definible. Para modelar los sistemas se desarrollan campos de fuerza, un formalismo matemático basado en la mecánica molecular, para reproducir las geometrías moleculares, ajustando energías, longitudes y ángulos de enlace.^[282,283]

Las simulaciones de MD, por su parte, son aplicaciones específicas del modelado molecular que permiten observar la dinámica de los sistemas biológicos a lo largo del tiempo. Estas simulaciones pueden revelar información crucial sobre la conformación de las biomoléculas, sus rutas de plegamiento, mecanismos de interacción, y respuestas a cambios ambientales. Además, como ya se dijo, proporcionan una plataforma para explorar hipótesis experimentales de manera virtual antes de llevar a cabo costosos y laboriosos experimentos *in vitro* o *in vivo*. Es decir, se trata de una herramienta para optimizar experimentos, generar ideas, explicar y comprender observaciones experimentales.

Uno de los recursos más significativos para las simulaciones MD es el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB, www.rcsb.org), que pone a disposición datos estructurales biológicos macromoleculares 3D determinados experimentalmente. El RCSB PDB es un repositorio mundial para el procesamiento y distribución de datos de estructuras 3D de macromoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos,^[284] y es un recurso esencial para el modelado biomolecular. La cristalografía de rayos X ha hecho la mayor contribución a nuestra comprensión de la estructura de las proteínas. La cristalización de muchas proteínas (por ejemplo, proteínas de membrana) es una tarea difícil que puede requerir un esfuerzo considerable. Una medida importante de la precisión de una estructura cristalográfica es su resolución. La NMR es otro método para determinar la estructura de la proteína. En NMR, las propiedades de espín magnético de los núcleos atómicos se utilizan para construir una lista de restricciones de distancia entre átomos en una molécula. Esta lista se usa luego para construir un modelo de la proteína que muestra la ubicación de cada átomo. Una ventaja importante de la espectroscopia NMR es que proporciona información sobre proteínas en solución, en lugar de aquellas que forman un cristal. La determinación directa de la estructura por NMR generalmente se restringe a proteínas más pequeñas, típicamente de menos de 20 kDa de peso

molecular. Cabe señalar que las estructuras obtenidas de experimentos requieren algún post-procesamiento para prepararlas para las simulaciones. Se pueden encontrar problemas debido a residuos faltantes, choques de átomos, aguas cristalográficas y ubicaciones alternas que deben resolverse antes de realizar la simulación de MD. En el preprocesamiento de estructuras, se añaden residuos faltantes y átomos faltantes como el hidrógeno, y se eliminan los choques atómicos. También se asignan los estados de ionización, protonación y tautomerización para asegurar la mejor calidad de la estructura inicial.

Un aspecto crucial del modelado y las simulaciones es la capacidad de manejar la complejidad inherente a los sistemas biológicos. Las biomoléculas no funcionan de manera aislada, sino que interactúan en redes complejas dentro de las células. Por lo tanto, los modelos deben ser capaces de integrar múltiples niveles de información y de reproducir fenómenos emergentes que surgen de estas interacciones. Este enfoque multidisciplinario, que combina la biología, la química, la física y la informática, ha abierto nuevas vías de investigación y ha llevado a descubrimientos innovadores que serían imposibles de alcanzar mediante métodos experimentales tradicionales.

Por otro lado, los enfoques de modelado molecular también enfrentan sus limitaciones y desventajas.^[285,286] Por ejemplo, la descripción precisa de la realidad, es decir, la descripción de un sistema físico o un fenómeno, puede ser un desafío para sistemas complejos. Esto es aún más evidente en el contexto del modelado del Fg, que representa un gran desafío debido a su complejidad, indeterminación y dimensión estructural. En general, estas circunstancias presentan una gran oportunidad para que el modelado molecular desarrolle una amplia gama de modos estructurales químicamente diversos que pueden utilizarse en el estudio de las propiedades de los sistemas reales. Tales análisis profundizan la comprensión de las estructuras moleculares y la naturaleza del Fg, y demostrar la existencia e importancia de las propiedades supramoleculares observadas en este.

1.2.Diferentes Métodos de Modelado Molecular

La Figura 7.1 ofrece una visión general de los diferentes métodos de modelado molecular disponibles. El uso creciente de estos métodos se debe principalmente al rápido aumento en el poder y rendimiento computacional y al desarrollo de nuevos enfoques y algoritmos efectivos. Tal es el caso de los métodos de QC, que pueden describir núcleos y electrones que interactúan mutuamente al aproximar la solución de la ecuación de Schrödinger. Todos los métodos se basan en la aproximación de Born-Oppenheimer, que asume la separación del movimiento de

núcleos y electrones debido al movimiento electrónico mucho más rápido en comparación con el nuclear para la solución de la ecuación de Schrödinger. Para aproximar la solución de la ecuación de Schrödinger, existen varios métodos. Entre ellos, los métodos de Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) son muy populares y de una escala aproximada de N^3 , donde N es el número de electrones. Los métodos semiempíricos y de enlace fuerte de funcionales de densidad (DFTB) representan métodos prometedores que se acercan a la calidad de los resultados DFT con una velocidad varios órdenes de magnitud más rápida que DFT. La razón principal para elegir entre un método u otro radica en la necesidad de precisión, los recursos computacionales disponibles y el tamaño del sistema. Los métodos de QC pueden utilizarse para estudiar reacciones en sistemas moleculares que consisten en cientos de átomos. En este sentido, una investigación atomística detallada de un sistema biológico requiere conocimiento de su estructura electrónica. Por ejemplo, las reacciones enzimáticas implican la formación y ruptura de enlaces, efectos que deben tratarse con métodos cuánticos. Los cálculos cuánticos pueden proporcionar modelos útiles de estados de transición e intermediarios de reacción.

Además, los métodos de mecánica cuántica (QM) pueden combinarse con la MD. Esto permite la evolución dinámica del sistema en el tiempo, similar a como se hace utilizando la MD basada en FF.

Existen también los modelos híbridos de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM) que amplían significativamente el alcance de los cálculos de mecánica cuántica a sistemas mucho más grandes al dividir el problema en dos partes, cada una de las cuales se trata con diferentes métodos computacionales. La parte del sistema que participa directamente en una reacción química dada, como la catálisis, que involucra el sitio activo, los sustratos y los residuos de aminoácidos directamente involucrados, se trata con un modelo QM. La parte restante de la enzima, que no participa directamente en la reacción y generalmente abarca un número mucho mayor de átomos, se simula utilizando mecánica molecular con un FF biomolecular. Las metodologías QM/MM pueden diferir notablemente en características tales como: (1) el tipo de esquema utilizado para calcular la energía; (2) las diferentes regiones de frontera elegidas; (3) cómo se investiga la interacción entre la región QM y la región MM; (4) cómo se selecciona el método computacional; y (5) cómo se aborda la reacción enzimática. Existen ventajas y desventajas en estos diferentes métodos QM/MM, dependiendo en gran medida del tipo de enzima y la reacción en estudio. Los métodos QM/MM más comunes son Car–Parrinello/Molecular Mechanics MD,^[287] el método de enlace de valencia empírico (EVB),^[288] el modelo de clúster^[289] y los métodos de QM/MM MD.

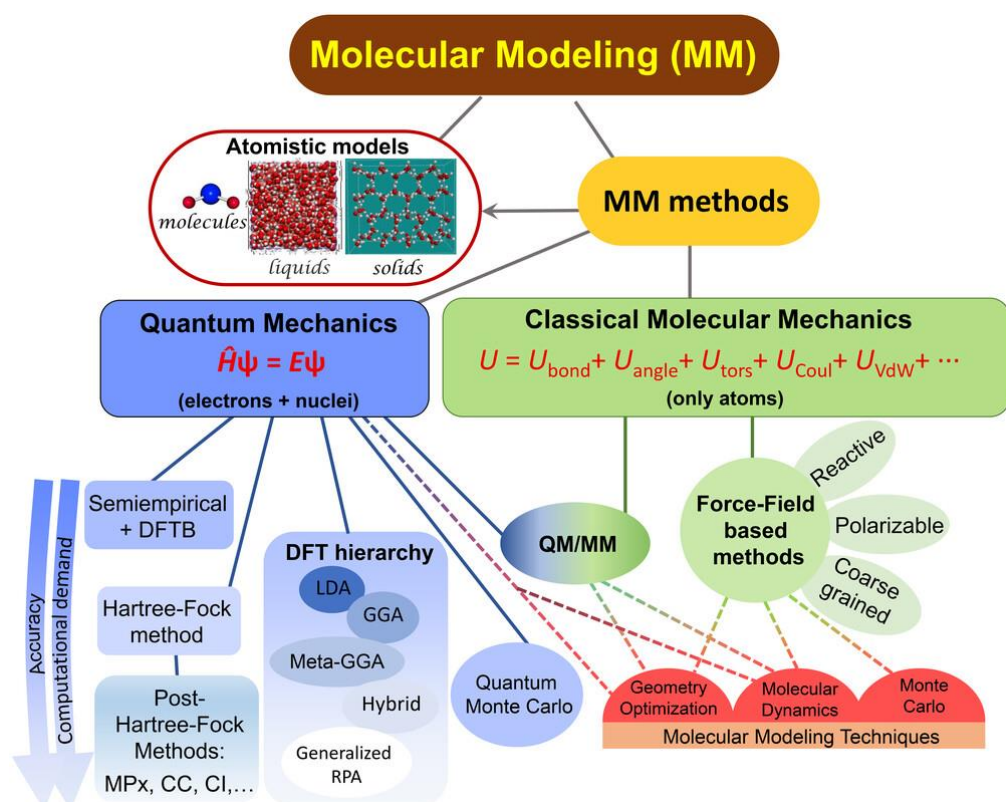


Figura 7.1. Esquema de diferentes métodos de modelado molecular. Abreviaturas utilizadas: DFTB, enlace fuerte de funcionales de densidad; LDA, aproximación de densidad local; GGA, aproximación de gradiente generalizado; RPA, aproximación de fase aleatoria; MPx, teoría de perturbaciones de Møller-Plesset hasta el nivel x; QM/MM, método híbrido Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular. Los términos en la expresión de la energía potencial U en el recuadro "Mecánica Molecular Clásica" corresponden a las contribuciones de energía potencial de enlace, flexión, torsión, Coulomb y dispersión (van der Waals). En el presente Capítulo se trabaja con Mecánica Molecular Clásica -> Métodos basados en Campo de Fuerza (incluyendo Coarse grained) -> Dinámica Molecular como Técnica de Modelado Molecular. Extraído de "A contribution of molecular modeling to supramolecular structures in soil organic matter" de Hubert Gerzabek *et al.*^[292]

Por otro lado, los métodos de FF combinados con la MD o Monte Carlo (MC) proporcionan propiedades fisicoquímicas de sistemas que consisten en un gran número de partículas ($> 10^6$) y tiempos de simulación del orden de μ s. Un FF se compone de una serie de ecuaciones que permiten relacionar las posiciones de los átomos con la energía, parámetros y tipos de átomos. Los métodos de FF representan modelos que consisten en partículas que interactúan (átomos o esferas que representan un conjunto de átomos) que aproximan la energía potencial del sistema. Este término captura el efecto promedio de los grados de libertad electrónicos instantáneos en una expresión analítica simple con parámetros empíricos. Las fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular se pueden dividir en aquellas causadas por interacciones entre átomos que están químicamente enlazados y aquellas causadas por interacciones entre átomos que no están enlazados. La expresión matemática puede escribirse como la suma de esos términos enlazados, como el estiramiento de enlaces, la flexión de ángulos de enlace, las rotaciones de

ángulos diedros torsionales y los términos de ángulo fuera del plano; y las contribuciones no enlazadas que representan la dispersión como un potencial de Lennard-Jones (LJ) y las interacciones electrostáticas con el potencial de Coulomb.^[290]

$$E_{total} = E_{bonded} + E_{nonbonded}$$

$$E_{bonded} = E_{bond} + E_{angle} + E_{dihedral}$$

$$E_{nonbonded} = E_{electrostatic} + E_{van\ der\ waals}$$

En otras palabras, los FF presentan la superficie de energía potencial del sistema representada por un conjunto cerrado de funciones analíticas de energía potencial. El sistema es capaz de moverse a través de las barreras de energía en la superficie de energía potencial, lo que implica cambios sustanciales (por ejemplo, conformacionales) durante la simulación. Los resultados de las simulaciones serán realistas solo si la función de energía potencial imita las fuerzas experimentadas por los átomos “reales”.

$$E_{tot} = \underbrace{\sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - r_{\theta_{eq}})^2 + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)]}_{\text{Bonded}} + \underbrace{\sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]}_{\text{Non-bonded}}$$

Figura 7.2. Un modelo típico de Campo de Fuerza (Hamiltoniano). Las dependencias de energía están relacionadas con (A) el estiramiento o compresión de un par de átomos unidos (modelado por un resorte simple), (B) el aumento o disminución del ángulo de enlace (modelado por un resorte simple), (C) las rotaciones del ángulo diedro (modelado por una función sinusoidal), (D) las interacciones de Van der Waals (modeladas por el potencial de Lennard-Jones) y (E) las interacciones electrostáticas (modeladas por la ley de Coulomb). (A–C) son causadas por interacciones entre átomos que están químicamente unidos entre sí, mientras que (C–E) son causadas por interacciones entre átomos que no están unidos. Extraído de “An Overview of Molecular Modeling for Drug Discovery with Specific Illustrative Examples of Applications” de Maral Aminpour *et al.*^[291]

Además, cada conjunto de parámetros de FF puede ser específico para un sistema (es decir, molécula, entorno y/o condiciones de límite termodinámicas). Están disponibles diferentes conceptos de FF, ya sea reintroduciendo explícitamente algunos efectos electrónicos, en forma de reactividad química o polarización atómica, o más bien expandiendo el promedio sobre grados de libertad detallados en modelos de grano más grueso. En un FF típico, los enlaces químicos y los ángulos atómicos se modelan utilizando resortes simples (funciones cuadráticas de energía) que no permiten la ruptura de enlaces. La forma funcional para la energía de

dihedros es muy variable, por lo que los ángulos dihedros (es decir, rotaciones alrededor de un enlace) se modelan usando una función sinusoidal que aproxima las diferencias de energía entre las conformaciones eclipsadas y escalonadas. Se pueden añadir términos torsionales impropios para imponer la planaridad de los anillos aromáticos, y se pueden usar “términos cruzados” para describir el acoplamiento de diferentes variables internas, como ángulos y longitudes de enlace. Algunos campos de fuerza también incluyen términos explícitos para enlaces de hidrógeno. Las fuerzas no enlazantes surgen debido a las interacciones de VdW y se modelan usando el potencial de LJ, y las interacciones cargadas (electrostáticas) se modelan usando la ley de Coulomb. Un ejemplo de una ecuación utilizada para aproximar las fuerzas atómicas que rigen el movimiento molecular (dicha función se denomina Hamiltoniano) está representado en la Figura 7.2.^[291]

Las familias de FF de elección popular para describir sistemas biomoleculares para simulaciones de MD son AMBER, CHARMM, GROMOS u OPLS.^[292]

1.3. Simulaciones de Dinámica Molecular

Las simulaciones de MD utilizan las ecuaciones de movimiento de Newton para determinar la fuerza neta y la aceleración que experimenta cada átomo, a partir de las cuales simula la evolución temporal de un conjunto de átomos interactuantes. Cada átomo i en la posición r_i se trata como un punto con una masa m_i y una carga fija, q_i . Las coordenadas atómicas evolucionan de acuerdo a las leyes de la física newtoniana donde F_i es la fuerza ejercida sobre la masa m_i y a_i es la aceleración de esta, es decir:

$$F_i = m_i a_i \quad \rightarrow \quad F_i(t) = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2}$$

$F_i(t)$ también puede expresarse como el gradiente de la energía potencial, donde V es la energía potencial, calculada a partir del Hamiltoniano.

$$F_i = -\nabla_i V \quad \rightarrow \quad -\nabla_i V = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2}$$

El motor de un programa de simulación de MD, cabe señalar, es su algoritmo de integración temporal. Los métodos de integración más populares para cálculos de MD son los algoritmos de Verlet, Verlet de velocidad y Leap-Frog.^[293] En el algoritmo de Verlet, se utilizan dos expansiones de Taylor de tercer orden para las posiciones $r(t)$, una hacia adelante y otra hacia

atrás en el tiempo. Denotando la velocidad como v , la aceleración como a , y la tercera derivada de $r(t)$ con respecto a t como b , obtenemos las siguientes expresiones:

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t) \Delta t + \left(\frac{1}{2}\right) a(t) \Delta t^2 + \left(\frac{1}{6}\right) b(t) \Delta t^3 + O(\Delta t^4)$$

$$r(t - \Delta t) = r(t) - v(t) \Delta t + \left(\frac{1}{2}\right) a(t) \Delta t^2 - \left(\frac{1}{6}\right) b(t) \Delta t^3 + O(\Delta t^4)$$

Sumando las dos expresiones se obtiene:

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + a(t) \Delta t^2 + O(\Delta t^4)$$

En consecuencia, $a(t)$ es la fuerza dividida por la masa, de modo que:

$$a(t) = -\left(\frac{1}{m}\right) \nabla V(r(t))$$

El paso de tiempo utilizado en los cálculos de MD es aproximadamente un orden de magnitud menor que el movimiento más rápido (vibración del enlace de la molécula de hidrógeno), que es de aproximadamente 10 femtosegundos (fs).

El resultado de una simulación de MD es una trayectoria en un espacio de fase de $6N$ dimensiones ($3N$ posiciones y $3N$ momentos). Sin embargo, dicha trayectoria no es particularmente relevante por sí sola. La simulación de MD es un método de mecánica estadística que genera un conjunto de configuraciones distribuidas según alguna función de distribución estadística, o también conocida como un ensamble estadístico. Tres ensambles diferentes se utilizan comúnmente en las simulaciones de MD: el Ensamble Microcanónico (NVE), el Ensamble Canónico (NVT) y el Ensamble Isotérmico Isobárico (NPT). Estos ensambles se utilizan durante la equilibración para lograr la temperatura y presión deseadas antes de cambiar al ensamble de volumen constante o energía constante cuando comienza la recolección de datos. Aquí, N representa el número de partículas, E la energía, V el volumen, T la temperatura y P la presión. Cada uno de estos denota un valor que se debe mantener constante durante la simulación. En consecuencia, medir cantidades en simulaciones de MD generalmente implica realizar promedios temporales de propiedades físicas a lo largo de la trayectoria del sistema (promedios sobre configuraciones).

Por ejemplo, se puede definir el valor instantáneo de una propiedad física genérica A en el tiempo t como:

$$A(t) = f(r_1(t), \dots, r_N(t), v_1(t), \dots, v_N(t))$$

Entonces se obtiene el promedio como:

$$\langle A \rangle = \frac{1}{N_T} \sum_{t=1}^{N_T} A(t)$$

donde t es un índice que recorre los pasos de tiempo desde 1 hasta el número total de pasos, N_T .

Tiempos de simulación suficientemente largos aseguran que el espacio será bien muestreado, de manera que el proceso de promedio aproxime las propiedades termodinámicas correspondientes. Las propiedades más comúnmente medidas son la energía potencial, la energía cinética, la energía total, la temperatura, la presión, el RMSD y el RMSF. El RMSD es la medida de similitud entre estructuras y se calcula como la distancia promedio entre los átomos (generalmente los átomos del backbone) de las estructuras superpuestas. El RMSD se calcula como:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

donde δ_i es la distancia entre el átomo i y una coordenada de referencia. Esta cantidad a menudo se calcula para los átomos pesados del backbone o, en algunos casos, solo para los átomos C_α .

El RMSF es la medida de la fluctuación de la posición de cada átomo a lo largo del tiempo en comparación con su posición promedio, y se calcula como:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{i=1}^T (r_i(t) - r_i^{avg})^2}$$

donde T es el número total de frames (instantáneas) en la simulación, $r_i(t)$ es la posición del átomo i en el tiempo t , y r_i^{avg} es la posición promedio del átomo i a lo largo de la simulación. El RMSF proporciona información sobre la flexibilidad y movilidad de los átomos en la molécula durante la simulación.

Otra medida interesante a realizar, y que se utiliza en el presente Capítulo, es la de las energías de interacción entre dos conjuntos de átomos. Se utiliza el plugin NAMD Energy para calcular las energías de interacción no enlazante (VdW y electrostáticas) entre dos grupos de átomos en

la simulación realizada con NAMD. Las interacciones VdW se calculan utilizando el potencial de LJ, que se expresa como:

$$E_{vdW} = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

donde ε es la profundidad del pozo de potencial (representa la fuerza de atracción), σ es la distancia a la cual la energía potencial es cero, y r es la distancia entre dos átomos.

Las interacciones electrostáticas se calculan utilizando la ley de Coulomb, que se expresa como:

$$E_{elec} = \frac{k_e q_1 q_2}{r}$$

donde k_e es la constante de Coulomb, q_1 y q_2 son las cargas de los dos átomos, y r es la distancia entre los dos átomos.

El procedimiento del plugin NAMD Energy implica siguientes pasos: (1) se seleccionan dos grupos de átomos cuyas interacciones se desean calcular; (2) para cada par de átomos entre los dos grupos seleccionados, el plugin calcula las distancias r ; (3) utilizando las fórmulas de LJ para VdW y la ley de Coulomb para las interacciones electrostáticas, el plugin calcula las energías para cada par de átomos; y (4) las energías individuales de todos los pares de átomos se suman para obtener las energías totales de interacción VdW y electrostáticas entre los dos grupos de átomos. Este proceso proporciona las energías de interacción no enlazante (VdW y electrostáticas) para los grupos de átomos seleccionados a lo largo de la trayectoria de la simulación. Esto puede presentarse como gráficos de energía en función del paso de tiempo, o como un promedio de esa energía una vez que se haya estabilizado.

1.4.Limitaciones de Tamaño y Tiempo en Simulaciones de Dinámica Molecular

Los grandes tamaños de sistema y las largas escalas de tiempo son dos desafíos frecuentemente encontrados en las simulaciones de MD. Además, las simulaciones de MD son computacionalmente exigentes por dos razones. Primero, el cálculo de fuerzas en cada paso de tiempo requiere una considerable cantidad de cómputo. Segundo, el cálculo de fuerzas debe repetirse muchas veces. Por ejemplo, para producir una muestra suficiente para estudiar el plegamiento, se requiere alcanzar escalas de tiempo de milisegundos. Los pasos individuales están limitados a unos pocos femtosegundos, por lo que simular un milisegundo de tiempo físico requiere casi un trillón de pasos de tiempo. La mayoría de los eventos biomoleculares de

interés, como el plegamiento de proteínas, la unión de proteínas y fármacos, y los grandes cambios conformacionales esenciales para la función de las proteínas, típicamente toman más tiempo (microsegundos a milisegundos) que las escalas de tiempo de MD, limitando así la aplicabilidad de estas simulaciones. La resolución espaciotemporal de las técnicas de modelado molecular se ilustra en la Figura 7.3.

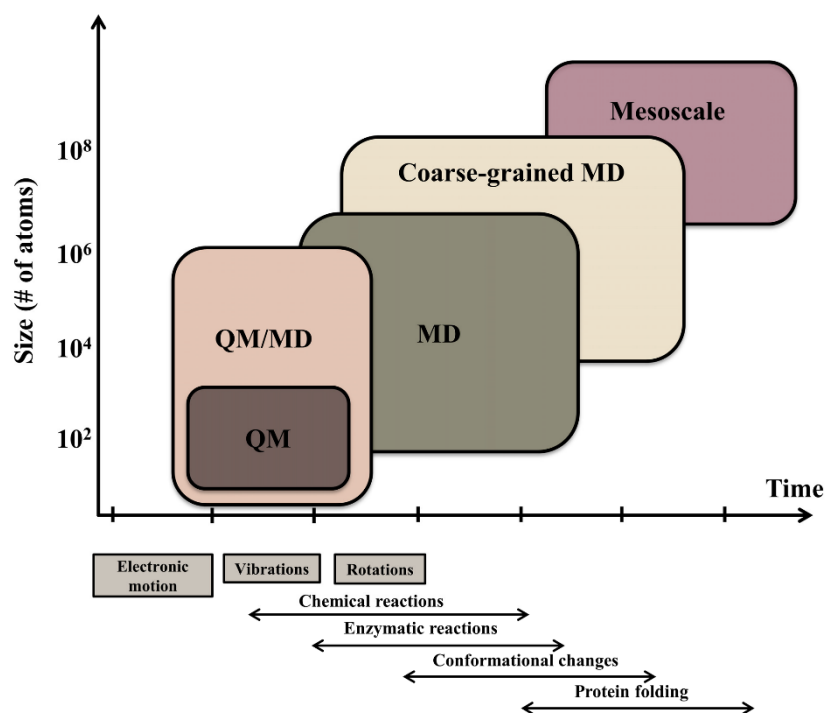


Figura 7.3. Resolución espaciotemporal de las técnicas de modelado molecular. La resolución temporal (abcisa) y espacial (ordenada) de cada técnica se indica mediante cajas de colores. Las escalas de tiempo de algunos procesos moleculares fundamentales, así como de procesos fisiológicos compuestos, se indican debajo de la abcisa. Extraído de "An Overview of Molecular Modeling for Drug Discovery with Specific Illustrative Examples of Applications" de Maral Aminpour *et al.* [291]

Diversos métodos se han utilizado para superar las limitaciones de tamaño y escala temporal en la MD. El método de CG simplifica y acelera las simulaciones MD.^[169,294] CG emplea modelos a mesoescala, en los cuales un grupo de átomos se trata como un único sitio de interacción o una "perla", una idea introducida por Levitt y Warshel en la década de 1970.^[295,165] En el presente Capítulo se utiliza este tipo de método de CG.

1.5. Simulaciones Biomoleculares para estudio de PTMs en Proteínas

Las PTMs son alteraciones químicas que ocurren en las proteínas después de su síntesis en los ribosomas. Estas modificaciones, que incluyen fosforilación, ubiquitinación, acetilación, metilación, glicación y muchos otros, son esenciales para la regulación de la actividad, la localización y la estabilidad de las proteínas. A su vez, existen otras PTMs, que son las

nitrooxidativas, que incluyen nitración de Tyr, nitrosilación de Cys, ditirosinación, oxidación de Met, carbonilación, formación de puentes disulfuro y nitrosilación de grupos amino, y resultan de interés del mismo modo. Comprender cómo estas modificaciones afectan la estructura y función de las proteínas es crucial para el desarrollo de terapias dirigidas y la comprensión de diversas enfermedades, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, inmunológicas y los trastornos neurodegenerativos.

Las simulaciones MD han emergido como una herramienta poderosa para el estudio de las PTMs. A través de estas simulaciones, se pueden observar y analizar en detalle los cambios conformacionales inducidos por las PTMs, así como sus efectos en las interacciones proteína-proteína y proteína-ligando. Estas simulaciones permiten explorar las consecuencias dinámicas de las modificaciones en tiempo real y a una resolución que no es posible alcanzar mediante técnicas experimentales tradicionales.

Un aspecto fundamental de las simulaciones de MD en el estudio de las PTMs es la capacidad de modelar de manera precisa las modificaciones químicas específicas en los residuos aminoacídicos. Utilizando algoritmos avanzados y FF adecuados, es posible simular el impacto de una nitración en un residuo de Tyr, por ejemplo, y observar cómo esta modificación altera la dinámica de la proteína completa. Estos estudios pueden revelar cambios en la estabilidad de la proteína, en su capacidad para interactuar con otras moléculas y en su función biológica general.

En el caso puntual del estudio presentado en este Capítulo, las múltiples funciones del Fg que incluyen coagulación, fibrinólisis, respuesta inflamatoria, sanado de heridas y neoplasia, vienen dadas por el plegamiento de la molécula y por la interacción de componentes celulares y matriciales a sitios de unión presentes en ésta. Esos sitios constan de residuos aminoacídicos dispuestos de forma tal que generan una superficie química óptima para la interacción con su contraparte, por lo tanto, si existiesen modificaciones sobre la estructura de esos residuos clave, se vería afectada dicha interacción y entonces la función que ella modula. Del mismo modo esas modificaciones tendrían consecuencias sobre el plegamiento y la estructura 3D de la proteína. Las modificaciones químicas sobre grupos funcionales de residuos aminoacídicos alteran propiedades fisicoquímicas tales como densidad de carga, pKa, volumen e hidrofobicidad, que promoverían cambios a nivel de las estructuras secundarias, terciarias y/o cuaternarias, y los correspondientes cambios en importantes factores como la accesibilidad al solvente, tanto del residuo que es objeto del cambio, como de sus vecinos.

Además, las simulaciones de MD permiten el estudio de la cooperación entre múltiples PTMs. Las proteínas a menudo sufren varias modificaciones simultáneamente, y estas pueden tener efectos sinérgicos o antagónicos. Mediante simulaciones, es posible desentrañar estos efectos complejos y obtener una comprensión más completa de cómo las redes de modificaciones regulan la función proteica.

La integración de datos experimentales con simulaciones biomoleculares también es una estrategia potente. Los datos obtenidos mediante técnicas como MS, NMR y cristalografía de rayos X se utilizan para validar y refinar los modelos de simulación, mejorando su precisión y relevancia biológica. Esta sinergia entre experimentación y simulación es esencial para desarrollar modelos predictivos robustos que puedan guiar futuras investigaciones y aplicaciones clínicas.

En este estudio se lleva a cabo la integración de datos obtenidos mediante diferentes técnicas, como MS y cristalografía. Para el modelado de la molécula completa de Fg se utiliza el modelo cristalográfico disponible en bibliografía, y para la incorporación de residuos de NO₂Tyr se utilizan los resultados obtenidos mediante MS en el Capítulo 3 de la presente Tesis.

Las simulaciones biomoleculares ofrecen una ventana única al mundo dinámico y complejo de las PTMs en proteínas. Al proporcionar una visión detallada y dinámica de cómo estas modificaciones afectan la estructura y función proteica, estas simulaciones están revolucionando la comprensión de la biología molecular y abriendo nuevas oportunidades para el diseño de terapias innovadoras.

Este Capítulo explora dos aplicaciones de esta técnica, el modelado *de novo* y el estudio de PTMs, destacando su impacto en la ciencia moderna y su potencial para futuras investigaciones.

1.6. Estructura Tridimensional del Fibrinógeno

Un esquema y descripción de la estructura de la molécula de Fg se pueden encontrar en el Capítulo 1. Aquí nos enfocaremos en la estructura 3D completa, incluyendo secciones cuya estructura no ha sido reportada previamente, comparando con las hipótesis en cuanto a esas estructuras faltantes, que se han reportado en bibliografía.

El Fg tiene una estructura de multidominios, que se agrupan en varias regiones estructurales: la región central E, que se conecta con dos regiones terminales D idénticas mediante regiones de triple α -hélice enrollada, y dos regiones α C. Históricamente, se pensaba que la estructura

del Fg se asemejaba a una "mancuerna" con tres nódulos, designados como dominios D y E, dispuestos linealmente en una forma D–E–D.^[296] Sin embargo, estudios posteriores utilizando microscopía electrónica (EM) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) revelaron que la estructura de la molécula de Fg es más compleja que el modelo trinodular originalmente propuesto. En particular, los estudios de EM visualizaron nódulos adicionales en la molécula de Fg,^[297,298,299,300] y experimentos de DSC indicaron la presencia de varios dominios plegados de manera independiente en sus regiones D y E.^[301,302,303] La existencia de múltiples dominios en el Fg fue confirmada posteriormente mediante análisis por rayos X de los fragmentos D y E.^[304,305] Finalmente, los estudios de rayos X establecieron la estructura cristalina del Fg nativo de pollo y bovino, y del Fg humano.^[158] Sin embargo, estos estudios no resolvieron la estructura de las dos regiones α C formadas por los dos tercios C-terminales de las cadenas A α (residuos 236 a 625), que constituyen aproximadamente una cuarta parte de la molécula. Se ha demostrado que las regiones α C juegan un papel importante en la determinación de la estructura y las propiedades de los coágulos. Estas regiones tienen un rol en el ensamblaje de Fb, la fibrinólisis, la angiogénesis y otros procesos.^[306,307] Se ha hipotetizado que en la conversión de Fg a polímero de Fb, ocurre un cambio conformacional a gran escala, de manera que las regiones α C quedan disponibles para la interacción intermolecular.^[308] Experimentos con fragmentos altamente purificados y bien caracterizados que carecen de una o ambas regiones α C indican que estas son trascendentes para el aumento de la agregación lateral y la formación de protofibrilas durante la polimerización de Fb.^[309] Los fragmentos α C aislados polimerizan a pH neutro e interactúan con las regiones α C del monómero de Fb para influir en la formación del coágulo, demostrando también que estas porciones actúan para aumentar la agregación lateral y producir coágulos con fibras más gruesas.^[15] Varios trastornos de disfibrinogenemia en los que hay sustituciones de aminoácidos o truncamientos en las regiones α C revelaron que estos cambios pueden tener efectos dramáticos en la polimerización y la estructura del coágulo, produciendo coágulos con menor porosidad y mayor resistencia a la fibrinólisis, resultando en complicaciones trombóticas.^[310] Estos resultados muestran que las regiones α C influyen en la determinación de la estructura y las propiedades biofísicas de los coágulos y su tasa de fibrinólisis.^[311]

El conocimiento de la estructura de Fg y Fb y su comportamiento en un entorno fisiológico es vital para comprender sus funciones biológicas. A pesar de numerosos estudios sobre el proceso de polimerización de Fb, su mecanismo molecular sigue siendo esquivo principalmente debido a la ausencia de un modelo estructural completo del Fg humano. Como

se mencionó anteriormente, se ha determinado la estructura cristalina del Fg humano (código PDB: 3GHG), pero no de manera completa. Las regiones N y C-terminales de las tres cadenas están ausentes en la estructura cristalográfica, siendo el C-terminal de las cadenas A α (regiones α C) el más afectado, con una sección de más de 400 aminoácidos faltante.

Aunque los experimentos de DSC y EM sugirieron que las regiones α C contienen estructuras compactas y ordenadas, estudios posteriores con rayos X no confirmaron este hallazgo. Las regiones α C no son visibles en los mapas de densidad electrónica, lo que lleva a la conclusión de que su estructura es desordenada, planteando la cuestión sobre el estado de plegamiento de las regiones α C, es decir, si realmente contienen estructuras compactas y ordenadas o si están desordenadas.

Aún no se dispone de un modelo estructural 3D completo que permita una observación detallada de la molécula y sus regiones, así como el estudio más profundo del proceso de polimerización, incluyendo sus regiones α C, involucradas en las interacciones intermoleculares durante la polimerización.^[299] Por lo tanto, es necesario contar con este modelo para arrojar luz sobre el proceso de formación de Fb, mediante la construcción de una estructura de protofibrila y la realización de experimentos de MD. Además, en la actualidad no es posible estudiar el impacto estructural de las PTMs (como las que ocurren en condiciones de estrés nitrooxidativo relacionadas con enfermedades cardiovasculares) en regiones que no están resueltas en el cristal y que podrían ser estudiadas utilizando el modelo completo.

Por lo tanto, en el presente Capítulo, uno de los objetivos consistió en diseñar un modelo 3D atómico completo de la molécula de Fg, para lo cual se combinaron estrategias de modelado por homología, y simulaciones de MD de CG y clásica atómica. El otro objetivo implicó el estudio de dos modelos de Fg, uno conteniendo residuos de NO₂Tyr y otro nativo como control, para observar las consecuencias de la presencia de esa PTM en la estructura e interacción con ligandos.

2. Resultados

2.1. Modelado Molecular de la estructura completa del Fibrinógeno Humano

En esta sección, la numeración de referencia de la secuencia de aminoácidos será según los segmentos modelados. Esto es Ala¹ a Pro⁶²⁵ en la cadena A α , Gln¹ a Gln⁴⁶¹ en la cadena B β , y Tyr¹ a Val⁴¹¹ en la cadena γ . La estructura de la molécula de Fg es A α -B β - γ -A α -B β - γ , nombrada

A-B-C-D-E-F. Por lo tanto, las dos cadenas $A\alpha$ se denominan A y D, las dos cadenas $B\beta$ se denominan B y E, y las dos cadenas γ se denominan C y F.

La simulación de CG que resultó en el plegamiento de las grandes regiones αC extendidas inicialmente de las cadenas $A\alpha$, y la modelización por homología de las porciones más cortas N y C-terminales de las cadenas $B\beta$ y γ , y el N-terminal de las cadenas $A\alpha$, permitieron el ensamblaje de la estructura final, a partir de la cual se realizó una simulación atómica, obteniendo los siguientes resultados.

2.1.1. *Análisis Estructural*

La Figura 7.4 muestra el modelo final obtenido. Es particularmente interesante la estructura de las porciones C-terminales de las cadenas $A\alpha$, las regiones αC , ya que representan una gran parte de toda la molécula, tienen un rol significativo en el ensamblaje de la fibrina, y su estructura no ha sido reportada anteriormente.

La Figura 7.5 muestra la estructura secundaria de la molécula de Fg obtenida, que consiste en α -hélices, láminas- β , giros y bucles. Son visibles las estructuras de triple α -hélice dentro de las regiones de enrollamiento (coiled-coil), que conectan la región central E con las regiones laterales D. Además, los nódulos globulares β y γ dentro de las regiones D están compuestos predominantemente por láminas- β , aunque contienen algunas α -hélices. Los FpA y FpB en la región central E están formados principalmente por bucles y giros. Las regiones C-terminales de las cadenas $A\alpha$ presentan bucles, giros y algunas láminas- β tanto en los conectores- αC como en los dominios- αC .

La evolución estructural involucró el movimiento de la porción inicial del conector- αC hacia la región de enrollamiento (coiled-coil) y el plegamiento del conector- αC y el dominio- αC , como se describe a continuación.

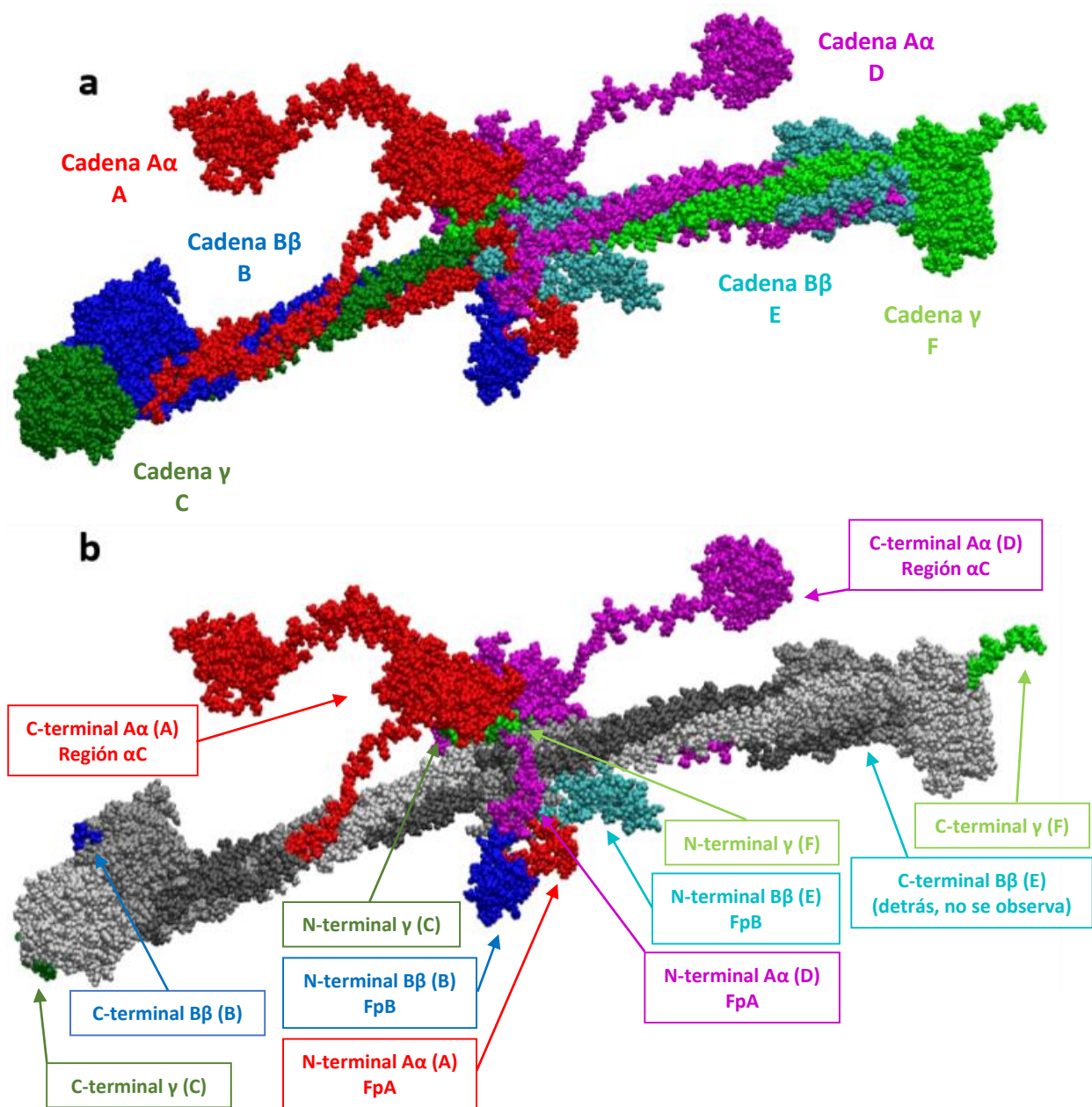


Figura 7.4. Modelo de la molécula de Fibrinógeno obtenida. a: Cadena Aα (A): rojo, cadena Aα (D): magenta, cadena Bβ (B): azul, cadena Bβ (E): cian, cadena γ (C): verde oscuro, cadena γ (F): verde claro. b: Estructura cristalográfica de la que se partió (código PDB: 3GHG) mostrada en tonos de gris. Secciones N- y C-terminales que no están resueltas en el cristal y fueron modeladas en el presente trabajo indicadas con el mismo código de colores que arriba. El extremo C-terminal de la cadena Bβ (E) no se observa por la rotación de la molécula, se encuentra detrás. Los extremos N-terminales de las cadenas γ están cubiertos por las cadenas Aα y se observan apenas. FpA y FpB: fibrinopéptidos A y B.

La literatura informa que la organización estructural de esas porciones C-terminales de las cadenas A α del Fg (regiones α C) consiste en dos secciones estructuralmente distintas: el conector- α C (aminoácidos 236 a 406), una región flexible que une al dominio- α C compacto al resto de la molécula, y este último (aminoácidos 407 a 625), una unidad compacta plegada independientemente.^[312] En nuestro modelo, esas dos porciones diferenciales son claramente visibles.^[313] El conector- α C sobresale desde la parte distal de la estructura de coiled-coil hacia la parte central de la molécula, formando una cuarta hebra. Al final de la simulación, el conector- α C está en contacto con la estructura de enrollamiento y interactúa con el conector- α C de la mitad opuesta de la molécula, formando una disposición semi-compacta. El dominio- α C, ubicado en la parte distal de la región α C, exhibe una estructura globular.

Para lograr una estructura teórica de las regiones α C, estudios previos emplearon varios métodos ya que, como se indicó anteriormente, no hay disponible una estructura cristalográfica. Aunque se sugirió que las regiones α C están formando "apéndices libres nadadores",^[314] no están completamente desordenadas. El primer método implicó realizar un análisis de secuencia

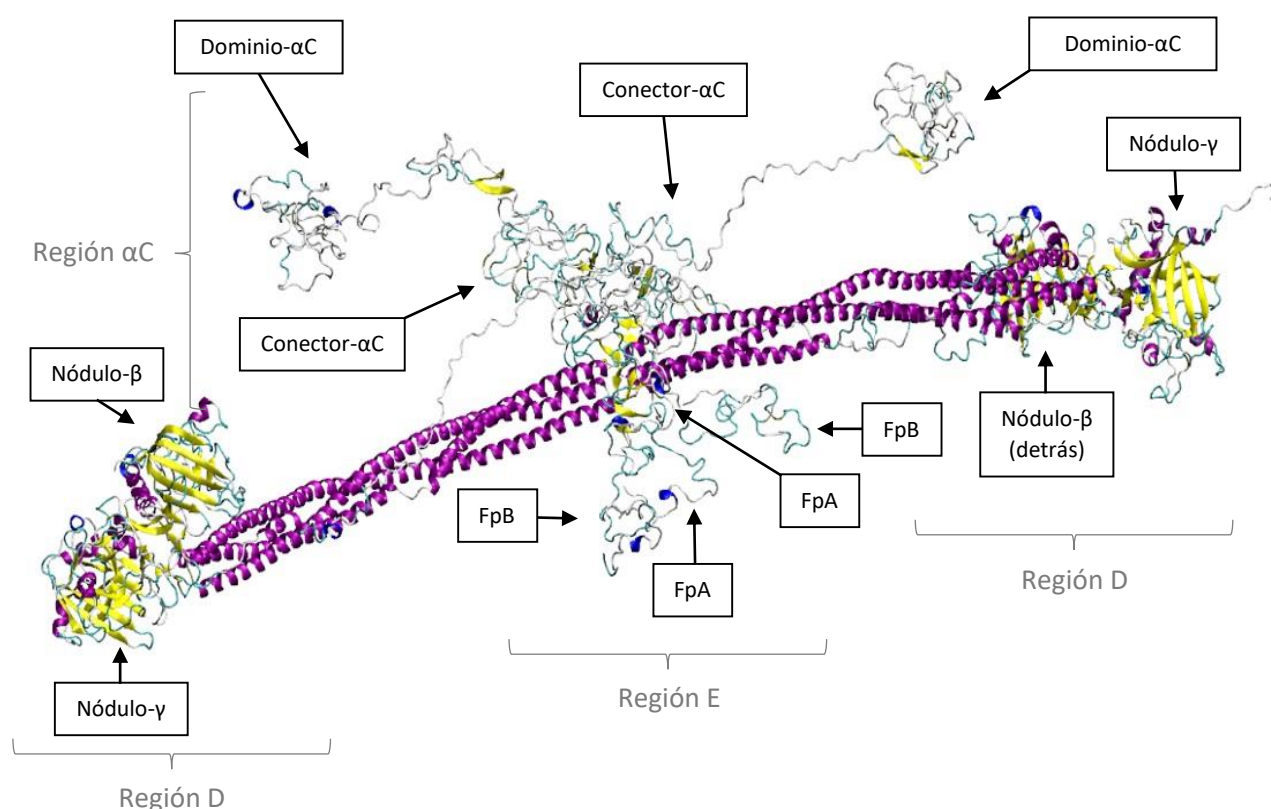


Figura 7.5. Representación de la Estructura Secundaria del modelo de Fibrinógeno obtenido. Las hélices alfa se muestran en violeta, las láminas- β en amarillo, los giros en azul y los bucles en cian. Se indican las regiones y subestructuras más importantes de la molécula, como los nódulos- β y γ que son globulares conteniendo principalmente láminas- β (el nódulo- γ de la mitad derecha se encuentra detrás de la triple alfa-hélice); los fibrinopéptidos A y B (FpA y FpB) que presentan bucles y giros; y los conectores- α C y los dominios- α C con bucles, giros y algunas láminas- β . Además, se puede observar claramente la estructura secundaria de la triple alfa-hélice enrollada que conecta la región central E con las regiones laterales D.

de las regiones α C, revelando que los residuos polares y no polares están distribuidos de manera desigual. La mitad N-terminal exhibe un bajo contenido de residuos no polares y un exceso de Gly, Ser, Thr y Pro. Se propuso que esto hace improbable que esta parte de la cadena forme alguna estructura compacta. La mitad C-terminal tiene una composición similar, pero adicionalmente, esta región contiene un gran número de residuos de aminoácidos con cadenas laterales no polares que típicamente están involucradas en la formación de un núcleo compacto.^[315,316] En línea con estas observaciones, un análisis computacional de la probabilidad de formar conformaciones regulares de cadenas polipeptídicas reveló que las conformaciones α -hélice y láminas- β son bastante probables en la sección 405-565 C-terminal de las regiones α C, mientras que la sección 255-405 N-terminal parece estar predominantemente en una conformación de coil aleatoria.^[302]

Por lo tanto, aunque originalmente se asumió que las regiones α C están desordenadas, estos análisis sugirieron que al menos sus mitades C-terminales pueden formar estructuras compactas y ordenadas.^[308] En el modelo obtenido en este trabajo, se observó una tendencia a una porción C-terminal más ordenada y una porción N-terminal más desestructurada en las regiones α C. Nuestro modelo sugiere que la porción N-terminal está en una conformación de coil aleatorio, siendo mayormente desordenada, como se había propuesto anteriormente, con estructuras ordenadas localmente. Además, la longitud observada de las regiones α C, consistente con las mediciones de microscopía, sugiere que existe un cierto grado de compactación.

Cuando la región α C se determinó mediante DSC, la entalpía específica de desnaturalización de las regiones α C fue menor que la de una proteína globular típica, lo que sugiere que solo parte de sus residuos están involucrados en la formación de una estructura compacta.^[302] Esto es coherente con la estructura desarrollada que muestra regiones α C que están parcialmente estructuradas con regiones globulares y otras regiones sueltas.

Los estudios de EM revelaron la forma básica trinodular de la molécula, una proteína fibrosa de aproximadamente 45 nm de longitud, con nódulos en cada extremo y en el medio.^[317] Cuando se examinó con más detalle, se descubrió que algunas moléculas parecían tener extensiones o apéndices que parecían estar relacionadas con las regiones α C porque no estaban presentes en preparaciones que carecían de esta parte de la molécula. En particular, se encontró que algunas moléculas de Fg tenían un nódulo adicional junto al nódulo central. Dado que este nódulo extra no se observó en preparaciones desprovistas de regiones α C, se concluyó que estaba formado por las dos regiones C-terminales de las cadenas A α , es decir, las regiones α C.

Las ubicaciones de las regiones α C se determinaron mediante EM de Fg en presencia de un anticuerpo monoclonal contra el extremo C-terminal de la cadena A α .^[318] Se observó que este anticuerpo se unía cerca de la región central del Fg, indicando que las regiones α C de la mayoría de las moléculas no son visibles normalmente porque están en o cerca del nódulo central de la molécula. Esto está de acuerdo con nuestro modelo en el que se puede observar que las regiones α C, específicamente el conector- α C, están cerca de la región E central, formando una estructura semicompacta e interactuando entre sí.

Los experimentos con regiones α C aisladas confirmaron la presencia de estructuras ordenadas,^[319] y los estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM) del Fg mostraron claramente las regiones α C con dominios- α C compactos.^[320] La Figura 7.6 muestra imágenes de microscopía de bibliografía.

En general, la estructura confirma y extiende las inferencias hechas sobre la base de estudios experimentales realizados por otros autores, que indicaron la existencia de una región α C que consiste en un conector- α C y un dominio- α C.

2.1.1.1. Conector- α C

La estructura cristalina del Fg humano reveló que la cadena A α hace un giro después de Cys¹⁶⁵, lo que restringe la región de la hélice enrollada triple para formar una cuarta hebra α -helicoidal de la hélice enrollada. Esta α -hélice está formada por los residuos 192–204 de la cadena A α y se acomoda en el surco de la hélice triple entre las cadenas A α y B β . Dirige la porción C-terminal de la cadena A α hacia la región central de la molécula. Experimentos con anticuerpos monoclonales específicos de la cadena A α , que revelaron que un epítipo dentro de la región A α 219–229 se expone en el fragmento α C aislado como resultado del corte de la plasmina en los residuos A α 218–219, sugieren que esta región puede formar una estructura ordenada que puede interactuar con los dominios de la hélice enrollada.^[321] En nuestra estructura, esta porción sufre cambios en su conformación durante la simulación de MD, terminando en una posición diferente a la que comenzó. Al principio estaba alejada de la hélice enrollada triple y al final está cerca e interactuando con ella, como se propuso anteriormente. Al analizar las energías de interacción más abajo, volveremos a este punto.

Cada conector- α C del Fg humano presenta un segmento de 43–45 residuos seguido por 10 repeticiones en tándem ricas en Gly y Pro. Dichas secuencias ricas en Pro repetidas en tándem se encontraron en muchas proteínas y pueden adoptar una conformación helicoidal levógira extendida conocida como poly(L-prolina) tipo II (PPII).^[322] Esta estructura está altamente

hidratada y a menudo forma enlaces entre dominios o "sticky arms" involucrados en interacciones con otras proteínas. Anteriormente se hipotetizó que esas características estaban presentes en los conectores- α C,^[307] siendo luego apoyadas experimentalmente al exhibir señales de dicroísmo circular (CD) inducidas por la temperatura a 222 nm y cambios en la función de capacidad calorífica similares a los reportados para las conformaciones PPII.^[323,324] La presencia de las regiones PPII en las regiones α C sería consistente con la dificultad de cristalización del Fg intacto,^[325] ya que las estructuras PPII extendidas son difíciles de cristalizar.^[322] Nuestra molécula presentó esta estructura secundaria de conformación PPII desde el residuo 236 hasta el 406, con una lámina- β aislada, formando una estructura semicompacta cercana al centro de la molécula. Esto está de acuerdo con estudios previos de predicción de estructura secundaria que indican una probabilidad de aproximadamente 40% de formación de estructura regular en la región 215–255 de la cadena A α .^[302] La Figura 7.7

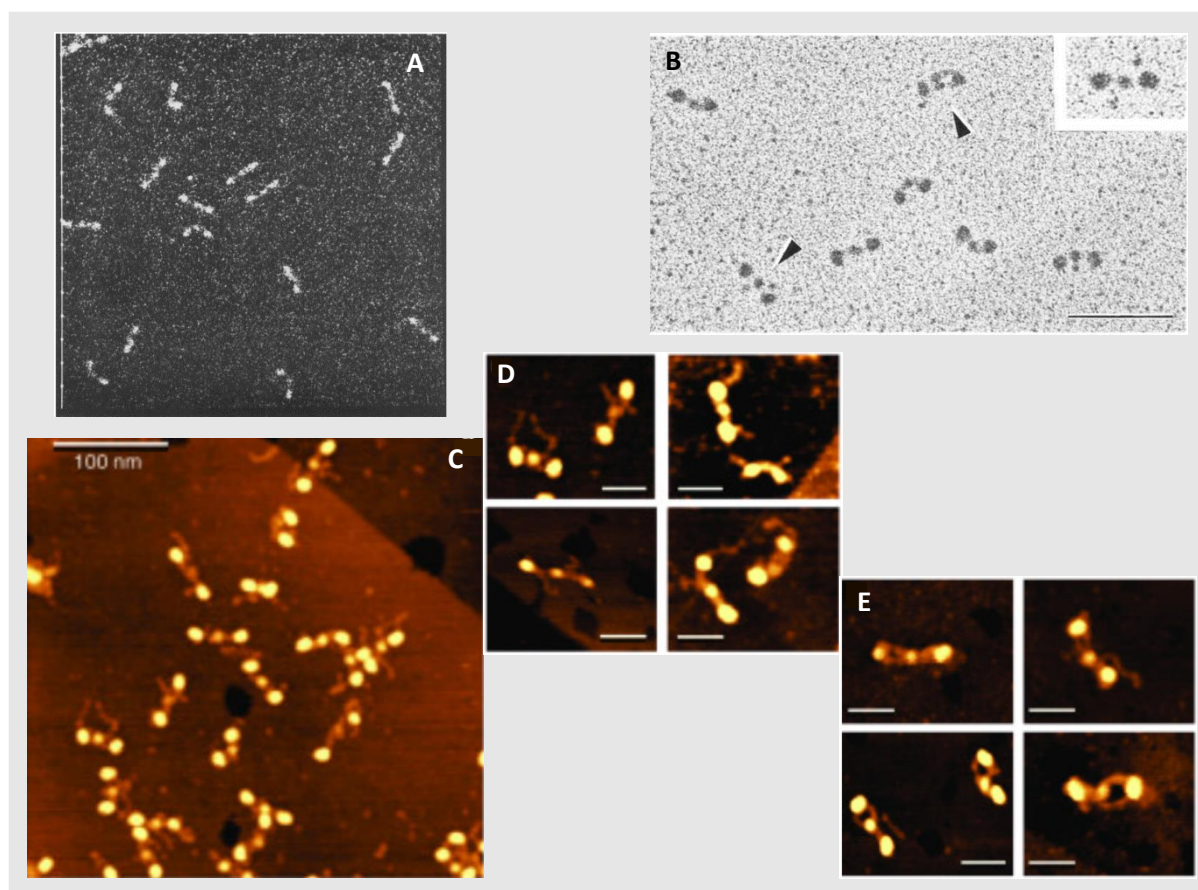


Figura 7.6. Imágenes de microscopía de la molécula de Fibrinógeno, recabadas de bibliografía. A. Imágenes de la molécula de Fg obtenidas con microscopio electrónico de transmisión de barrido, de Wall *et al.*^[317] B. Microscopía electrónica de transmisión de moléculas de Fg a pH 3.5; las flechas señalan algunos ejemplos de las especies más comúnmente observadas, que contienen una pequeña proyección en cada extremo, y el recuadro muestra un ejemplo a mayor aumento. De Veklich *et al.*^[318] C-E. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de moléculas individuales de Fg. C. Una imagen representativa. D. Moléculas de Fg con una o dos regiones α C saliendo de las regiones E centrales. E. Moléculas de Fg con las regiones α C perfectamente conectadas a las regiones E. Extraído de Protopopova *et al.*^[320]

muestra la región conectora- α C que contiene repeticiones en tándem y la superposición estructural con las estructuras PPII extraídas de 7JJV.^[326] En conjunto, el 50% de la secuencia A α 236–406 está plegada con características de PPII.



Figura 7.7. Región del Conector- α C que contiene conformaciones tipo Poli-L-prolina II. La región del conector- α C va desde los aminoácidos 236 a 406 en las cadenas A α , y contiene conformaciones tipo poli-L-prolina II (PPII) y una lámina- β formada por dos hebras antiparalelas, entre varios bucles. Arriba: comparación de secuencias entre la región conectora- α C (1) y las secuencias PPII de 7JJV (2). Los huecos representan bucles y láminas- β en la cadena de Fg. Abajo: superposición estructural, siendo el conector- α C el rojo y las estructuras de 7JJV las amarillas. La superposición estructural se muestra desde dos perspectivas rotadas.

2.1.1.2. Dominio- α C

Los estudios del dominio- α C mostraron que puede dividirse en dos subdominios: el subdominio N-terminal y el subdominio C-terminal. Al igual que los dos conectores- α C, los dos dominios- α C no exhibieron el mismo plegamiento, lo que significa que no se comportaron de manera simétrica. Por lo tanto, las estructuras secundarias encontradas en esta porción de la cadena A α A no son las mismas que las encontradas en la cadena A α D.

2.1.1.2.1. Subdominio N-terminal

La NMR utilizada para establecer la estructura 3D de un fragmento del dominio- α C bovino reveló dos láminas- β antiparalelas que forman una horquilla- β restringida por el enlace disulfuro Cys⁴⁴²–Cys⁴⁷².^[327] Sin embargo, la estructura 3D completa de la región colapsada cercana a la horquilla no se determinó debido a la ambigüedad de la resonancia que surge de las porciones desordenadas de este fragmento. Un fragmento bovino más corto, bA α 406–483, desprovisto de tales porciones desordenadas, reveló una segunda horquilla- β en la región

hidrofóbica colapsada, y el mismo plegamiento se observó en el fragmento homólogo humano hA α 440–518.^[328,329] Sin embargo, las intensidades de los picos fueron más bajas que las de la estructura bovina, y los datos de relajación NMR revelaron que los residuos correspondientes a la segunda horquilla- β son más móviles en el fragmento humano y, por lo tanto, forman una conformación menos estable que en la contraparte bovina. Estos resultados complicaron el análisis de los datos espectrales NMR e impidieron el establecimiento de la estructura completa del fragmento humano hA α 440-518. En nuestro modelo, que contiene la secuencia completa, se visualizó una estructura secundaria de horquilla- β cercana al puente disulfuro en la cadena A α A. La presencia de una única horquilla- β en esta sección también fue encontrada en un reciente estudio de modelado estructural integrativo que utilizó predicción de estructuras de proteínas y docking proteína-proteína, combinado con cross-linking MS (XL-MS).^[330] El resto de este subdominio es desordenado, principalmente en una conformación extendida, tanto para las cadenas A como D.

2.1.1.2.2. Subdominio C-terminal

Mientras que las fracciones monoméricas de dominios- α C exhiben espectros CD que indican una cantidad considerable de estructuras desordenadas, las fracciones oligoméricas muestran un aumento significativo en sus estructuras regulares, principalmente un aumento en el contenido de láminas- β , indicando la formación de estructuras regulares adicionales durante su oligomerización.^[331] El trabajo citado anteriormente, que utiliza XL-MS como técnica analítica, también halló láminas- β en el subdominio C-terminal, en fibrina polimerizada. Nuestro modelo demuestra una estructura globular compacta en la porción C-terminal, con la presencia de una lámina- β que comprende dos hebras, a pesar de estar en forma monomérica. Esta lámina- β se observa en la cadena A α D. Esto sugiere que podría existir cierto grado de plegamiento en los monómeros, que no fue detectable en experimentos previos, y que se vuelve más pronunciada durante la oligomerización. Imágenes de AFM también respaldan la presencia de una estructura compacta en la porción C-terminal del dominio- α C.^[332]

En resumen, algunas de las características más intrigantes que surgen de la nueva estructura involucran las regiones del conector- α C y el dominio- α C. Estas regiones α C, recientemente modeladas, exhiben varias estructuras secundarias. El conector- α C muestra una conformación de coil aleatoria caracterizada por numerosos bucles, ordenamientos tipo PP2, y una lámina- β , compuesta por dos hebras β antiparalelas (horquilla- β). El dominio- α C forma una estructura globular, con una de las cadenas A α (cadena A) conteniendo una horquilla- β en el subdominio

N-terminal, y la otra cadena A α (cadena D) conteniendo una lámina- β paralela compuesta por dos hebras. Es importante destacar que los patrones de plegamiento en las dos cadenas A α no son idénticos.

La visualización de las regiones α C del Fg mediante AFM de alta resolución^[320] permitió la determinación de algunas características estructurales de las moléculas de Fg. En primer lugar, se observó una heterogeneidad estructural de las regiones α C. Esto es, aunque las regiones centrales y laterales (regiones D y E) eran razonablemente estables en todas las moléculas observadas (considerando su flexión natural), las regiones α C eran variables mostrando diferentes longitudes, orientaciones y plegamientos, no solo de molécula a molécula, sino que, en la misma molécula, las dos regiones α C mostraban un comportamiento diferente, como en nuestro modelo durante la simulación. Esto confirma la idea, ya mencionada, de que estas regiones son libres y están en constante movimiento, lo que explica la razón por la cual no se resuelven en experimentos de rayos X. Comparando esas imágenes con nuestro resultado, coinciden. Algunas moléculas en las imágenes muestran dos estructuras compactas, una en el medio y otra en el extremo de la región α C, en algunos casos hay una flexión de las regiones que ocurre cerca de la estructura globular central, y estas regiones α C sobresalen del resto de la molécula en las regiones centrales E, como en nuestro modelo. Finalmente, cuando se midió la longitud promedio de las protrusiones observadas (regiones α C) en este estudio previo, se obtuvo un resultado de 21 ± 6 nm. Esa longitud coincide con la de nuestro modelo.

Cabe señalar que hay una serie de posibles conformaciones que pueden ocurrir en solución, que difieren en la flexión y torsión de las regiones de hélice enrollada como se observa mediante cristalografía, y también difieren en la conformación y longitud de las regiones α C como se observa mediante microscopía. Esto refleja la flexibilidad de la molécula que ocurre en solución y especialmente en la sangre circulante. Por lo tanto, nuestro modelo no exploró todas las posibilidades de conformaciones de la molécula completa y de las regiones α C, sin embargo, obtuvimos una de las posibles estructuras. Además, a partir de esta estructura es viable realizar más experimentos de MD para observar diferentes opciones conformacionales.

Finalmente, una de las limitaciones del presente estudio es la omisión de grupos de carbohidratos móviles que existen adyacentes a los bolsillos de la cadena B β , y pueden desempeñar un papel en el ensamblaje del Fg. La investigación futura sobre el proceso de formación de Fb debería incorporar estos grupos.

2.1.2. *Análisis de Desviación Cuadrática Media, Radio de Giro y Área de Superficie Accesible al Solvente*

La RMSD caracteriza la dependencia temporal de la desviación de la geometría de la proteína con respecto a la estructura inicial. En cuanto al análisis estructural de RMSD de la trayectoria de simulación de MD, se utilizó el fotograma 0 de la dinámica, que es justo después del paso de equilibrio de 1 ns, como punto de referencia. La Figura 7.8 muestra la evolución del RMSD de los C α de la molécula completa de Fg y de sus cadenas. Se observa una estabilización del valor de RMSD para la mayoría de las cadenas, excepto para las cadenas B y D. La cadena B presenta un RMSD que aparentemente se comienza a equilibrar, justo antes de que termine la simulación; y la cadena D sufre una flexión en los últimos nanosegundos de la simulación, resultando en el aumento observado en los valores de RMSD para esa cadena y para la molécula completa. También podemos observar que las cadenas A α presentan los valores de RMSD más altos, seguidas por las cadenas B β y las cadenas γ con los valores más bajos. Comparando las cadenas A α , se comportan de manera similar hasta la mitad de la simulación, en la que la cadena A supera a la cadena D. Esto ocurre hasta el tiempo de 20 ns, en el cual hay un cambio y la cadena D comienza a aumentar su RMSD mientras que la cadena A se estabiliza. Entre las cadenas B β , la cadena B presenta valores de RMSD más altos durante toda la simulación. Finalmente, las cadenas γ se comportan de la misma manera durante la simulación.

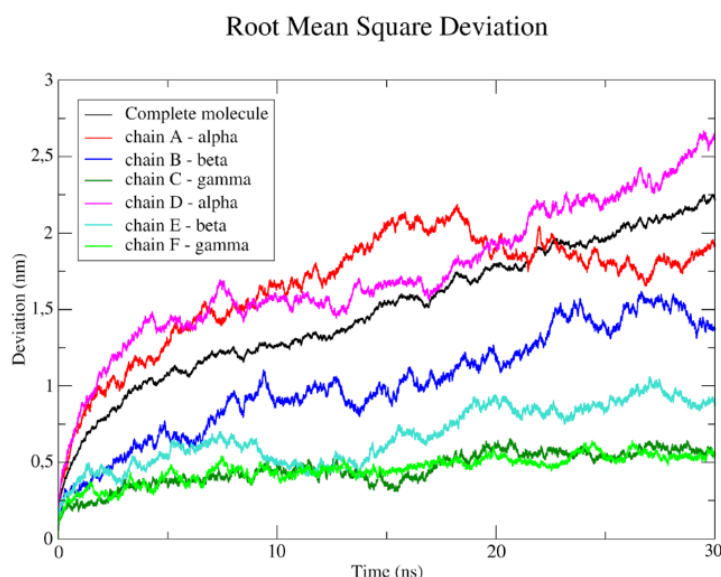


Figura 7.8. Desviación Cuadrática Media de la molécula de Fibrinógeno y sus cadenas durante la Simulación de MD. El Desvío Cuadrático Medio (RMSD, en nm) de la molécula de fibrinógeno completa y de sus cadenas individuales se monitoreó durante el transcurso de la simulación de dinámica molecular atómica (en ns) para evaluar la estabilidad estructural. La línea negra representa el RMSD de la molécula completa; las líneas roja y magenta representan el RMSD de las cadenas A α (A y D); las líneas azul y cian representan el RMSD de las cadenas B β (B y E); y las líneas verde oscuro y verde claro representan el RMSD de las cadenas γ (C y F).

En general, los gráficos de RMSD presentados en la Figura 7.8 indican que hay una tendencia a la equilibración del sistema y que las cadenas A α son más variables que el resto de las cadenas. El RMSD de las cadenas de Fg oscila alrededor de un valor de equilibrio, sugiriendo que su geometría alcanzó el mínimo local, sin embargo, debería continuarse esta simulación para obtener tiempos de producción mayores que permitan asegurar la situación de equilibrio. El RMSD del complejo molecular como un todo indica que se requiere más tiempo de muestreo para caracterizar correctamente el sub-estado conformacional alcanzado.

Puede observarse del RMSD que las cadenas A α están más alejadas de la geometría inicial que el resto de la molécula, lo cual tiene sentido ya que las cadenas A α contienen una gran porción que se modeló *de novo*, que son altamente móviles.

El RG está relacionado con la compacidad de la proteína. El RG se calcula para ver si los cambios en RMSD son causados por variaciones en la estructura secundaria, o si apuntan a cambios en las dimensiones de la proteína. Se observó que el RG es estable a lo largo de la simulación, oscilando entre 13.5 y 13.8 nm, con un punto bajo al inicio de la simulación y un punto alto al final de la simulación, lo que apunta a una dimensión de la proteína ligeramente variable, relacionada con su naturaleza móvil y flexible, y se explica por la flexión de las regiones de triple hélice enrollada, y por el plegamiento de las regiones α C. El aumento final podría explicarse por la elongación de la región α C de la cadena D que ocurre en los últimos nanosegundos de la simulación. Con respecto al SASA, hay una disminución, que indica una estabilización del sistema. En otras palabras, las simulaciones de MD presentan una estabilización estructural en el tiempo de producción de 30 ns.

2.1.3. *Análisis de Fluctuación Cuadrática Media*

En cuanto a la RMSF, se refiere al grado de fluctuación de las partículas desde su posición promedio a lo largo del tiempo (en este caso, 30 ns). El RMSF se calcula para cuantificar el movimiento de aminoácidos individuales, representados aquí por sus átomos de C α . El RMSF de las tres cadenas de Fg se muestra en la Figura 7.9, con una imagen de la estructura 3D de la cadena correspondiente indicando partes interesantes. Todos los gráficos presentan una forma de sierra típica en α -hélices, correspondientes a las regiones de la triple hélice enrollada, y un alto RMSF al principio y al final de las cadenas que representa los extremos desplegados. La triple hélice enrollada está formada por los aminoácidos A α 48–161, B β 79–187, y γ 22– γ 133, y es interrumpida por una sección de 11 residuos (γ 68–78) en la cadena γ . Esta interrupción se

denomina γ -coil y es un segmento no helicoidal de la cadena γ . Esta es una característica intrínseca de la región de triple hélice enrollada, caracterizada por una alta densidad de residuos de Pro y Gly.

Las cadenas $A\alpha$ conservan su estructura α -helicoidal en la sección de la hélice enrollada durante toda la simulación, con valores más altos en esta región para la cadena D (Figura 7.9a). Antes de esta región, hay un aumento en el RMSF asociado con la región N-terminal que incluye FpA, que no presenta una estructura definida. Después de la región de la hélice enrollada, el RMSF aumenta considerablemente debido a la región αC con sus diferentes dominios. Hay un pico significativo que corresponde a una sección del conector- αC que presenta alta movilidad.

El RMSF de las cadenas $B\beta$ (Figura 7.9b) es similar al de las cadenas $A\alpha$ en los primeros 200 residuos. Representa la estructura α -helicoidal de la hélice enrollada de la cadena con perturbaciones locales. También muestra un aumento en las porciones N y C-terminales, con una asimetría en el N-terminal siendo la movilidad desigual en las cadenas B y E. A lo largo de la mayor parte de la secuencia, los valores de RMSF de la cadena B son más altos que los de la cadena E.

La característica más destacada en el RMSF de las cadenas γ (Figura 7.9c) es un pico en el medio de la curva de la sección de la hélice enrollada, que representa el γ -coil flexible. Este pico es más alto en la cadena F que en la cadena C, lo que significa que su γ -coil es más flexible. Hay otro pico alrededor del $\gamma 100$ en la cadena F, que no está presente en la cadena C. El γ -coil es una característica interesante, ya que se ha sugerido que facilita la flexión de todo el dominio de triple hélice enrollada, y se han detectado sitios de corte por plasmina en su proximidad.^[333]

Para complementar este estudio, la estructura de la última pose de la trayectoria MD se coloreó según el RMSF de los átomos de C_{α} . En la Figura 7.10, se muestra esta representación 3D de la molécula completa de Fg indicando el RMSF del C_{α} de cada residuo. Se observa una alta flexibilidad en los extremos terminales de cada cadena, donde estos residuos forman estructuras secundarias en forma de bucle. Específicamente, hay una zona de altos valores de RMSF en el dominio- αC globular. Las regiones de triple hélice enrollada muestran valores de RMSF más bajos. Sin embargo, se observan variaciones en el RMSF dentro de estas regiones, con el γ -coil y el segmento que le sigue mostrando valores de RMSF más altos, lo que indica una tendencia hacia la flexión.

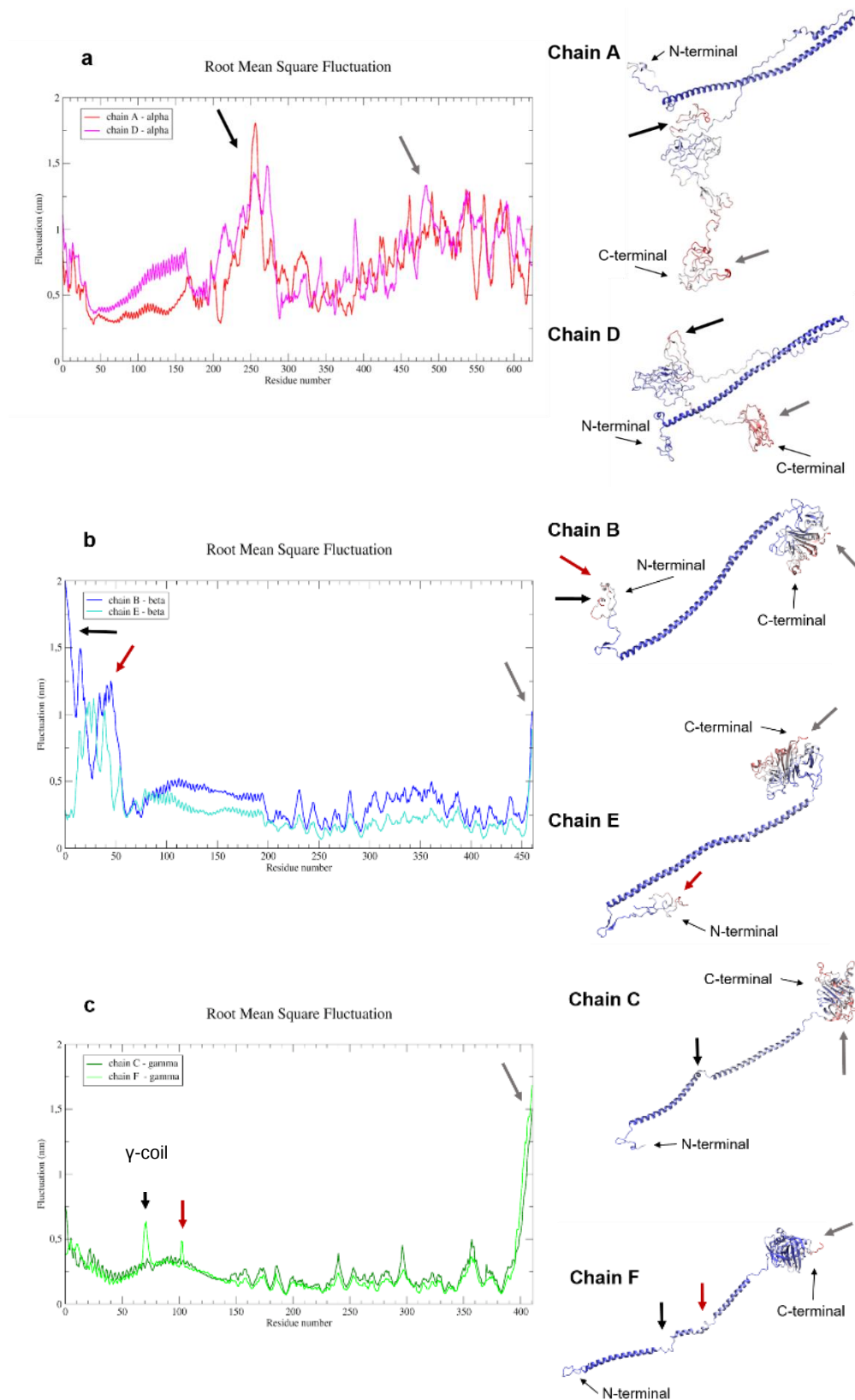


Figura 7.9. Fluctuación Cuadrática Media de las cadenas del Fibrinógeno. Se presenta la Fluctuación Cuadrática Media (RMSF) de cada C_{α} en las cadenas de fibrinógeno durante la simulación de MD atómica. En el lado izquierdo, un gráfico muestra la fluctuación en nanómetros (nm) en función del número de residuo. En el lado derecho, una representación 3D de las cadenas correspondientes está coloreada según el valor de RMSF, con rojo indicando la mayor fluctuación y azul la menor. **(a)** Cadenas $A\alpha$ A y D. **(b)** Cadenas $B\beta$ B y E. **(c)** Cadenas γ C y F. Las flechas indican secciones altamente móviles de la estructura tanto en los gráficos como en la estructura 3D. También se indica el γ -coil y las regiones N- y C-terminales

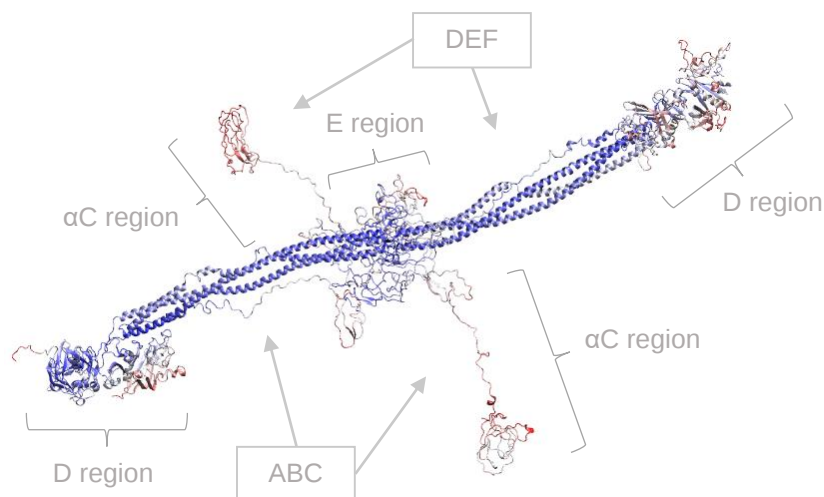


Figura 7.10. Fluctuaciones Cuadráticas Medias de cada residuo de la molécula de Fibrinógeno. Representación tridimensional de la molécula de fibrinógeno coloreada según la Fluctuación Cuadrática Media (RMSF) de sus átomos de C_{α} . El gradiente de color varía de azul, que indica la menor fluctuación, pasando por gris/blanco para fluctuaciones intermedias, hasta rojo para la mayor fluctuación.

Para observar la evolución de la estructura a lo largo de la simulación, la Figura 7.11 muestra una superposición de poses extraídas al inicio, a mitad y al final de la simulación. Las flechas azules en la figura señalan movimientos interesantes que ocurrieron durante la simulación, como la aproximación de la primera porción de los conectores- α C hacia la región de la hélice enrollada, compactando la estructura, y el movimiento de la porción final de la región α C de la cadena D que ocurre al final de la simulación. También se puede observar que, mientras la región central E permanece relativamente estable, hay una flexión moderada en las regiones de triple hélice enrollada, particularmente desde la mitad de cada una (γ -coil) hacia afuera. En general, los cambios estructurales observados durante la simulación resaltan la naturaleza flexible de la molécula de Fg, particularmente en las regiones α C y las regiones de triple hélice enrollada.

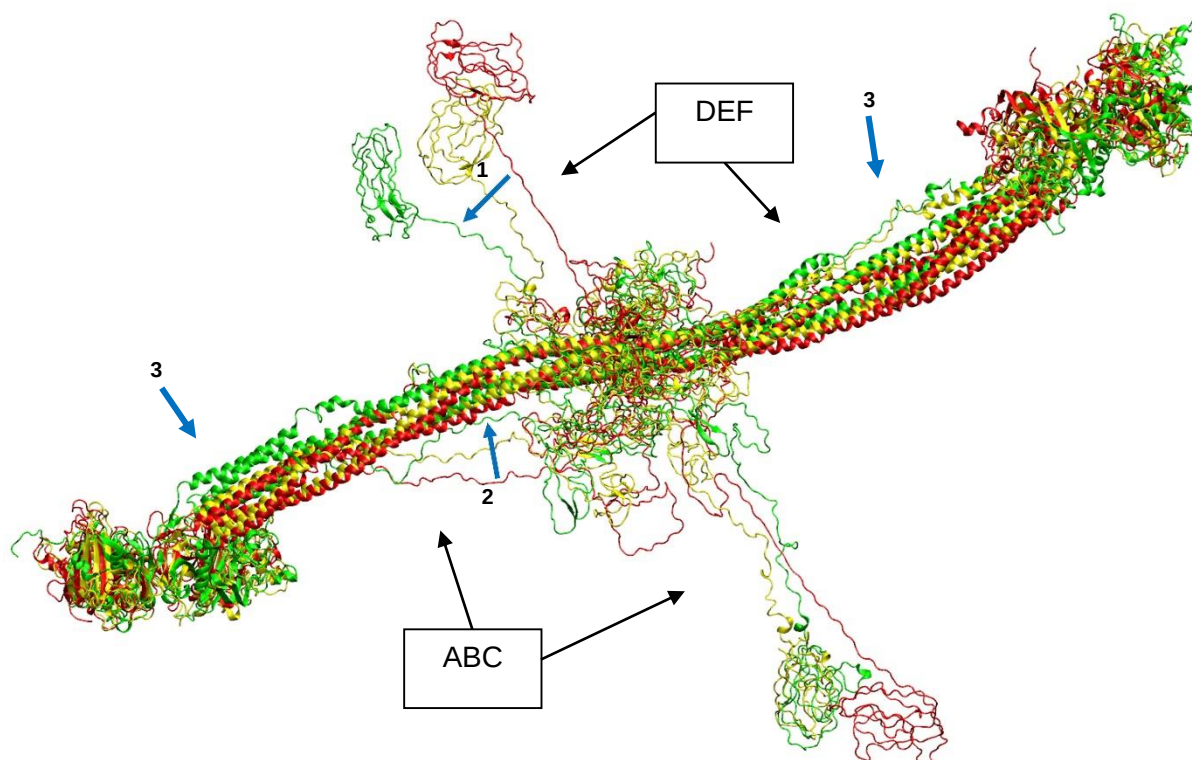


Figura 7.11. Evolución estructural del sistema de la molécula de Fibrinógeno. La figura ilustra la evolución estructural de la molécula de fibrinógeno a lo largo de la simulación. La estructura inicial se representa en rojo, una pose del medio de la simulación en amarillo y la estructura final en verde. La flecha número 1 resalta la flexión de la segunda porción de una región αC durante los últimos nanosegundos de la simulación. La flecha número 2 indica el acercamiento de la primera porción de la región αC hacia la triple de hélice enrollada. La flecha número 3 señala el movimiento de flexión moderado de las regiones de triplehélice enrollada, comenzando desde la bisagra del γ -coil hacia afuera.

2.1.4. *Análisis de Enlaces de Hidrógeno*

Para comprobar si se están produciendo nuevas interacciones, se realizaron cálculos del número de enlaces de hidrógeno y se graficaron (no se muestran aquí). Se observa un aumento en la cantidad total de enlaces de hidrógeno. Viendo el número de enlaces de hidrógeno por cadena, se observa un valor estable en las cadenas $B\beta$ y γ , y un aumento en las cadenas $A\alpha$. El número de enlaces de hidrógeno dentro de las regiones de los conectores- αC también presenta un aumento. El número de enlaces de hidrógeno que se generan entre las cadenas A y D aumentan, y entre las regiones de los conectores- αC no se observan cambios significativos.

Estos resultados sugieren que hay un aumento en los enlaces de hidrógeno, particularmente en las cadenas $A\alpha$, y en su mayoría de manera intra-cadena, más que inter-cadena. Esto podría atribuirse al plegamiento de las regiones αC .

2.1.5. Energías Absolutas

La Tabla 7.1 muestra los valores de todas las energías por cadena. La evolución de la energía a lo largo de las etapas de minimización, annealing molecular, equilibrio de la simulación, y producción, así como las propiedades como temperatura, presión y volumen, exhiben una estabilidad global. Cuando se analizan los diferentes componentes de la energía total del sistema biomolecular, se observa la misma estabilidad.

Tabla 7.1. Valor medio $\pm$ SD (kcal/mol) de la energía total y de los tipos de energías, para cada cadena de Fibrinógeno. TOTAL: energía total. BOND: energías enlazadas. ANGLE: energías angulares. DIHEDRAL: energías de ángulo diedro. IMPROP: energías de ángulo impropio. ELECTRO: energías electrostáticas. VDW: energías de van der Waals. CONF: energías conformacionales. NONBOND: energías de interacciones no enlazadas.

Fibrinógeno		TOTAL	BOND	ANGLE	DIHEDRAL	IMPROP	ELECTRO	VDW	CONF	NONBOND
Cadenas A α	A	1575 $\pm$ 257	2042 $\pm$ 38	5574 $\pm$ 61	5343 $\pm$ 64	341 $\pm$ 13	-10557 $\pm$ 223	-1168 $\pm$ 64	13300 $\pm$ 98	-11725 $\pm$ 237
	D	1845 $\pm$ 294	2041 $\pm$ 39	5571 $\pm$ 61	5358 $\pm$ 64	340 $\pm$ 13	-10334 $\pm$ 287	-1131 $\pm$ 54	13310 $\pm$ 102	-11465 $\pm$ 279
Cadenas B β	B	-846 $\pm$ 205	1558 $\pm$ 34	4235 $\pm$ 52	4360 $\pm$ 35	263 $\pm$ 11	-9846 $\pm$ 193	-1417 $\pm$ 38	10417 $\pm$ 73	-11263 $\pm$ 192
	E	-1196 $\pm$ 175	1556 $\pm$ 34	4253 $\pm$ 52	4377 $\pm$ 34	265 $\pm$ 12	-10184 $\pm$ 168	-1464 $\pm$ 34	10451 $\pm$ 69	-11648 $\pm$ 170
Cadenas γ	C	1606 $\pm$ 174	1354 $\pm$ 30	3670 $\pm$ 47	3875 $\pm$ 32	235 $\pm$ 11	-6293 $\pm$ 172	-1234 $\pm$ 39	9134 $\pm$ 64	-7528 $\pm$ 164
	F	1643 $\pm$ 226	1352 $\pm$ 30	3669 $\pm$ 50	3892 $\pm$ 28	234 $\pm$ 12	-6267 $\pm$ 215	-1236 $\pm$ 33	9147 $\pm$ 68	-7503 $\pm$ 215

2.1.6. Análisis de Energías de Interacción

Las energías de interacción se refieren a las interacciones no covalentes, incluyendo las fuerzas de VdW y las fuerzas electrostáticas, entre dos grupos de átomos. Estas energías pueden calcularse a partir de la simulación de MD. La energía de interacción de la molécula completa de Fg con el solvente presenta una disminución inicial, seguida de un ligero aumento hasta el tiempo 23 ns, donde se observa una pequeña disminución y estabilización.

Al analizar las interacciones entre cadenas, algunas destacan y la evolución de sus energías de interacción se muestran en la Figura 7.12. Comenzando con las energías de interacción entre cadenas idénticas, una es la interacción entre cadenas A α (cadena A y cadena D) que sufre una disminución en los últimos nanosegundos de la simulación (Figura 7.12a). Observando específicamente las energías de interacción en las dos secciones en las que interactúan la cadena A y la cadena D, que son las porciones N-terminales (residuos 1 a 100) y el conector- α C (residuos 158 a 487), se puede observar que durante la mayor parte de la simulación es la segunda porción la responsable de la energía de interacción total, hasta los últimos 5 ns, en los que hay una caída en ambas porciones N-terminal y conector- α C.

Continuando con las cadenas B β (B y E), interactúan en sus porciones N-terminales y se observa una disminución en la energía de interacción durante la simulación. Finalmente, las cadenas γ (C y F) no muestran cambios significativos en las energías de interacción a lo largo de la simulación (estos gráficos no se presentan).

Al analizar las energías de interacción entre las cadenas A α y B β de la misma mitad de la molécula, es interesante notar que hay una disminución en la energía de interacción entre la cadena A y la cadena B (Figura 7.12b). Este resultado también se puede observar estructuralmente, con el acercamiento de la inicialmente suelta primera sección de la región α C hacia la región de la triple hélice enrollada. De manera similar, las cadenas D y E (su contraparte simétrica) presentan una caída en sus energías de interacción, debido al acercamiento de A α a B β a nivel de la región de la triple hélice, siendo la disminución más significativa, lo cual se puede observar estructuralmente (lado derecho de la figura) (Figura 7.12c).

Observando las interacciones entre las cadenas A α y B β de ambas mitades de la molécula, las cadenas A y E presentan una energía de interacción en general estable, con un aumento y luego una disminución al final de la simulación. Las cadenas D y B presentan una disminución en sus energías de interacción (estos gráficos no se presentan).

Otra disminución en la energía se observa entre la cadena A (A α) y F (γ), que interactúan en las porciones N-terminales. Sus contrapartes simétricas, las cadenas D (A α) y C (γ), por el contrario, sufren un aumento en las energías de interacción (estos gráficos no se presentan).

Finalmente, las cadenas B (B β) y C (γ) no presentan cambios en su energía de interacción, a diferencia de sus contrapartes simétricas (cadenas E y F) que presentan una disminución en su energía de interacción. Las interacciones entre las cadenas A α y γ de la misma mitad de la molécula, y entre las cadenas B β y γ de mitades opuestas, no presentan cambios significativos a lo largo de la simulación (estos gráficos no se presentan).

A través de este análisis energético y estructural de las trayectorias obtenidas por MD, se concluye que el sistema biomolecular propuesto es termodinámicamente estable, aunque su desarrollo aún está en curso. Los gráficos que no se presentan aquí pueden encontrarse en el manuscrito “Unveiling the Architecture of Human Fibrinogen: A Full-length Structural Model” (manuscrito cbic.202400425 for ChemBioChem).

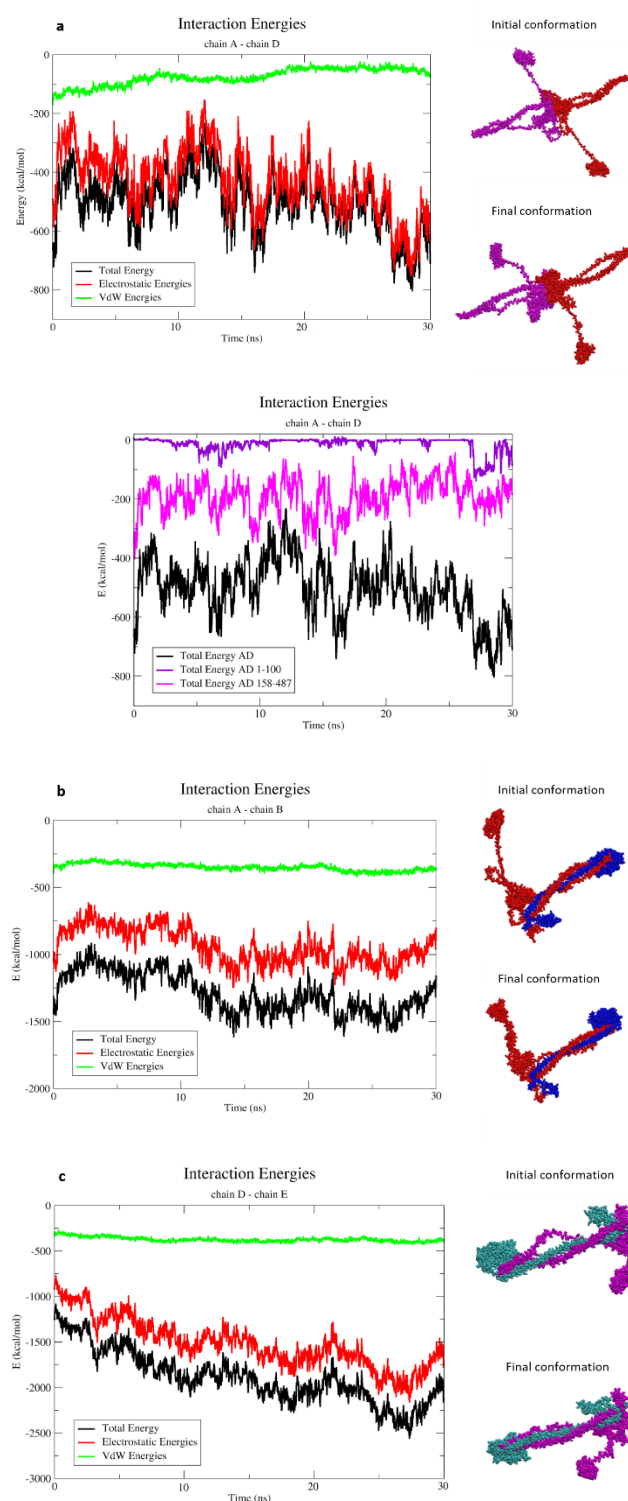


Figura 7.12. Energías de Interacción entre las diferentes cadenas del Fibrinógeno. Los gráficos muestran las energías de interacción (kcal/mol) entre pares de cadenas de fibrinógeno a lo largo de la simulación de dinámica molecular (tiempo en ns). El componente electrostático de la energía total de interacción se representa en rojo, las energías de van der Waals (VdW) en verde, y la energía total de interacción en negro. El lado derecho de la figura muestra las conformaciones estructurales de las dos cadenas que interactúan al principio y al final de la simulación. **(a)** Energías de interacción entre las cadenas A α A (roja) y D (magenta). Se muestra otro gráfico indicando las energías de interacción entre las porciones de las cadenas A y D que tienen contacto (aminoácidos 1-100 y 158-487). **(b)** Energías de interacción entre la cadena A α A (roja) y la cadena B β B (azul). **(c)** Energías de interacción entre la cadena A α D (magenta) y la cadena B β E (cian).

2.2. Simulaciones de Dinámica Molecular de Fibrinógeno y Fibrinógeno Nitrado

En cuanto al estudio del efecto de la nitración, primero se logró parametrizar el residuo de NO₂Tyr en el FF CHARMM36, con el código NTY, de modo que pueda ser incorporado en la estructura para su posterior simulación de MD. En esta parte del presente Capítulo los residuos se denominan por su código en el FF, que son NTY para NO₂Tyr, y TYR para Tyr.

2.2.1. *Estructura general*

Se partió de la estructura cristalográfica del Fg humano, la cual contiene 6 cadenas polipeptídicas (2 A α , 2 B β y 2 γ), 4 cationes Ca²⁺ (ubicados en los nódulos β y γ de las regiones D) y 4 ligandos tetrapeptídicos (2 GPRP y 2 GHRP, ubicados en los bolsillos Da y Db). Dos cosas cabe aclarar en este punto. Una es que, si bien las cadenas no están completas en el cristal, se utiliza esta estructura pues sí están las regiones de interés, que contienen los residuos de TYR o NTY y los ligandos. La otra es con respecto a estos ligandos, que se encuentran en el cristal pues se utilizan en el ensayo de cristalización para bloquear los bolsillos Da y Db, de modo de evitar la polimerización del Fg, y poder obtener la estructura cristalográfica de la molécula aislada. Estos ligandos son estructuralmente análogos a los botones E_A (GPRV) y E_B (GHRP) de los extremos N-terminales de las cadenas α y β , respectivamente, que interactúan con Da y Db para polimerizar. Con esta premisa, se aprovechó la presencia de estos ligandos para estudiar su interacción con el bolsillo, en ausencia y presencia de NTY. Se mutó el residuo P de GPRP por V, para que el ligando sea idéntico al botón E_A. La Figura 7.13 muestra la estructura de Fg de partida. En esta sección, la numeración de referencia de la secuencia de aminoácidos será según la secuencia de UNIPROT, que es completa e incluye al péptido señal, esto es Met¹ a Pro⁶⁴⁴ en la cadena A α , Met¹ a Gln⁴⁹¹ en la cadena B β , y Met¹ a Val⁴³⁷ en la cadena γ . La codificación de las cadenas y ligandos de la molécula de Fg es α - β - γ - α - β - γ como A-B-C-D-E-F, siendo A-B-C de una mitad y D-E-F de la otra mitad; y los ligandos se codifican G y H los que están en las cadenas γ C y F, respectivamente; e I y J, los que están en las cadenas β B y E, respectivamente.

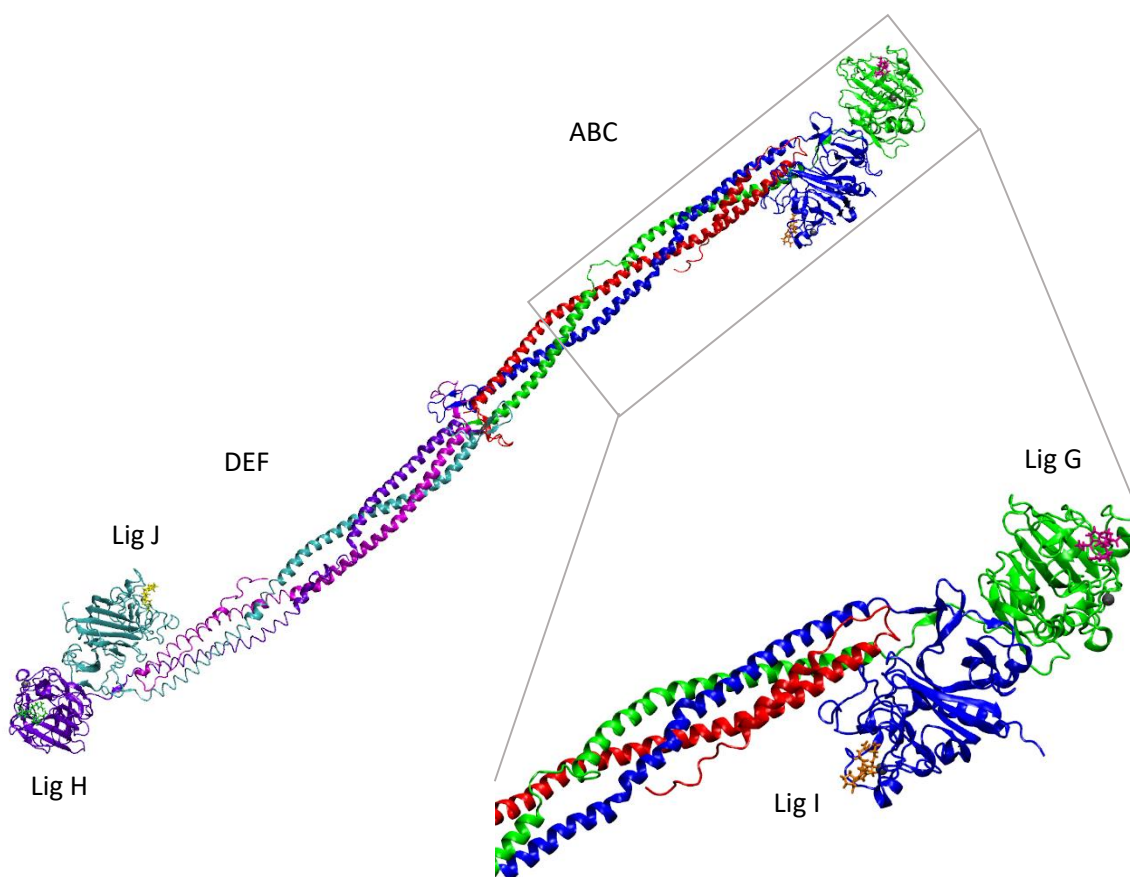


Figura 7.13. Estructura de partida de la molécula, para los ensayos de Fibrinógeno nativo y nitrado. Se observa la estructura cristalográfica de la molécula de Fg, en una representación de estructura secundaria, con las 2 cadenas α en colores rojo y magenta (A y D), las cadenas β en azul y cian (B y E), y las cadenas γ en verde y violeta (C y F). Además, se muestran los ligandos presentes dentro de los bolsillos. Ligando G (GPRV, fucsia), ligando H (GPRV, verde), ligando I (GHRP, naranja) y ligando J (GHRP, amarillo). Los 4 átomos de calcio se representan como esferas grises.

2.2.1.1. RMSD y RMSF

Con respecto a la estructura general de los dos modelos de Fg ensayados (Fg y $\text{NO}_2\text{Tyr-Fg}$), se puede observar en la Figura 7.14 los gráficos de RMSD totales y por cadena, y en la Figura 7.15 los gráficos de RMSF de cada cadena, para ambos.

Observando el gráfico de RMSD del Fg nativo (sin nitrar), destaca un aumento de la desviación en la segunda mitad de la simulación. Cuando se observa por cadena, se puede asociar ese aumento general a un aumento en la mitad de la molécula que contiene las cadenas $\alpha\beta\gamma$ DEF. En particular, la cadena α D presenta una desviación aumentada desde el comienzo de la simulación, que en un momento se estabiliza, y luego vuelve a aumentar más, junto a las otras dos cadenas con las que tiene contacto estrecho (E y F). Estas tres cadenas, si bien se desvían más que el resto, lo hacen como un todo, no habiéndose alejado entre ellas. El resto de las

cadenas (A, B y C) se mantienen estables durante toda la simulación, no superando los 5 nm de desviación media. En suma, esto da una idea de que una mitad de la molécula tendió a desviarse de la posición inicial, lo cual puede estar asociado al bending natural de la molécula que es fibrilar con un centro de simetría.

En cuanto al gráfico de RMSD del Fg nitrado, se observa un aumento marcado de la desviación al inicio, que luego se estabiliza rápidamente, y que presenta un leve aumento casi al final, pero que se estabiliza antes de terminar la simulación. Observando por cadena, existe un comportamiento en la primera mitad de la simulación, y otro diferente en la segunda. En la primera mitad se ve que las cadenas ABC y DEF difieren en desviación, siendo mayor la de las primeras (que a su vez representan una mitad de la molécula). Luego todas las cadenas se estabilizan en un valor de desviación intermedio, que no supera los 10 nm. Aquí también se observa un comportamiento diferencial de un lado y otro de la molécula, con un movimiento de las dos mitades.

Comparando las dos moléculas, lo primero que resalta es que la molécula de Fg nitrado presenta valores de RMSD mayores que los del Fg sin nitrar. Esto da idea de un mayor rango de movimiento de esta molécula. Otra observación que se puede hacer es que, en ambas moléculas, existe un comportamiento diferencial entre sus mitades.

Observando los gráficos de RMSF de las cadenas del Fg nativo (sin nitrar), destaca que para las tres cadenas $\alpha\beta\gamma$ DEF, los valores de fluctuación son mayores que para sus contrapartes $\alpha\beta\gamma$ ABC. Esto es coherente con lo discutido en cuanto a los resultados de RMSD comentados anteriormente, de que esa mitad de la molécula es más móvil. En cuanto a las formas de estos gráficos, se mantienen iguales en tendencia para cada par de cadenas. En el caso de las cadenas α se observa la típica forma de sierra en la zona de α -hélice, que es la mayor parte de la estructura. Para las cadenas β y γ también se observa la forma de sierra asociada a la α -hélice y luego una zona con mayores fluctuaciones en la zona de los dominios globulares que contienen estructuras láminas- β .

Los gráficos de RMSF del Fg nitrado presentan un comportamiento muy similar en cuanto a valores de fluctuación entre los pares de cadenas análogas. En cuanto a la forma de estos gráficos, son similares a los del Fg no nitrado. En la Figura 7.15 se indica con flechas los sitios donde se encuentran las TYR o NTY de interés, en las cadenas β y γ . Se puede observar que en las cadenas γ tanto la TYR³⁸⁰ como la NTY³⁸⁰ representan un aumento en el RMSF que se

ve como un pequeño pico. Es decir que esta posición es móvil, tanto en el Fg nativo como en el nitrado, aunque con valores algo mayores en este último.

Comparando los RMSF de las dos moléculas, resalta que la molécula de Fg nitrado presenta valores de RMSF mayores que los del Fg sin nitrar. Esto concuerda con los resultados de RMSD mayores para la esta molécula.

Se podría sumarizar en tanto el comportamiento estructural de las moléculas estudiadas, que el Fg nitrado presenta una mayor desviación y fluctuación, es decir, un movimiento general mayor. Sin embargo, el Fg no nitrado presenta una mayor diferencia de movimiento entre sus dos mitades.

Este comportamiento puede deberse a la naturaleza móvil del Fg como proteína fibrilar y de gran tamaño, y también puede asociarse a la presencia de NTY. Se ha observado que cambios funcionales puntuales son capaces de generar alteraciones a nivel estructural a gran escala como los que se están observando.^[334] Para confirmar este comportamiento es necesario aumentar los tiempos de simulación y realizar réplicas.

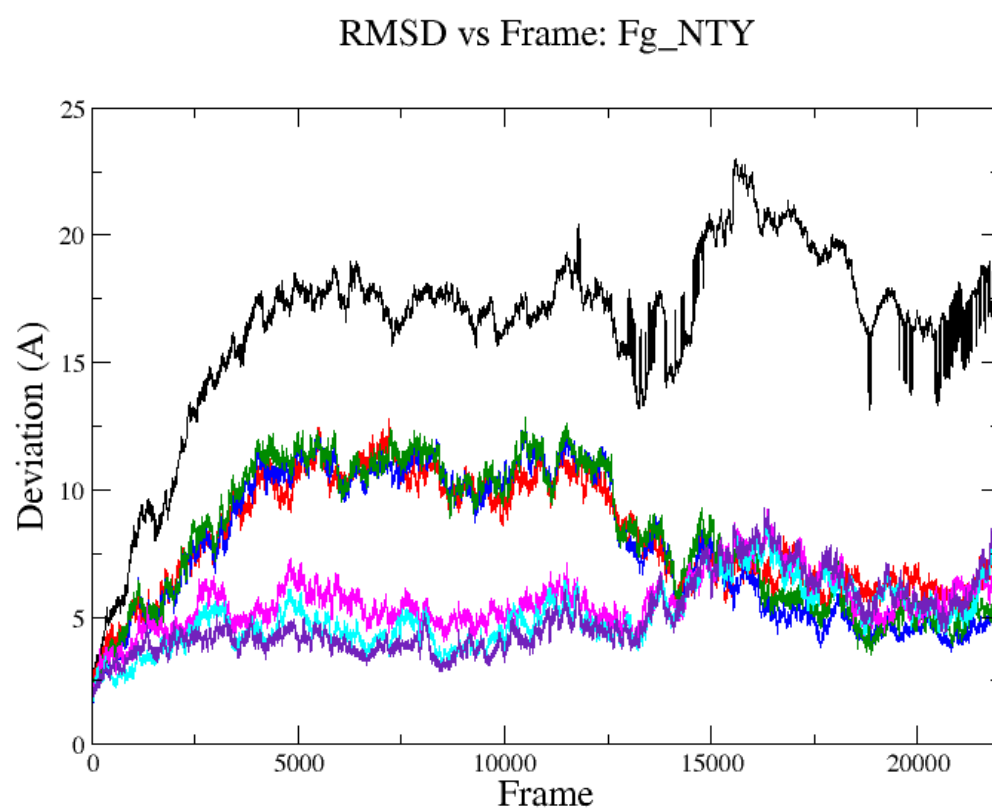
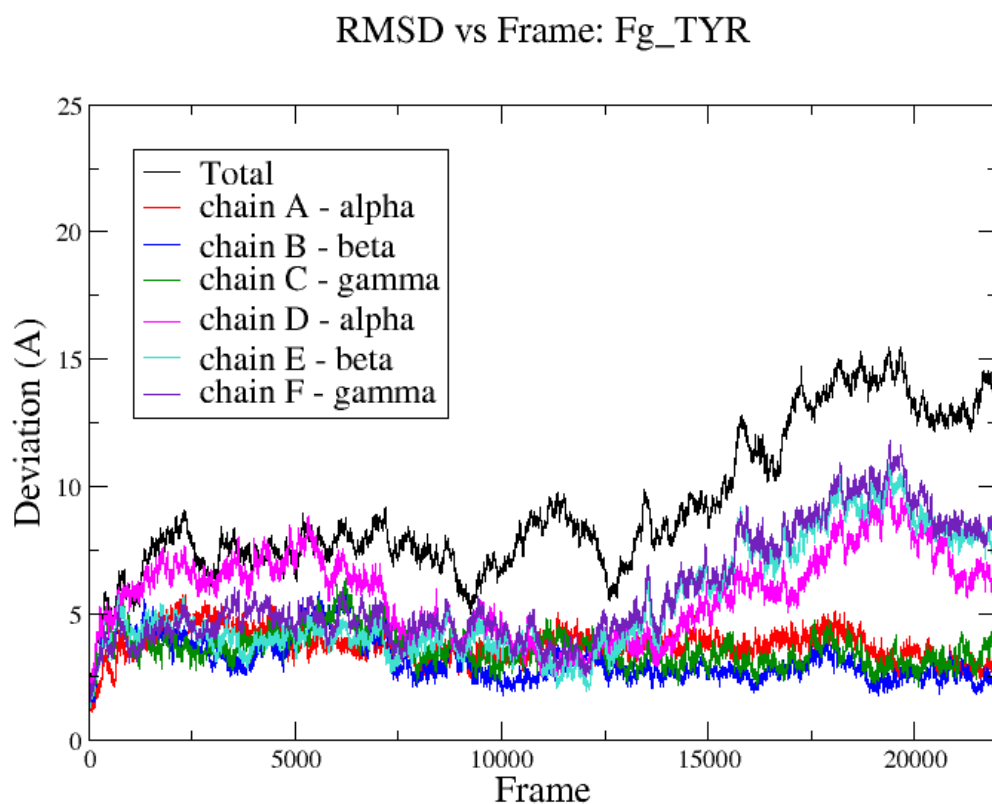


Figura 7.14. Desviación Cuadrática Media de las moléculas de Fibrinógeno y de Fibrinógeno nitrado. Se observa el RMSD de la molécula de Fg (arriba) y de Fg nitrado (abajo), para la proteína total y para cada cadena.

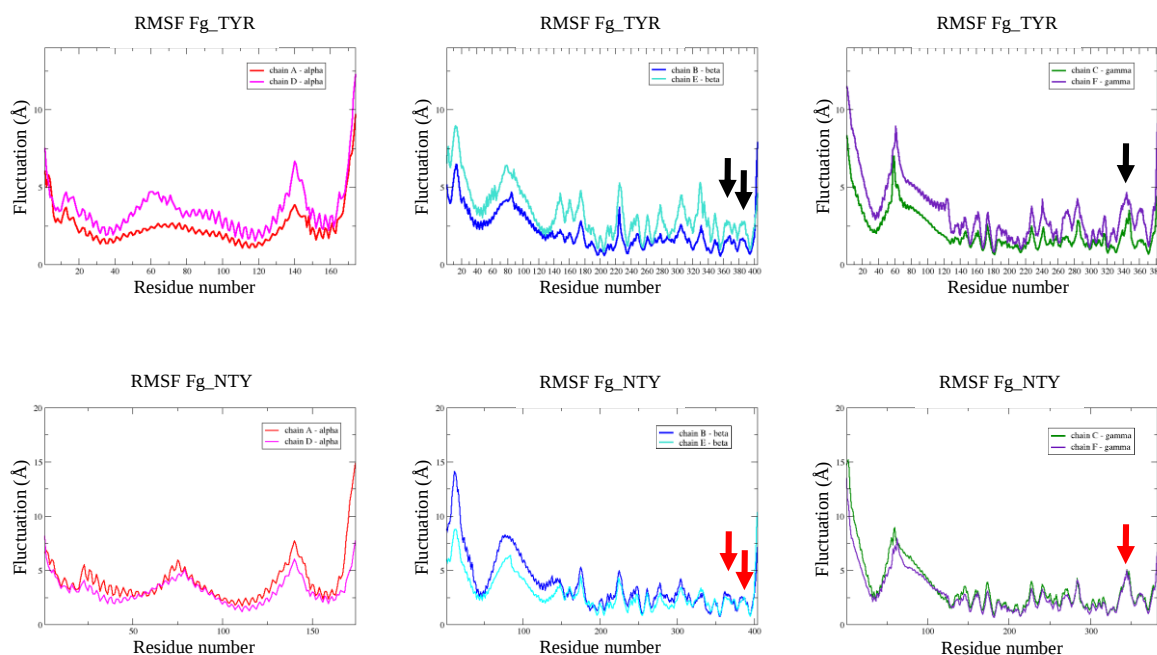


Figura 7.15. Fluctuación Cuadrática Media de las cadenas de Fibrinógeno y de Fibrinógeno nitrado. Se observan los RMSF de las cadenas α (rojo y magenta), β (azul y celeste), y γ (verde y violeta) de la molécula de Fg (arriba) y de Fg nitrado (abajo). Las flechas indican las posiciones de TYR (negras) y NTY (rojas) de interés.

2.2.2. Análisis de residuos de Tyr y NO_2Tyr

Así, se pudo modelar la molécula de Fg conteniendo residuos NTY en posiciones específicas que son las que mostraron estar más nitradas en ACVi, según los resultados expuestos en el Capítulo 3. Estas NTY se encuentran, como se indicó anteriormente, en lugares interesantes pues están cercanas a los sitios de interacción $\text{E}_\text{A}:\text{Da}$ y $\text{E}_\text{B}:\text{Db}$, tal como se muestra en la Figura 7.16. Recordamos que estos sitios de interacción permiten a las moléculas de Fb soluble (Fg cuyos FpA y FpB fueron clivados por trombina) polimericen para formar redes de Fb insoluble, es decir, el coágulo. Estos residuos están en las posiciones 452 y 475 en la cadena β y 380 en la cadena γ , se hicieron varias mediciones con el objetivo de evaluar cambios en el entorno, cuando el residuo de Tyr está nitrado.

2.2.2.1. Entorno

En cuanto al entorno de cada una de estas TYR/NTY, se extrajo una lista de residuos presentes en un entorno de 5 Å al final de la simulación, para cada TYR y NTY, que se muestran en la Tabla 7.2. También se realizaron cálculos de RMSD de ese entorno, y se obtuvieron los gráficos de la Figura 7.17.

Cuando se observan los residuos presentes en el entorno de las TYR del Fg no nitrado, comenzando por la TYR⁴⁵² cercana al bolsillo Db, que se encuentra en la cadena β B, se puede observar la presencia de 17 residuos. Al comparar con la misma TYR, en la misma molécula, pero en la cadena β E, se observa que hay 19 residuos, con dos residuos más dentro del entorno (TRP⁴¹⁸ y VAL⁴⁶⁵). Esto representa una variabilidad propia del movimiento de cada TYR, que no tiene por qué ser idéntico de los dos lados de la molécula. Continuando con la comparación entre las TYR⁴⁷⁵, también cercanas a los bolsillos Db, se observa que en la cadena β B hay 19 residuos en el entorno, mientras que en la β E hay 17 residuos, habiendo 3 residuos presentes en B y no en E (GLU³⁴⁵, TYR⁴⁴⁷ y TRP⁴⁶⁷), y un residuo presente en E y no en B (GLY³⁴⁹). Esto tampoco representa una diferencia significativa. Terminando con las TYR³⁸⁰ cercanas al bolsillo Da, dentro de la molécula de Fg no nitrado, vemos que tanto en la cadena γ C como en la γ F, la cantidad de residuos del entorno es la misma, y los residuos también son los mismos. En suma, dentro de la molécula de Fg no nitrado, los entornos de los residuos de TYR de interés no presentan variaciones al comparar las dos mitades de la molécula.

Cuando se observan los residuos presentes en el entorno de las NTY del Fg nitrado, comenzando por las NTY⁴⁵² cercanas a los bolsillos Db en las cadenas β B y E, se puede observar la presencia de 19 residuos en ambas. El entorno de la cadena B contiene un residuo que la cadena E no contiene (VAL⁴⁶⁵) y viceversa (HSE⁴⁵⁹). Esto representa una variabilidad propia del movimiento de cada NTY. Continuando con la comparación entre las NTY⁴⁷⁵, se observa que en el entorno de la cadena β B hay 16 residuos, mientras que en la β E hay 20 residuos, habiendo 4 residuos presentes en E y no en B (ASP⁴⁶³, TRP⁴⁶⁷, TRP⁴⁷⁰ y ARG⁴⁷⁸). Esto podría representar una diferencia, aunque también podría ser una variación normal. Terminando con las NTY³⁸⁰ dentro de la molécula de Fg nitrado, que están presentes cercanas a los bolsillos Da, vemos que en el entorno de la cadena γ C hay 11 residuos, mientras que en la γ F hay 13 residuos. Aquí hay varios residuos que están en la cadena C y no en la F (VAL³⁷³, TYR³⁷⁴, GLN³⁷⁶ y ALA³⁸³), mientras que hay otros que están en la cadena F y no en la C (ASP³⁹⁰, ASN³⁹¹, GLY³⁹², ILE³⁹⁴, TYR⁴⁰³ y SER⁴⁰⁸). Esta diferencia entre los entornos de los dos residuos de NTY³⁸⁰ de la molécula de Fg nitrado podría ser significativa, y estar relacionada a la diferencia de comportamientos que se observó para las dos NTY³⁸⁰. En suma, dentro de la molécula de Fg nitrado, al observar los entornos de los residuos de NTY de interés, y comparando las dos mitades de la molécula, se puede observar que hay una variación en los entornos de los residuos NTY³⁸⁰ cercanos a los bolsillos Da en las dos cadenas γ , y esta

variación no es cuantitativa pues la cantidad de residuos es similar (11 y 13) sino cualitativa, pues algunos de los residuos que interactúan son distintos.

Ahora comparando los entornos entre las dos moléculas, se puede ver que para la TYR/NTY⁴⁵², no hay mayores variaciones, con 19 residuos en total y 18 residuos que se mantienen presentes en todos los entornos. En cuanto a la TYR/NTY⁴⁷⁵, tampoco hay variaciones interesantes, aunque sí hay más variabilidad que para los entornos de la posición 452. En este caso se observan cantidades de 19 y 16, y 17 y 20 residuos en los entornos de las cadenas B y E, para cada TYR/NTY, respectivamente. Se observan 15 residuos que se mantienen presentes en todos los entornos. Aquí también aparecen nuevos residuos en el entorno, cuando hay NTY, que son la GLY⁴⁶⁴ y el TRP⁴⁷⁰. Finalmente, para las TYR/NTY³⁸⁰, comparando entre moléculas, se pueden ver diferencias, habiendo 18 residuos en los entornos de las TYR, y 11 y 13 residuos en los entornos de las NTY, con 7 residuos que se mantienen presentes en todos los entornos. Lo que se puede observar es una pérdida de residuos en el entorno de 5 Å, cuando hay una NTY³⁸⁰. Esta pérdida es de 10 residuos en la cadena γ C, y 5 en la cadena γ F. Nótese que también ocurre la aparición de nuevos residuos en el entorno de NTY³⁸⁰ de γ C, que no están en ningún otro entorno (VAL³⁷³, TYR³⁷⁴ y ALA³⁸³).

De este estudio se puede resumir que hay una afectación del entorno de la posición 380 de la cadena γ, cuando se sustituye TYR por NTY, disminuyendo la cantidad de residuos presentes en ese entorno.

La TYR³⁸⁰ contiene en su entorno 18 aminoácidos, de los cuales 5 son no polares y el resto son polares con (4) o sin carga (9). Es decir que el entorno de la TYR tiende a ser polar, lo cual es coherente con sus características fisicoquímicas de aminoácido moderadamente polar, capaz de formar enlaces de hidrógeno a través del grupo hidroxilo de su anillo aromático.

La NTY³⁸⁰, en la cadena γ C tiene en su entorno 11 residuos de los cuales 3 son no polares y el resto son polares con (2) o sin carga (6). Se mantiene la tendencia a un entorno polar, al igual que con la TYR, siendo la NTY también polar, e incluso más, debido al grupo nitro que es altamente electronegativo y polar, que hace que pueda participar en interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno, aunque el grupo hidroxilo puede tener menor capacidad donadora debido a la presencia del grupo nitro en el anillo. Comparando este con el entorno de la TYR³⁸⁰, se perdieron cinco aminoácidos polares sin carga (SER, THR, ASN, TYR y SER), dos aminoácidos polares con carga (ASP, ARG), y tres aminoácidos no polares (GLY, ILE, ILE). Por otro lado, se ganan un aminoácido polar sin carga (TYR) y dos aminoácidos no

polares (VAL, ALA). Se puede interpretar que esta NTY se encuentra rodeada de menos residuos polares que la TYR, lo cual puede deberse a una disminución de su capacidad de formar enlaces de hidrógeno.

En la cadena γ F, la NTY³⁸⁰ tiene en su entorno 13 residuos, de los cuales 4 son no polares y el resto son polares con (2) o sin carga (7). Este entorno tiende a ser polar también. Se pierden tres aminoácidos polares sin carga (GLN, SER, THR), uno polar con carga (ARG) y uno no polar (ILE), lo cual hace que el entorno pase a tener menos residuos polares que cuando está la TYR, al igual que el entorno de la NTY³⁸⁰ de la cadena C. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la cadena C, no se gana ningún residuo.

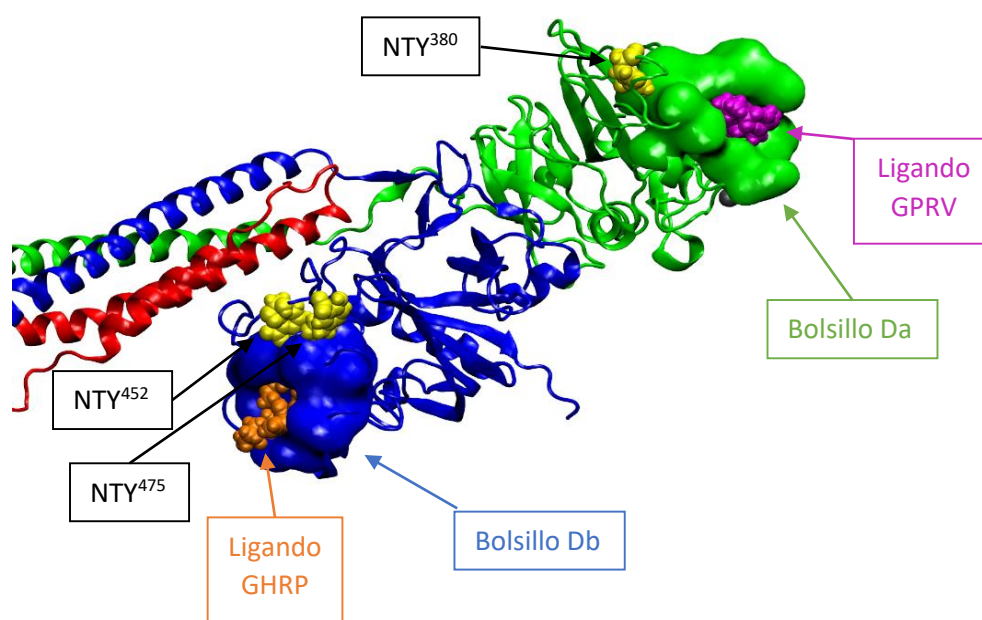


Figura 7.16. Región D del Fibrinógeno humano, conteniendo bolsillos de interacción, ligandos y residuos de tirosina de interés. Se muestra el nódulo- γ de la cadena γ en verde, conteniendo el bolsillo Da. Cercano a este bolsillo se encuentra el residuo NTY³⁸⁰ (amarillo). Dentro del bolsillo se encuentra el ligando de 4 aminoácidos con el cual se realizó la simulación, que representa al botón E_A (rosa). Se muestra el nódulo- β de la cadena β en azul, conteniendo el bolsillo Db. Cercano a este bolsillo se encuentran los residuos NTY⁴⁵² y NTY⁴⁷⁵ (amarillos). Dentro del bolsillo se encuentra el ligando de 4 aminoácidos con el cual se realizó la simulación, que representa al botón E_B (naranja).

Tabla 7.2. Entorno de 5 Å de cada residuo de tirosina (TYR) y 3-nitrotirosina (NTY), en las moléculas de Fibrinógeno y Fibrinógeno nitrado, respectivamente. Se muestran los residuos presentes en el entorno de los residuos de TYR⁴⁵² y NTY⁴⁵², presentes en las cadenas β (B y E), en cada molécula de Fg ensayada: Fg sin nitrar (Fibrinógeno_TYR) y Fg nitrado (Fibrinógeno_NTY). La columna INDEX lleva el conteo de la cantidad de residuos presentes.

Fibrinógeno_TYR								Fibrinógeno_NTY							
TYR ⁴⁵² (en cadena β B)				TYR ⁴⁵² (en cadena β E)				NTY ⁴⁵² (en cadena β B)				NTY ⁴⁵² (en cadena β E)			
INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID
1	VAL	A	152	1	VAL	D	152	1	VAL	A	152	1	VAL	D	152
2	TYR	B	447	2	TYR	E	447	2	TYR	B	447	2	TYR	E	447
-	-	-	-	3	TRP	E	418	-	-	-	-	-	-	-	-
3	GLY	B	450	4	GLY	E	450	3	GLY	B	450	3	GLY	E	450
4	GLN	B	451	5	GLN	E	451	4	GLN	B	451	4	GLN	E	451
5	THR	B	453	6	THR	E	453	5	THR	B	453	5	THR	E	453
6	TRP	B	454	7	TRP	E	454	6	TRP	B	454	6	TRP	E	454
7	MET	B	456	8	MET	E	456	7	MET	B	456	7	MET	E	456
8	ALA	B	457	9	ALA	E	457	8	ALA	B	457	8	ALA	E	457
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	HSE	E	459
-	-	-	-	-	-	-	-	9	GLY	B	460	10	GLY	E	460
9	THR	B	461	10	THR	E	461	10	THR	B	461	11	THR	E	461
10	ASP	B	462	11	ASP	E	462	11	ASP	B	462	12	ASP	E	462
11	ASP	B	463	12	ASP	E	463	12	ASP	B	463	13	ASP	E	463
12	GLY	B	464	13	GLY	E	464	13	GLY	B	464	14	GLY	E	464
-	-	-	-	14	VAL	E	465	14	VAL	B	465	-	-	-	-
13	VAL	B	466	15	VAL	E	466	15	VAL	B	466	15	VAL	E	466
14	SER	B	473	16	SER	E	473	16	SER	B	473	16	SER	E	473
15	TRP	B	474	17	TRP	E	474	17	TRP	B	474	17	TRP	E	474
16	TYR	B	475	18	TYR	E	475	18	NTY	B	475	18	NTY	E	475
17	SER	B	476	19	SER	E	476	19	SER	B	476	19	SER	E	476

Tabla 7.2. Continuación. Entorno de 5 Å de cada residuo de tirosina (TYR) y 3-nitrotirosina (NTY), en las moléculas de Fibrinógeno y Fibrinógeno nitrado, respectivamente. Se muestran los residuos presentes en el entorno de los residuos de TYR⁴⁷⁵ y NTY⁴⁷⁵, presentes en las cadenas β (B y E), en cada molécula de Fg ensayada: Fg sin nitrar (Fibrinógeno_TYR) y Fg nitrado (Fibrinógeno_NTY). La columna INDEX lleva el conteo de la cantidad de residuos presentes.

Fibrinógeno_TYR								Fibrinógeno_NTY							
TYR ⁴⁷⁵ (en cadena β B)				TYR ⁴⁷⁵ (en cadena β E)				NTY ⁴⁷⁵ (en cadena β B)				NTY ⁴⁷⁵ (en cadena β E)			
INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID
1	GLU	B	345	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	ASP	B	346	1	ASP	E	346	1	ASP	B	346	1	ASP	E	346
3	TRP	B	347	2	TRP	E	347	2	TRP	B	347	2	TRP	E	347
4	LYS	B	348	3	LYS	E	348	3	LYS	B	348	3	LYS	E	348
-	-	-	-	4	GLY	E	349	-	-	-	-	-	-	-	-
5	TYR	B	447	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	GLY	B	449	5	GLY	E	449	4	GLY	B	449	4	GLY	E	449
7	GLY	B	450	6	GLY	E	450	5	GLY	B	450	5	GLY	E	450
8	GLN	B	451	7	GLN	E	451	6	GLN	B	451	6	GLN	E	451
9	TYR	B	452	8	TYR	E	452	7	NTY	B	452	7	NTY	E	452
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	ASP	E	463
-	-	-	-	-	-	-	-	8	GLY	B	464	9	GLY	E	464
10	VAL	B	465	9	VAL	E	465	9	VAL	B	465	10	VAL	E	465
11	VAL	B	466	10	VAL	E	466	10	VAL	B	466	11	VAL	E	466
12	TRP	B	467	-	-	-	-	-	-	-	-	12	TRP	E	467
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	TRP	E	470
13	LYS	B	471	11	LYS	E	471	11	LYS	B	471	14	LYS	E	471
14	GLY	B	472	12	GLY	E	472	12	GLY	B	472	15	GLY	E	472
15	SER	B	473	13	SER	E	473	13	SER	B	473	16	SER	E	473
16	TRP	B	474	14	TRP	E	474	14	TRP	B	474	17	TRP	E	474
17	SER	B	476	15	SER	E	476	15	SER	B	476	18	SER	E	476
18	MET	B	477	16	MET	E	477	16	MET	B	477	19	MET	E	477
19	ARG	B	478	17	ARG	E	478	-	-	-	-	20	ARG	E	478

Tabla 7.2. Continuación. Entorno de 5 Å de cada residuo de tirosina (TYR) y 3-nitrotirosina (NTY), en las moléculas de Fibrinógeno y Fibrinógeno nitrado, respectivamente. Se muestran los residuos presentes en el entorno de los residuos de TYR³⁸⁰ y NTY³⁸⁰, presentes en las cadenas γ (C y F), en cada molécula de Fg ensayada: Fg sin nitrar (Fibrinógeno_TYR) y Fg nitrado (Fibrinógeno_NTY). La columna INDEX lleva el conteo de la cantidad de residuos presentes.

Fibrinógeno_TYR								Fibrinógeno_NTY							
TYR ³⁸⁰ (en cadena γ C)				TYR ³⁸⁰ (en cadena γ F)				NTY ³⁸⁰ (en cadena γ C)				NTY ³⁸⁰ (en cadena γ F)			
INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID
-	-	-	-	-	-	-	-	1	VAL	C	373	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	2	TYR	C	374	-	-	-	-
1	TYR	C	375	1	TYR	F	375	3	TYR	C	375	1	TYR	F	375
2	GLN	C	376	2	GLN	F	376	4	GLN	C	376	-	-	-	-
3	GLY	C	378	3	GLY	F	378	5	GLY	C	378	2	GLY	F	378
4	THR	C	379	4	THR	F	379	6	THR	C	379	3	THR	F	379
5	SER	C	381	5	SER	F	381	7	SER	C	381	4	SER	F	381
6	LYS	C	382	6	LYS	F	382	8	LYS	C	382	5	LYS	F	382
-	-	-	-	-	-	-	-	9	ALA	C	383	-	-	-	-
7	SER	C	384	7	SER	F	384	-	-	-	-	-	-	-	-
8	THR	C	385	8	THR	F	385	-	-	-	-	-	-	-	-
9	TYR	C	389	9	TYR	F	389	10	TYR	C	389	6	TYR	F	389
10	ASP	C	390	10	ASP	F	390	-	-	-	-	7	ASP	F	390
11	ASN	C	391	11	ASN	F	391	-	-	-	-	8	ASN	F	391
12	GLY	C	392	12	GLY	F	392	-	-	-	-	9	GLY	F	392
13	ILE	C	393	13	ILE	F	393	-	-	-	-	-	-	-	-
14	ILE	C	394	14	ILE	F	394	-	-	-	-	10	ILE	F	394
15	ARG	C	401	15	ARG	F	401	-	-	-	-	-	-	-	-
16	TRP	C	402	16	TRP	F	402	11	TRP	C	402	11	TRP	F	402
17	TYR	C	403	17	TYR	F	403	-	-	-	-	12	TYR	F	403
18	SER	C	408	18	SER	F	408	-	-	-	-	13	SER	F	408

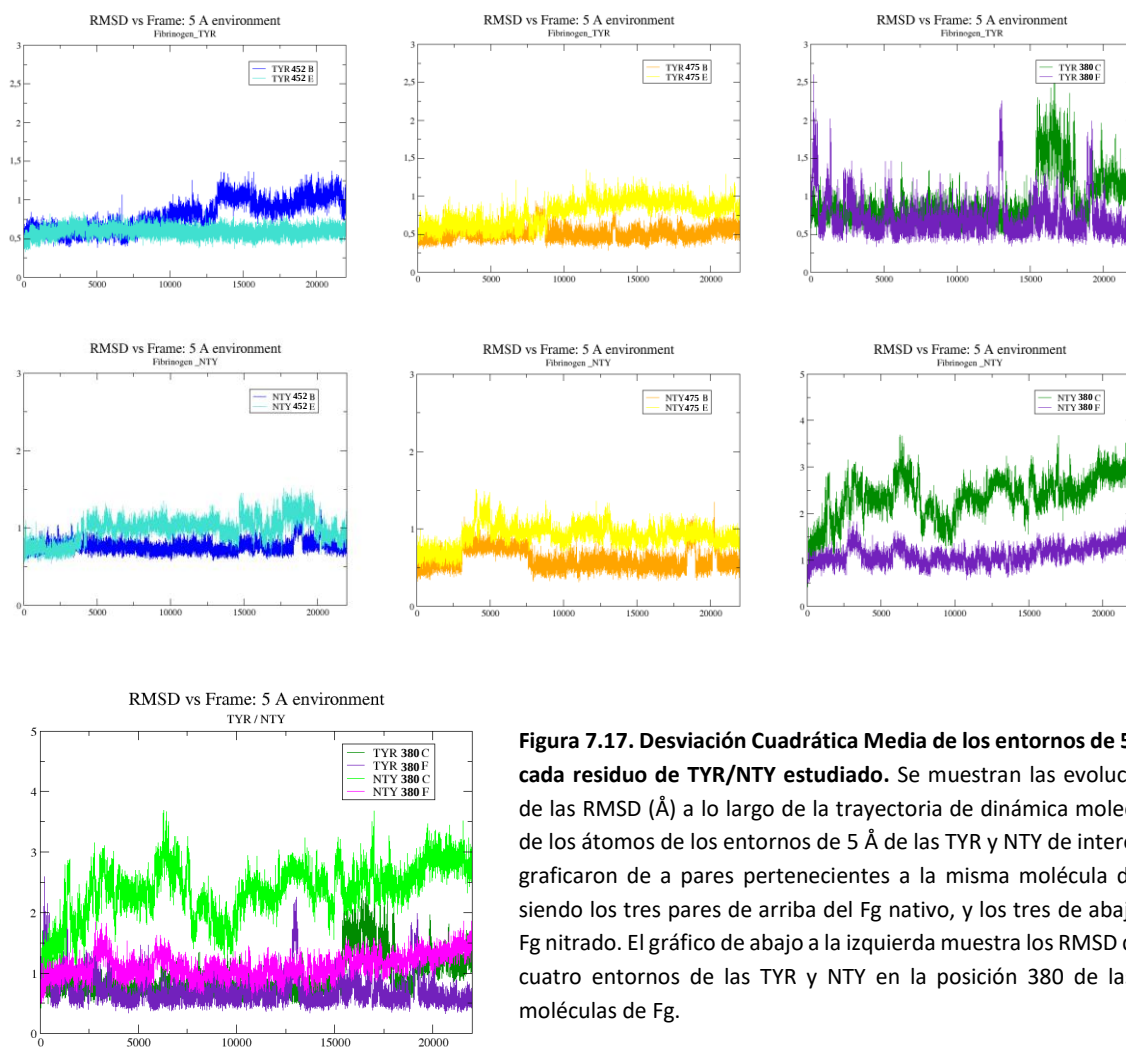


Figura 7.17. Desviación Cuadrática Media de los entornos de 5 Å de cada residuo de TYR/NTY estudiado. Se muestran las evoluciones de las RMSD (Å) a lo largo de la trayectoria de dinámica molecular, de los átomos de los entornos de 5 Å de las TYR y NTY de interés. Se graficaron de a pares pertenecientes a la misma molécula de Fg, siendo los tres pares de arriba del Fg nativo, y los tres de abajo del Fg nitrado. El gráfico de abajo a la izquierda muestra los RMSD de los cuatro entornos de las TYR y NTY en la posición 380 de las dos moléculas de Fg.

2.2.2.2.RMSD

Observando los gráficos de RMSD de los entornos de cada TYR en la molécula de Fg no nitrado, y comenzando con las de la posición 452 de las cadenas β B y E, destaca que el entorno de la de la cadena B presenta una desviación mayor a la de la cadena E durante la segunda mitad de la trayectoria, siendo los átomos del entorno de esta cadena E muy estables. En cuanto a los entornos de las TYR⁴⁷⁵, ocurre algo similar, aunque en este caso es el de la cadena B muy estable, mientras que el de la cadena E presenta un leve aumento de desviación en la segunda mitad de la trayectoria. En los entornos de las TYR³⁸⁰ se observa un comportamiento similar entre cadenas γ C y F, que se separa hacia el final de la simulación, cuando aumenta la desviación del entorno de la cadena C. Comparando con los entornos de las cadenas β B y E se puede observar que en este caso los valores de RMSD son mayores, y no presentan la

estabilidad observada anteriormente. Podría decirse que el entorno de las TYR³⁸⁰ tiende a ser más móvil que el de las otras TYR de interés.

En cuanto a los gráficos de RMSD de los entornos de las NTY en el Fg nitrado, para los de las NTY⁴⁵² se observa un comportamiento estable y similar entre los dos, y también similar al observado en la molécula no nitrada, con valores de desviación del mismo orden. Lo mismo ocurre en los entornos de NTY⁴⁷⁵, donde el comportamiento es estable y similar al de los entornos de las TYR⁴⁷⁵, tanto en forma como en magnitud. Finalmente, en el caso de los entornos de NTY³⁸⁰, se observa un comportamiento diferencial entre el de la cadena γ C y la F, con valores de desviación mayores y más variables en los átomos de la cadena C, comparando con los de la cadena F, que presentan valores aprox. 1.5 Å menores, y que se mantienen estables durante la simulación, aunque al final presentan una tendencia al aumento. Si se observan los gráficos de los entornos de las TYR³⁸⁰ de la molécula no nitrada, las diferencias son notorias, comenzando con el hecho de que los valores de desviación son mayores cuando está la NTY, y puntualmente en la cadena C, que es donde es más marcada la alteración, con una diferencia de 2 Å. Así, se puede ver que el entorno de la NTY³⁸⁰ de la cadena C es más variable que el entorno de la NTY³⁸⁰ de la cadena F. A su vez, ambos entornos de las NTY³⁸⁰ son más variables que los de las TYR³⁸⁰.

2.2.3. *Análisis de Ligandos*

2.2.3.1. Entorno

En cuanto a la observación de los ligandos, se extrajo una lista de residuos presentes en un entorno de 5 Å, al final de la simulación, para cada uno, que se muestran en la Tabla 7.3.

Comenzando con el análisis de esta Tabla, y con la molécula de Fg no nitrado, podemos ver que los ligandos G y H (GPRV) presentes en las cadenas γ C y F, respectivamente, presentan una cantidad de residuos similar en su entorno (18 y 20), habiendo dos que están en C y no en F (GLY³²² y GLU³⁴⁹), y 4 que están en F y no en C (ALA³⁵³, ASP³⁵⁶, MET³⁶² y ASN³⁹¹). Al observar los entornos de los ligandos I y J (GHRP) en las cadenas β B y E, observamos 20 y 21 residuos, con 2 que están en B y no en E (ALA³⁸⁷ y GLN⁴²³), y 3 que están en E y no en B (ARG⁴²¹, ASP⁴⁶³ y GLY⁴⁶⁴). No parece haber mayores variaciones en el entorno de los ligandos del Fg nativo, al comparar las dos mitades de la molécula.

Tabla 7.3 Entorno de 5 Å de cada ligando en las moléculas de Fibrinógeno y Fibrinógeno nitrado. Residuos presentes en el entorno de los ligandos que representan a los botones E_A (G y H), presentes en los bolsillos Da de las cadenas γ (C y F), en cada molécula de Fg ensayada: Fg sin nitrar (Fibrinógeno_TYR) y Fg nitrado (Fibrinógeno_NTY). La columna INDEX lleva el conteo de la cantidad de residuos presentes.

Fibrinógeno_TYR								Fibrinógeno_NTY							
Lig G (en bolsillo Da de cadena γ C)				Lig H (en bolsillo Da de cadena γ F)				Lig G (en bolsillo Da de cadena γ C)				Lig H (en bolsillo Da de cadena γ F)			
INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	PHE	F	319
1	PHE	C	321	1	PHE	F	321	1	PHE	C	321	2	PHE	F	321
2	GLY	C	322	-	-	-	-	2	GLY	C	322	3	GLY	F	322
-	-	-	-	-	-	-	-	3	ASP	C	324	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	4	SER	C	326	-	-	-	-
3	ASP	C	327	2	ASP	F	327	5	ASP	C	327	4	ASP	F	327
4	PHE	C	330	3	PHE	F	330	-	-	-	-	5	PHE	F	330
5	THR	C	331	4	THR	F	331	-	-	-	-	6	THR	F	331
6	PHE	C	348	5	PHE	F	348	-	-	-	-	7	PHE	F	348
7	GLU	C	349	-	-	-	-	-	-	-	-	8	GLU	F	349
8	CYS	C	352	6	CYS	F	352	-	-	-	-	9	CYS	F	352
-	-	-	-	7	ALA	F	353	-	-	-	-	-	-	-	-
9	GLN	C	355	8	GLN	F	355	6	GLN	C	355	10	GLN	F	355
-	-	-	-	9	ASP	F	356	-	-	-	-	11	ASP	F	356
-	-	-	-	10	MET	F	362	-	-	-	-	-	-	-	-
10	LYS	C	364	11	LYS	F	364	-	-	-	-	12	LYS	F	364
11	CYS	C	365	12	CYS	F	365	-	-	-	-	13	CYS	F	365
12	HSD	C	366	13	HSD	F	366	-	-	-	-	14	HSD	F	366
13	ALA	C	367	14	ALA	F	367	-	-	-	-	15	ALA	F	367
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	GLY	F	368
14	HSD	C	369	15	HSD	F	369	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	7	PRO	C	386	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	8	ASN	C	387	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	9	GLY	C	388	-	-	-	-
15	TYR	C	389	16	TYR	F	389	-	-	-	-	17	TYR	F	389
16	ASP	C	390	17	ASP	F	390	10	ASP	C	390	18	ASP	F	390
-	-	-	-	18	ASN	F	391	11	ASN	C	391	19	ASN	F	391
17	ILE	C	394	19	ILE	F	394	-	-	-	-	20	ILE	F	394
18	ARG	C	401	20	ARG	F	401	12	ARG	C	401	-	-	-	-

Tabla 7.3. Continuación. Entorno de 5 Å de cada ligando en las moléculas de Fibrinógeno y Fibrinógeno nitrado. Se muestran los residuos presentes en el entorno de los ligandos que representan a los botones E_B (I y J), presentes en los bolsillos Db de las cadenas β (B y E), en cada molécula de Fg ensayada: Fg sin nitrar (Fibrinógeno_TYR) y Fg nitrado (Fibrinógeno_NTY). La columna INDEX lleva el conteo de la cantidad de residuos presentes.

Fibrinógeno_TYR								Fibrinógeno_NTY							
Lig I (en bolsillo Db de cadena β B)				Lig J (en bolsillo Db de cadena β E)				Lig I (en bolsillo Db de cadena β B)				Lig J (en bolsillo Db de cadena β E)			
INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID	INDEX	RESNAME	CHAIN	RESID
1	ALA	B	387	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	LEU	B	390	1	LEU	E	390	1	LEU	B	390	1	LEU	E	390
3	ASN	B	394	2	ASN	E	394	2	ASN	B	394	2	ASN	E	394
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	ARG	E	395
4	MET	B	397	3	MET	E	397	3	MET	B	397	4	MET	E	397
5	THR	B	398	4	THR	E	398	4	THR	B	398	5	THR	E	398
6	TRP	B	415	5	TRP	E	415	5	TRP	B	415	-	-	-	-
-	-	-	-	6	ARG	E	421	-	-	-	-	-	-	-	-
7	LYS	B	422	7	LYS	E	422	6	LYS	B	422	6	LYS	E	422
8	GLN	B	423	-	-	-	-	7	GLN	B	423	7	GLN	E	423
9	CYS	B	424	8	CYS	E	424	8	CYS	B	424	8	CYS	E	424
10	GLU	B	427	9	GLU	E	427	9	GLU	B	427	9	GLU	E	427
11	ASP	B	428	10	ASP	E	428	10	ASP	B	428	10	ASP	E	428
12	ARG	B	436	11	ARG	E	436	11	ARG	B	436	11	ARG	E	436
13	CYS	B	437	12	CYS	E	437	12	CYS	B	437	12	CYS	E	437
14	HSD	B	438	13	HSD	E	438	13	HSD	B	438	13	HSD	E	438
15	ALA	B	439	14	ALA	E	439	14	ALA	B	439	14	ALA	E	439
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	ALA	E	440
16	THR	B	461	15	THR	E	461	15	THR	B	461	16	THR	E	461
17	ASP	B	462	16	ASP	E	462	16	ASP	B	462	17	ASP	E	462
-	-	-	-	17	ASP	E	463	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	18	GLY	E	464	-	-	-	-	-	-	-	-
18	VAL	B	466	19	VAL	E	466	17	VAL	B	466	18	VAL	E	466
19	MET	B	468	20	MET	E	468	18	MET	B	468	19	MET	E	468
20	SER	B	473	21	SER	E	473	19	SER	B	473	20	SER	E	473

Yendo a la molécula de Fg nitrado, los ligandos G y H (GPRV) presentes en las cadenas γ C y F, respectivamente, presentan una cantidad de residuos muy distinta en su entorno (12 y 20, respectivamente), habiendo 6 que están en C y no en F, y 14 que están en F y o en C. Al observar los entornos de los ligandos I y J (GHRP) en las cadenas β B y E, se presentan 19 y 20 residuos, con 1 que está en B y no en E (TRP⁴¹⁵), y 2 que están en E y no en B (ARG³⁹⁵ y ALA⁴⁴⁰). En este caso del Fg nitrado, se observa que los ligandos I y J tienen un entorno similar en las dos mitades de la molécula, mientras que esto no ocurre para los ligando G y H presentes en las cadenas γ , donde del lado de la cadena C hay una mucho menor cantidad de residuos en el entorno. En suma, para el caso de los ligandos G y H, la molécula de Fg nitrado no se comporta de forma simétrica, habiendo una alteración del bolsillo Da, de un solo lado de esta (cadena C).

Ahora comparando las dos moléculas ensayadas, puede observarse que la cantidad de residuos de los entornos de los ligandos I y J, presentes en los bolsillos Db de las cadenas β , presentan entre 19 y 21 residuos, con 16 residuos en común a todos los entornos. En cuanto a los ligandos G y H de los bolsillos Da de las cadenas γ , resalta uno de los entornos, dentro de la molécula nitrada, que presenta una cantidad de residuos disminuida: 12 residuos en comparación con su contraparte dentro de la misma molécula con 20, y con los entornos de la molécula no nitrada con 18 y 20. De esos 12 residuos, 5 son en común con los otros tres entornos estudiados.

2.2.3.2. Interacción

Además, se calcularon las energías de interacción no enlazante (VdW y electrostáticas) entre los ligandos G e I, y los bolsillos donde están contenidos, a lo largo de la trayectoria de la simulación, para cada molécula de Fg. Graficando la evolución de estas energías se seleccionó la sección en la cual esta energía de interacción se estabilizó y se extrajo un promedio. La Tabla 7.4 muestra las energías de interacción entre los ligandos G (que representa E_A) e I (que representa E_B) y sus respectivos bolsillos Da y Db, en el Fg nativo y nitrado. Se realizó el cálculo de delta energía (ΔE), como la energía de interacción con el ligando en el estado final (cuando hay NTY) menos la energía de interacción con el ligando en el estado inicial (cuando hay TYR), para obtener un valor del efecto de nitrar en la interacción del bolsillo con el ligando.

Observando las energías de interacción, para el caso del ligando I, que representa E_B , contenido en el bolsillo Db, no destacan diferencias al comparar la interacción cuando están presentes las NTY y cuando no. Antes, cabe comentar las características del ligando I, compuesto por GHRP, dos aminoácidos polares cargados positivamente y dos apolares. En el caso de que

están las NTY⁴⁵² y NTY⁴⁷⁵ cercanas al bolsillo Db, que a su vez contiene al ligando I, la interacción entre estos dos últimos presenta un valor de -396 Kcal/mol, con una desviación estándar de 34 Kcal/mol. Esa interacción, cuando no hay residuos de NTY alrededor, sino que están las TYR nativas, es también de -396 Kcal/mol, con una desviación estándar de 17 Kcal/mol, lo cual representa un ΔE de 0 Kcal/mol, es decir que la nitración no sería favorable ni desfavorable a la interacción del bolsillo con su ligando. Analizando las componentes electrostáticas y de VdW, tampoco se observan diferencias interesantes. Los cálculos de ΔE para las energías electrostáticas arrojan un valor de -5.9 Kcal/mol, indicando que se favorece la interacción por aparición de interacciones electrostáticas cuando está la NTY; sin embargo, el ΔE para las energías de VdW es de 5.9 Kcal/mol, indicando que se pierden interacciones de VdW. Esto da la idea de que el bolsillo se volvió más hidrofílico. Teniendo en consideración la estructura versátil del ligando, que, si bien interacciona principalmente de forma electrostática, el hecho de que cambien las características del bolsillo, volviéndose más hidrofóbico o hidrofílico, no afectaría tanto la interacción ya que este ligando sería capaz de interactuar de todas formas, pues tiene dos residuos polares y dos apolares. De hecho, se observa que lo que pierde en interacciones electrostáticas las gana en interacciones de VdW que pueden ser apolares.

En cuanto a las energías de interacción para el caso del ligando G, que representa E_A, contenido en el bolsillo Da de la cadena C, se presenta una diferencia interesante al comparar la interacción cuando está presente la NTY y cuando no. Primero aclaremos que el ligando G, compuesto por GPRV, son tres residuos no polares y uno polar cargado positivamente. En el caso de que está la NTY³⁸⁰ cercana al bolsillo Da, que contiene al ligando G, la interacción entre estos dos últimos presenta un valor de -139 Kcal/mol, con una desviación estándar de 24 Kcal/mol. Esa interacción, cuando no está el residuo de NTY alrededor, sino que está la TYR nativa, es de -187 Kcal/mol, con una desviación estándar de 18 Kcal/mol. Esto representa un ΔE de 48 Kcal/mol, indicando que la presencia de NTY hace que sea menos favorable la interacción. Analizando las componentes electrostáticas y de VdW, también se presentan esas diferencias en el ΔE , siendo de 28 Kcal/mol en la interacción electrostática, y de 20 Kcal/mol en la interacción de VdW. Se observa una pérdida de interacción de ambos tipos cuando está presente la NTY, siendo muy marcada la de VdW. Esto da indicio de que el bolsillo se volvió menos hidrofóbico, lo que podría estar causando el alejamiento del ligando, que tiene tres aminoácidos apolares.

Tabla 7.4. Energías de interacción entre los ligandos G e I y los bolsillos Da y Db, respectivamente, en presencia de TYR y NTY. Se presenta la energía de interacción entre el ligando G y el bolsillo Da de la cadena γ C, en presencia de TYR (Da_TYR) y de NTY (Da_NTY); y la energía de interacción entre el ligando I y el bolsillo Db de la cadena β B, en presencia de las TYR (Db_TYR) y de las NTY (Db_NTY). Se muestran los promedios $\pm$ desviación estándar (SD) de la energía total y de las componentes electrostática y de van der Waals (VdW). Además, se muestra el cálculo de delta energía (ΔE), como la energía de interacción con el ligando en el estado final (cuando hay NTY) menos la energía de interacción con el ligando en el estado inicial (cuando hay TYR).

Cadena	Interacción	Energía Total media (Kcal/mol) $\pm$ SD	Energía Electrostática media (Kcal/mol) $\pm$ SD	Energía de VdW media (Kcal/mol) $\pm$ SD
γ C	Da_TYR : LIG G	-187.4 $\pm$ 18.5	-160.4 $\pm$ 19.4	-27.0 $\pm$ 3.6
	Da_NTY : LIG G	-139.4 $\pm$ 24.0	-132.4 $\pm$ 25.4	-7.0 $\pm$ 3.4
	ΔE (NTY-TYR)	48	28	20
β B	Db_TYR : LIG I	-396.1 $\pm$ 17.1	-371.0 $\pm$ 18.2	-25.1 $\pm$ 4.1
	Db_NTY : LIG I	-396.1 $\pm$ 34.5	-376.9 $\pm$ 35.9	-19.2 $\pm$ 4.4
	ΔE (NTY-TYR)	0	-5.9	5.9

2.2.3.3. Estructuras iniciales y finales

Para complementar este estudio, la Figura 7.18 muestra la estructura inicial y final de los bolsillos Da (cadena γ C) y Db (cadena β B), en ausencia y presencia de NO₂Tyr.

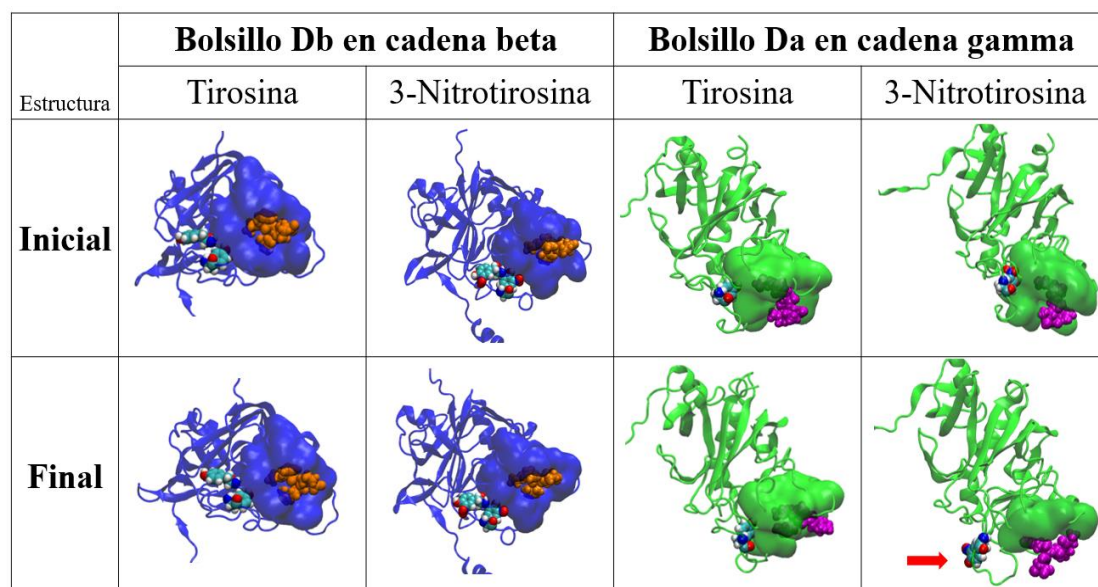


Figura 7.18. Estado estructural inicial y final de los bolsillos Da y Db conteniendo los ligandos G e I, y residuos de TYR y NTY en el entorno. Se observan cambios estructurales en el bolsillo Da cuando 3-nitrotirosina (NTY) está presente. El residuo de NTY³⁸⁰ se aleja del bolsillo Da y éste cambia su estructura de modo que el ligando deja de estar contenido dentro (flecha roja).

Para poder visualizar los resultados presentados hasta este punto, la Figura 7.18 permite observar como en el bolsillo Db conteniendo a su ligando no hay cambios estructurales significativos durante la trayectoria de simulación de MD, en ambos casos de que estén los residuos de NTY⁴⁵² y NTY⁴⁷⁵, y los residuos de TYR⁴⁵² y TYR⁴⁷⁵. Esto no ocurre para el caso del bolsillo Da, donde se ve que cuando hay un residuo de TYR³⁸⁰ las estructuras inicial y final no varían, mientras que cuando hay una NTY³⁸⁰, la estructura final se ve alterada. En este punto lo que se observa es una rotación del residuo de NTY hacia el agua, alejando el grupo nitro que inicialmente estaba dirigido hacia el bolsillo. Esto genera un cambio en la estructura del bolsillo, que parece “abrirse”, mientras que el ligando tiende a salirse, observándose un ligando que inicialmente estaba bien contenido dentro del bolsillo, y que ahora presenta un menor contacto.

En suma, se halló como resultado que la presencia de NTY³⁸⁰ dentro del bolsillo Da de la cadena γ C, afecta la energía de interacción entre el ligando G (que representa el botón E_A) y su entorno (bolsillo Da en la cadena γ C). Al parecer, existe una propagación de perturbaciones estructurales desde el residuo NTY³⁸⁰ hasta el bolsillo de interacción.

Si se ponen sobre la mesa los resultados de la observación de los residuos de los entornos, tanto de los ligandos como de las TYR/NTY, los cálculos de energías de interacción, y la observación de las estructuras iniciales y finales presentados, se podría interpretar que la presencia de NTY cercanas a los bolsillos Db no estarían alterando la estructura de este, ni su interacción con el ligando, en una medida visible en el tiempo de simulación ensayado. Sin embargo, para la interacción que ocurre en el bolsillo Da, sí se observa lo que podría ser una influencia de la presencia de NTY cercana a esa zona. En este punto cabe aclarar que la alteración en energía de interacción y estructural se observó en el bolsillo Da de la cadena γ C del Fg nitrado, con el ligando G, no así en su contraparte de la cadena γ F de la misma molécula, con el ligando H.

3. Discusión

En este Capítulo se presenta un modelo de la molécula de Fg humano, que incluye partes no resueltas en la estructura cristalográfica y que fueron modeladas de nuevo en este trabajo. Este es uno de los primeros estudios de modelado *in silico* en obtener una estructura 3D completa del Fg humano, incluyendo los motivos no resueltos por experimentos cristalográficos. La mayoría de los estudios moleculares publicados en los últimos años se refieren a las estructuras ya conocidas depositadas en el PDB. Nuestra contribución es proporcionar una estructura completa con la que trabajar.

En cuanto al enfoque de modelado, se utilizaron modelado por homología con Phyre2 y simulación de MD a nivel de CG, seguidas de simulación de MD a nivel atómico, para generar una estructura teórica en 3D de la molécula de Fg. El modelo final incluye cada cadena completa: 625 residuos en las cadenas A α , 461 en las cadenas B β y 411 en las cadenas γ .

El análisis estructural reveló la organización única de las porciones C-terminales de las cadenas A α , las regiones α C, divididas en un conector- α C y un dominio- α C, consistente con la literatura preexistente y los hallazgos experimentales. Es particularmente interesante por su tamaño y función, y el hecho de que no se había reportado previamente. Se observó que el conector- α C contenía estructuras extendidas y semicompactas con bucles y conformaciones PPII, mientras que el dominio- α C exhibió estructuras globulares compactas y láminas- β . La estructura también confirmó las hélices triples de la región de coiled coil y secciones específicas de α -hélices en las regiones D, así como la presencia de giros y bucles en otras regiones. El análisis realizado en la trayectoria de MD incluye análisis de RMSD, RG, SASA, RMSF y enlaces de hidrógeno. El RMSD se estabilizó para la mayoría de las cadenas, excepto para la cadena D, que exhibió una curvatura al final de la simulación, lo que causó un aumento en los valores de RMSD. Las cadenas A α mostraron valores de RMSD más altos, especialmente en las regiones modeladas recientemente, como se esperaba. El RG se mantuvo en general estable, indicando una dimensión proteica ligeramente variable relacionada con la naturaleza móvil y flexible de la molécula, influenciada por la curvatura de las regiones de coiled coil y el plegamiento de las regiones α C. El SASA disminuyó durante la simulación, indicando la estabilización del sistema. Los gráficos de RMSF para las cadenas de Fg mostraron formas en sierra típicas de α -hélices en las regiones de triple hélice y mayores RMSF en los extremos de las cadenas que representan los terminales desplegados. Las cadenas A α mostraron mayor movilidad, especialmente en las regiones α C, mientras que las cadenas B β y γ exhibieron estructuras más estables. El análisis de enlaces de hidrógeno mostró que el número total de enlaces de hidrógeno aumentó durante el tiempo de simulación, principalmente dentro de las cadenas A α , indicando nuevas interacciones posiblemente debidas al plegamiento de las regiones α C.

La evolución de los modelos de energía en la simulación de MD de la molécula de Fg mostró una estabilidad global durante la minimización de energía, annealing molecular, equilibración y producción. Las energías de interacción con el solvente disminuyeron inicialmente y luego se estabilizaron, reflejando el equilibrio del sistema.

En cuanto a las energías de interacción entre las diferentes cadenas, la interacción entre las cadenas $A\alpha$ mostró una disminución, especialmente en las regiones del conector- αC . Las energías de interacción entre las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$ también mostraron una disminución, correlacionándose con cambios estructurales como el acercamiento de las regiones αC a la región de triple hélice. Las contrapartes simétricas de las cadenas (por ejemplo, cadenas A y E, D y B) mostraron cambios en las energías de interacción debido a ajustes estructurales durante la simulación.

En general, la simulación de MD demostró una estabilización estructural durante el tiempo de producción de 30 ns, pero también destacó la flexibilidad y movilidad de regiones específicas dentro de la molécula de Fg, como las regiones αC . Se observaron cambios estructurales, enfatizando la naturaleza dinámica de la molécula, particularmente en las regiones αC , que experimentaron movimientos notables durante la simulación.

La segunda parte del presente Capítulo se enfocó en el estudio de los sitios de nitración mediante la comparación entre el comportamiento en una simulación de MD del Fg nativo y el del Fg nitrado, y aquí se realizó una observación interesante. Hay cambios estructurales y energéticos en el bolsillo Da cuando NTY está presente. El residuo NTY³⁸⁰ de la cadena γ que se encuentra en el entorno del bolsillo Da se aleja de dicho bolsillo y esto cambia su estructura de tal manera que el ligando ya no está contenido dentro de él. Al observar el entorno de la NTY³⁸⁰ al final de la simulación, la cantidad de residuos circundantes es menor que para la TYR³⁸⁰. En cuanto a la interacción del ligando, hay cambios en el que representa E_A , teniendo su entorno menos cantidad de residuos que cuando no hay NTY. Las energías de interacción entre los ligandos G e I y sus bolsillos Da y Db, respectivamente, aumenta en el caso de Da y permanece sin cambios en el caso de Db. Estos resultados se pueden interpretar de la siguiente manera: por un lado, la nitración del entorno del bolsillo que se encuentra en el dominio globular de la cadena γ tiene una repercusión mayor en la estructura de dicho bolsillo, comparando con la nitración en la cadena β . En cuanto a las magnitudes y componentes de la energía de interacción, se vió que estas son más fuertes en el caso de Db con su ligando, y tal vez por esto es que una alteración en residuos del entorno no la afectaron, mientras en el caso de Da con su ligando estas son menos fuertes y tal vez por esto se vieron alteradas en el transcurso de la simulación, para uno de los bolsillos Da. En cuanto a las componentes, se vió que la pérdida de interacción fue a expensas de ambas interacciones electrostáticas y de VdW, habiendo quedado muy disminuídas las segundas.

No puede dejarse sin comentar el hecho de que la alteración estructural ocurrió solo en uno de los bolsillos Da del Fg nitrado. En este punto se pueden hacer solo especulaciones de posibles causas de esta observación. Una de ellas es que el espacio conformacional fue muestreado de manera diferente en las dos mitades del Fg, tal como lo indicaron los gráficos de RMSD y RMSF al revelar el comportamiento diferencial de las dos mitades de las moléculas. Siguiendo esta idea del espacio conformacional, es posible que para la cadena γ C se haya alcanzado un estado en el cual fue favorable el alejamiento del residuo de NTY, cosa que no ocurrió en la cadena γ F, dentro del tiempo de simulación ensayado. Tal vez si se continuara la simulación se podría observar el mismo fenómeno. De hecho, sí se observó que la cantidad de residuos del entorno de la NTY³⁸⁰ de la cadena F del Fg nitrado disminuyó considerablemente comparando con la TYR³⁸⁰ de la cadena F del Fg no nitrado. Es decir que sí hubo una afectación del entorno de NTY en F, sin haber llegado a afectar el bolsillo Da en F.

De los análisis de RMSD de los entornos de las TYR/NTY de interés, pudo extraerse una apreciación interesante, que es los entornos de las TYR³⁸⁰ en el Fg nativo son más móviles y variables que los de las otras TYR estudiadas, y que cuando se sustituye esa TYR por una NTY³⁸⁰ (Fg nitrado) en entorno se vuelve más variable aún, y específicamente para la cadena C. Esto por un lado podría explicar por qué se observó una alteración a nivel del bolsillo Da y no del bolsillo Db, porque el Fg naturalmente, antes de ser modificado, ya tiene más movilidad en ese entorno. Y, por otro lado, la asimetría del Fg de la que se viene hablando, hace que sea más variable de un lado que del otro, cuando se agrega la NTY³⁸⁰.

Por último, y menos alentador, no puede perderse de vista la posibilidad de que el interesante resultado de un cambio de estructura a nivel del bolsillo de interacción, cuando está presente la NTY, haya sido azaroso y no tenga ninguna relación causal con la presencia de esa NTY.

Llevando esto a un plano funcional, es interesante notar que el Da, que es el que se muestra afectado, es el principal componente de la interacción intermolecular que ocurre para comenzar la polimerización, mientras que la interacción Db:E_B se da de forma posterior al inicio. Finalmente, la afectación de la que se habla es una disminución de esa interacción Da:E_A, con lo cual la polimerización podría verse influenciada. Lo que se observa en esta simulación de MD podría afectar la arquitectura de la red de Fb de alguna manera que haga que sea más compleja la lisis posterior, o podría directamente disminuir la interacción intermolecular y así la formación de esa red. Se observó que se va perdiendo energía de interacción lo que puede desencadenar una desestructuración aun mayor a la observada en la simulación de MD (que

pudo no haber sido lo suficientemente larga para observar un cambio completo). Cabe destacar que este último resultado es concordante con lo observado en los estudios de fibrinoformación y fibrinolisis del Capítulo 5, donde se vió que en los pacientes ACVi se ve retrasado el tiempo de formación de coágulo.

Esto refuerza la hipótesis de que la PTM nitroxidativa sobre Tyr puede tener un impacto en la formación de Fb o en el proceso de fibrinolisis. Nuestros hallazgos están en concordancia con los reportes de que se observan alteraciones en la polimerización de la Fb, la fibrinólisis y las interacciones celulares cuando está presente NO₂Tyr.

4. Conclusión

En este Capítulo se presentó un modelo de la molécula de Fg humano que incluye partes no resueltas en la estructura cristalográfica, las cuales fueron modeladas mediante homología con Phyre2 y simulaciones de MD a nivel de CG y atómico. El modelo final abarca cada cadena completa de la molécula, revelando una organización única y previamente no reportada de las porciones C-terminales de las cadenas A α , que incluyen un conector- α C y un dominio- α C.

El análisis estructural mostró que el conector- α C contiene estructuras extendidas y semicompactas, mientras que el dominio- α C exhibe estructuras globulares compactas y láminas- β . Las hélices triples de la región de coiled-coil fueron confirmadas, así como un ligero bending de estas regiones. La simulación de MD demostró estabilidad estructural y reveló la flexibilidad y movilidad de regiones específicas, especialmente en las regiones α C. En conclusión, este estudio proporciona un modelo detallado y realista del Fg humano, confirmando y ampliando los hallazgos experimentales previos. Las investigaciones futuras deberían explorar conformaciones adicionales de la molécula y considerar la influencia de los grupos de carbohidratos móviles en el proceso de ensamblaje de Fb. Este trabajo ofrece una exploración completa de las complejidades estructurales del Fg, integrando el modelado computacional con conocimientos experimentales para mejorar nuestra comprensión de su organización y comportamiento dinámico. La estructura completa del Fg humano resultante proporciona un marco valioso para la construcción de un protofibrilo, con el fin de arrojar luz sobre los mecanismos de polimerización de Fb, donde las regiones α C juegan un papel crítico

El estudio también investigó los sitios de nitración, comparando el comportamiento del Fg nativo con el nitrado. Se observó que la nitración en el residuo NTY³⁸⁰ de la cadena γ causó

cambios estructurales y energéticos en el bolsillo Da, afectando la interacción con el ligando y sugiriendo un impacto potencial en la polimerización y la lisis del Fg.

En conclusión, las simulaciones de MD realizadas son el puntapié inicial que demuestra que es posible abordar sistemas complejos y de grandes dimensiones, incluso cuando se tenga información parcial de la estructura molecular, combinando técnicas estado del arte de la química computacional. Sin embargo, para poder concluir con mayores certezas, es clara la necesidad de correr varias réplicas de cada sistema estudiado en esta Tesis, por tiempos de simulación más largos, que aseguren la convergencia, un desafío en sistemas de este tamaño.

Capítulo 8: Discusión General

En la presente Tesis se realiza un análisis integral del impacto de la nitración en el Fg y su relación con el ACVi.

La nitración de Tyr en proteínas como el Fg ha emergido como un área de interés en la investigación sobre el ACVi. Este conjunto de estudios proporciona una visión amplia de la nitración en el ACVi, abarcando la identificación y cuantificación de residuos nitrados en Fg, el análisis de la fibrinoformación y fibrinólisis, el estudio de trombos y el modelado a nivel molecular del Fg.

Identificación y Cuantificación de 3-Nitrotirosina en Fibrinógeno mediante LC-MS/MS

El primer estudio empleó la LC-MS/MS para identificar y cuantificar residuos de Tyr nitrados en Fg tratado con ONOO^- *in vitro*, así como en muestras clínicas. Este análisis reveló la presencia de veinte residuos de NO_2Tyr , incluyendo siete sitios previamente no reportados. En pacientes con ACVi, se observó un aumento significativo en la nitración de algunos sitios en comparación con controles sanos. Otro hallazgo interesante fue que los resultados *in vivo* diferían de los obtenidos *in vitro*, lo que destaca la complejidad de extrapolar datos de laboratorio a condiciones fisiológicas reales. De este punto se puede comentar que el Fg es una molécula susceptible a nitración, tanto *in vitro* como *in vivo*, y que se la encuentra nitrada en condición de patología cerebral isquémica.

Cuantificación de 3-Nitrotirosina en Plasma mediante ELISA

El segundo estudio se centró en la medición de NO_2Tyr en plasma mediante un ensayo inmunoenzimático. Se encontraron niveles elevados de NO_2Tyr en pacientes con ACVi en comparación con controles sanos, lo que sugiere que la nitración está asociada con esta condición, y confirma los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS. A pesar de que los niveles de NO_2Tyr también estaban presentes en los controles, en menor cantidad, la presencia de FRC como DM, edad avanzada y tabaquismo se correlacionó con niveles más altos de NO_2Tyr en pacientes con ACVi. Sin embargo, dentro del grupo de ACVi, la influencia de los FRC no alteró significativamente los niveles de nitración. La comparación entre subgrupos de edad y niveles normales de Fg mostró que estas diferencias contribuyen a la variabilidad observada entre ACVi y controles. Este estudio sugiere que tanto NO_2Tyr libre como Fg- NO_2Tyr podrían servir como biomarcadores útiles, aunque se requiere una mayor muestra y control de variables para confirmar estos hallazgos.

Fibrinoformación y Fibrinólisis en Plasma de ACVi

El tercer estudio abordó la fibrinoformación y la fibrinólisis en plasma de pacientes con ACVi mediante ensayos de formación y lisis de coágulos. Los resultados indicaron Tc y Tf más largos en comparación con controles, sugiriendo una coagulación más lenta y una disolución del coágulo menos eficiente. Estos hallazgos son consistentes con una capacidad fibrinolítica disminuida en pacientes con ACVi. Además, la altura del pico en las curvas de fibrinoformación, correlacionada con la concentración de Fg, fue mayor en pacientes con ACVi, indicando coágulos más grandes y resistentes a la disolución. La nitración del Fg podría estar relacionada con esta resistencia, ya que estudios previos sugieren que la nitración puede aumentar la rigidez y estabilidad del coágulo, dificultando su degradación. Los resultados también corroboran estudios anteriores que muestran una formación de coágulos más resistentes a la fibrinólisis en condiciones nitroxidantes.

Análisis de 3-Nitrotirosina en Trombos de ACVi

El cuarto estudio se centró en la identificación de nitración en proteínas en trombos de pacientes con ACVi mediante IP. Se encontró que los trombos eran altamente heterogéneos, con áreas ricas en GR y plaquetas que influyen en la estructura y función del coágulo. La nitración de proteínas clave como la MMP-9, actina citoplasmática y proteína S100-A9 en los trombos puede alterar su función, contribuyendo a la patogénesis del ACVi. La presencia de NO₂Tyr en estos trombos y la identificación de proteínas involucradas en coagulación, inflamación y metabolismo cerebral refuerzan la idea de que la nitración juega un papel crucial en la trombosis y en la modificación de la función del coágulo, y es consistente con lo hallado en los Capítulos previos.

Modelado Molecular y Simulaciones de Dinámica Molecular

Finalmente, las simulaciones de MD proporcionaron un modelo detallado del Fg, y revelaron cambios estructurales significativos en la presencia de nitración. Estos resultados destacan la flexibilidad y movilidad de las regiones α C del Fg, que muestran alta variabilidad estructural. Las simulaciones mostraron que la nitración induce alteraciones en el bolsillo Da de la cadena γ del Fg, afectando la interacción con el ligando y potencialmente influyendo en la polimerización de la Fb. La influencia de la nitración en la estructura del Fg podría impactar negativamente la formación de la red de Fb y la posterior fibrinólisis, alineándose con los hallazgos de estudios previos sobre la alteración de la polimerización de la Fb y la fibrinólisis en condiciones nitroxidantes. Esta última parte de la Tesis une los conceptos y resultados

obtenidos en los capítulos anteriores, pues se agregan las NO₂Tyr encontradas en el Fg de pacientes con ACVi en el Capítulo 3, y se observan cambios estructurales que pueden estar causando de forma directa o indirecta las alteraciones funcionales observadas en el Capítulo 5.

En conjunto, estos estudios proporcionan una comprensión integral del impacto de la nitración en el Fg y su asociación con el ACVi. La nitración de Tyr en el Fg no solo está asociada con un mayor riesgo de ACVi, sino que también afecta la estructura y función del coágulo, contribuyendo a alteraciones en la coagulación y fibrinólisis. La integración de métodos analíticos, como LC-MS/MS, ELISA, WB e IP con estudios funcionales de coagulación y simulaciones de MD, ofrece una perspectiva multidimensional e integral sobre cómo el estrés nitrooxidativo y las PTMs influyen en la patogénesis del ACVi. Estos hallazgos subrayan la importancia de la nitración como biomarcador potencial y sugieren nuevas direcciones para el desarrollo de terapias y estrategias diagnósticas en el manejo del ACVi.

Contribuciones

La investigación descrita, que aborda el ACVi desde múltiples perspectivas, contribuye significativamente al campo de la fisiopatología y epidemiología de esta enfermedad. A continuación, se destacan algunas de las contribuciones clave.

Con respecto a la evaluación metodológica avanzada: la introducción de métodos sofisticados como LC-MS/MS y ELISA para evaluar la nitración del Fg en pacientes con ACVi representa una contribución metodológica valiosa. Estas técnicas permiten un análisis detallado de las PTMs en proteínas, ofreciendo una perspectiva más precisa y específica.

En cuanto a la identificación de biomarcadores diagnósticos potenciales: la identificación de niveles significativamente elevados de nitración en residuos específicos de Tyr, y su fuerte asociación con ACVi, destaca el potencial de estos marcadores como herramientas diagnósticas. Estos hallazgos ofrecen una contribución valiosa al desarrollo de biomarcadores específicos y precisos para la detección temprana y el monitoreo de la enfermedad.

Relevancia clínica de la nitración del Fg y potenciales aplicaciones terapéuticas: la asociación estadísticamente significativa entre la presencia de NO₂Tyr en plasma de pacientes con ACVi subraya la importancia clínica de las modificaciones nitrooxidativas del Fg. Este hallazgo no solo contribuye al entendimiento de la patogénesis de la enfermedad, sino que también abre posibilidades para el desarrollo de estrategias terapéuticas específicas dirigidas a la nitración del Fg.

Relativo a los estudios de dinámica de coagulación y formación de trombos: el análisis de la fibrinoformación y fibrinólisis revela diferencias en la dinámica de coagulación entre los grupos estudiados, especialmente en términos de tiempos de lisis en pacientes con ACVi. Esto proporciona información valiosa sobre los procesos hemostáticos alterados en la enfermedad, lo que podría ser crucial para el desarrollo de estrategias terapéuticas específicas y de manejo clínico.

Caracterización proteica de trombos: la identificación de fragmentos de Fg y otras proteínas nitradas en trombos de pacientes sometidos a trombectomía mecánica amplía la comprensión de las proteínas nitradas en este contexto clínico específico. La IP con anti-NO₂Tyr abre la puerta a posibles aplicaciones clínicas y biomarcadores asociados con los trombos en ACVi.

Modelado molecular del Fg: el desarrollo de un modelo molecular del Fg y las simulaciones de MD proporcionan el primer modelo completo de esta molécula y una visión detallada del impacto de la nitración en residuos de Tyr específicos. Este enfoque contribuye a la comprensión de las alteraciones moleculares subyacentes en la polimerización de la Fb y la fibrinólisis, ofreciendo información valiosa sobre los mecanismos bioquímicos involucrados, aportando información cuantitativa al medir diferencias en las energías de interacción.

En conjunto, estas contribuciones fortalecen la base de conocimientos en la fisiopatología de la ACVi, brindando información clave para futuras investigaciones y ofreciendo posibles avances en la atención y el tratamiento de los pacientes con esta enfermedad.

Aplicaciones Prácticas

La investigación no solo contribuye a la comprensión actual de la ACVi sino que también abre nuevas vías para futuras investigaciones que permitan el desarrollo de estrategias terapéuticas más específicas y el diseño de estudios clínicos adicionales con impacto directo en la atención a pacientes con ACVi. Los resultados de estas investigaciones podrían ofrecer diversas aplicaciones futuras con implicaciones significativas en el diagnóstico, tratamiento y comprensión de la enfermedad cerebrovascular isquémica. Algunas de las principales aplicaciones incluyen:

Biomarcadores de diagnóstico: la identificación de 3-nitrotirosina en Fg, como un marcador asociado al ACVi, podría ser aplicada en el desarrollo de pruebas de diagnóstico más precisas y tempranas para la enfermedad. Estos biomarcadores podrían permitir la detección temprana y diferenciación entre pacientes con ACVi y aquellos sin la enfermedad.

Monitoreo en pacientes: la aplicación de métodos ELISA para evaluar la nitración en plasma podría ser incorporada en protocolos de monitoreo para pacientes con riesgo de ACVi. Esto podría ayudar a los profesionales de la salud a seguir de cerca la progresión de la enfermedad y ajustar estrategias de tratamiento según la presencia de estas modificaciones en el Fg.

Desarrollo de terapias personalizadas: comprender cómo la nitración afecta la estructura molecular del Fg podría abrir la puerta al desarrollo de terapias personalizadas. Enfoques farmacológicos diseñados para abordar específicamente estas modificaciones podrían mejorar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios.

Aplicaciones clínicas en trombectomía mecánica: la identificación de fragmentos de Fg y otras moléculas nitradas en los trombos de pacientes sometidos a trombectomía mecánica sugiere posibles aplicaciones clínicas. Estos hallazgos podrían contribuir al desarrollo de estrategias más efectivas para la eliminación de trombos y mejorar los resultados de los procedimientos de trombectomía.

Investigación continua: los resultados de este estudio proporcionan una base sólida para investigaciones futuras. Se podrían llevar a cabo estudios más detallados para explorar aún más las implicaciones de las modificaciones nitroxidativas en otros aspectos de la fisiopatología de la ACVi. Además, podrían surgir oportunidades para investigar el impacto de estas modificaciones en otras enfermedades relacionadas.

En resumen, los resultados de esta investigación no solo tienen el potencial de mejorar la precisión en el diagnóstico y tratamiento de la ACVi, sino que también abren nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias más efectivas y personalizadas. La aplicación práctica de estos hallazgos podría tener un impacto significativo en la atención clínica y la calidad de vida de los pacientes afectados por esta enfermedad.

Capítulo 9: Conclusiones Finales

La identificación de proteínas nitradas específicas tiene como objetivo arrojar luz sobre los mecanismos moleculares de varias patologías. Identificar y cuantificar los residuos de tirosina que sufren nitración en proteínas interesantes como el Fg, tanto *in vivo* como *in vitro*, es una tarea que aún no se ha realizado completamente ni de manera concluyente. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue contribuir al cuerpo de conocimiento en este campo. Este estudio tuvo como objetivo descubrir los mecanismos detrás de los eventos isquémicos mediante la identificación de niveles diferenciales de nitración, ofreciendo potencialmente una herramienta clínica valiosa para evaluar a los pacientes con accidente cerebrovascular isquémico en futuros estudios.

Este trabajo representa el primer estudio en investigar la ocurrencia de Fg nitrado en etapas tempranas del ACVi, y en utilizar un enfoque dirigido de LC-MS/MS para mostrar un aumento en la nitración de residuos específicos de Tyr en una cohorte de ACVi en comparación con una con patología no inflamatoria. Los datos sugieren que el Fg nitrado puede ser un biomarcador potencial de procesos isquémicos agudos que podrían ayudar con un diagnóstico más temprano y específico del ACVi, pero se deben realizar más trabajos con un conjunto de muestras más grande y una cohorte de enfermedad no inflamatoria mejor emparejada, incluyendo fumadores, para confirmar esto y explorar el valor diagnóstico de ubicaciones adicionales de NO₂Tyr. A pesar del gran desafío de cuantificar residuos específicos de NO₂Tyr, herramientas más específicas para enfermedades podrían reducir en última instancia la mortalidad, los déficits neurológicos y el daño sistémico asociado con un diagnóstico tardío.

A pesar de las complejidades metodológicas en la cuantificación de los residuos de NO₂Tyr mediante inmunoensayos, la determinación exitosa en muestras de plasma humano demostró una notable diferencia de contenido entre los pacientes con ACVi y el grupo de control. Esto subraya el desafío de implementar la determinación de NO₂Tyr en la práctica clínica, enfatizando la necesidad constante de mejorar la sensibilidad y la especificidad, especialmente cuando se trabaja con matrices de plasma complejas. Si bien se requiere una mayor optimización, el potencial del ELISA como herramienta analítica futura para el diagnóstico de ACVi y la reducción de la morbilidad asociada es evidente.

Los estudios funcionales de fibrinogénesis y fibrinólisis permitieron observar el comportamiento del Fg y Fb de pacientes con ACVi, mostrando una tendencia que coincide con lo reportado en literatura, hacia una fibrinólisis más lenta. Considerando los hallazgos de

niveles de nitración elevados en estos pacientes, éstos podrían estar asociados a esa alteración funcional.

La composición de los trombos analizados mostró variaciones significativas en el contenido proteico. Es destacable que las proteínas obtenidas después del enriquecimiento con anti-NO₂Tyr en un grupo de trombos exhibieron un perfil inflamatorio, lo que sugiere la presencia de posibles biomarcadores nitrados que merecen una investigación más detallada. Estos hallazgos contribuyen a la comprensión del ACVi y ofrecen perspectivas sobre la diversidad proteómica de los trombos, allanando potencialmente el camino para futuras investigaciones de biomarcadores y aplicaciones clínicas, y abren nuevas vías para el desarrollo de diagnósticos más precisos y personalizados

La estructura 3D de Fg resultante de las simulaciones de MD concuerda con informes previos de que las regiones α C son una porción altamente flexible de la molécula de Fg. En conjunto, los resultados aquí presentados proporcionan ideas sobre la primera estructura realista de longitud completa del Fg. Esta molécula completa de Fg permitiría la construcción de una protofibrila para elucidar los mecanismos de polimerización de la Fb, en los cuales las regiones α C desempeñan un papel importante.

Las simulaciones de MD del Fg conteniendo residuos de NO₂Tyr mostraron que el residuo NO₂Tyr³⁸⁰ en la cadena γ conduce a cambios estructurales que afectan la interacción E_A:Da. Esto proporciona una visión detallada de los cambios estructurales que pueden afectar los procesos de polimerización de la Fb y, por ende, la formación de trombos. Estos conocimientos son cruciales para entender mejor la arquitectura de la Fb en condiciones patológicas como el ACVi y para diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

En conclusión, este estudio ofrece un avance significativo en la identificación de biomarcadores y en la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a eventos isquémicos, aportando valiosa información que podría mejorar el diagnóstico y tratamiento del ACVi en el futuro.

Anexos

ARTÍCULOS PUBLICADOS (se adjuntan):

- Medeiros R, Sousa B, Rossi S, Afonso C, Bonino L, Pitt A, López E, Spickett C, Borthagaray G. Identification and relative quantification of 3-nitrotyrosine residues in fibrinogen nitrated in vitro and fibrinogen from ischemic stroke patient plasma using LC-MS/MS. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021; 165: 334-47. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.049>
- López Achigar EM, Bonino Sánchez LE, Medeiros Figueredo R, Lena Rodríguez AM, Vaucher Rivero A. Evaluación de los factores de riesgo vasculares convencionales en pacientes con ataque cerebrovascular isquémico en un hospital de Uruguay. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 2021; 55(4): 429-38.
- López EM, Bonino LE, Medeiros RA, Lena AM, Vaucher A, Esperón P. Evaluación de parámetros inflamatorios, trombóticos y variantes genéticas en pacientes con ataque cerebrovascular isquémico que se asisten en un hospital de Uruguay. *Revista Uruguaya de Medicina Interna*. 2023; 8(3): 35-47. <https://doi.org/10.26445/08.03.4>
- Medeiros R, Rossi S, López E, Miraballes I, Borthagaray G. Development and application of novel ELISA-based analytical tools for assessing nitroxidative distress biomarkers in ischemic stroke: implications for improved diagnosis and clinical management. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2024; 45(2): 122-49. <https://doi.org/10.1080/15321819.2024.2312812>

ARTÍCULO EN REVISIÓN:

- Romina Medeiros, Jorge Cantero, Graciela Borthagaray, and Margot Paulino. Unveiling the Architecture of Human Fibrinogen: A Full-length Structural Model. *cbic.202400425* for *ChemBioChem*

RESÚMENES PUBLICADOS:

- Romina Medeiros Figueredo, Elizabeth López-Achigar, Esperanza Morato López, Carlos García García, Antonio Martínez Ruiz. "Identification of nitrated proteins in human thrombi from ischemic cerebrovascular events". *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 218, Supplement 1, 2024, Page 48. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.04.171>
- J.M. Larramendi Embid, R. Medeiros, C. Mattos, C. Zerbino, C. Gaiero. "Functional studies of fibrin formation and fibrinolysis in cerebrovascular accident patients". *Clinica Chimica Acta*, Volume 558, Supplement 1, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.118339>
- Romina Medeiros Figueredo, Elizabeth López-Achigar, Jorge Cantero Piñanez, Margot

Paulino Zunini. “Molecular dynamics simulation study of the impact of 3-nitrotyrosine residues within the intermolecular interaction pockets of human fibrinogen”. Free Radical Biology and Medicine, Volume 208, Supplement 1, 2023, Page S91, ISSN 0891-5849, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.204>

- Romina Medeiros Figueredo, Elizabeth López-Achigar, Jorge Cantero Piñanez, Margot Paulino Zunini, Esperanza Morato López, Carlos García García, Antonio Martínez Ruiz. “Identification of tyrosine nitration as a nitroxidative posttranslational modification in fibrinogen.” Free Radical Biology and Medicine, Volume 201, Supplement 1, 2023, Pages 63-64, ISSN 0891-5849, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.03.258>
- Romina Medeiros, Silvina Rossi, Elizabeth López, Iris Miraballes. “[YIA] Development of ELISA for the detection of nitro-oxidative stress biomarkers”, Free Radical Biology and Medicine, Volume 189, Supplement 1, 2022, Page 20, ISSN 0891-5849, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.094>
- Medeiros Romina, Jorge Cantero, Margot Paulino, Graciela Borthagaray. “Estructura tridimensional completa de fibrinógeno humano: un desafío para el modelado biomolecular”. <https://www.fq.edu.uy/?q=es/node/1567>
- Romina Medeiros; Bebiana Sousa; Silvina Rossi; Catarina Afonso; Luis Bonino; Andrew Pitt; Elizabeth López; Corinne Spickett; Graciela Borthagaray. “17. Identification and relative quantification of 3-nitro-tyrosine residues in fibrinogen using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Analysis of ischaemic stroke”. Abstracts of poster presenters in alphabetical sequence of first author, Free Radical Biology and Medicine, Volume 139, Supplement 1, 2019, Pages S10-S57, ISSN 0891-5849, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.021>
- Romina Medeiros, Raúl Chiozzzone, Graciela Borthagaray, “P-298 - Quality peroxynitrite can be produced in any laboratory”, Free Radical Biology and Medicine, Volume 120, Supplement 1, 2018, Page S135, ISSN 0891-5849, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.445>

Referencias

- ¹ Blombäck, B., Hessel, B., Hogg, D. Disulfide bridges in NH₂-terminal part of human fibrinogen. *Thromb Res.* 1976; 8: 639–58
- ² Henschen, A., Lottspeich, F., Kehl, M., Southan, C. Covalent structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408: 28–43
- ³ Fuss, C., Palmaz, J.C., Sprague, E.A. Fibrinogen: structure, function, and surface interactions. *J Vasc Interv Radiol.* 2001; 12(6): 677–682
- ⁴ Kostelansky, M. S., Betts, L., Gorkun, O. V., Lord, S. T. 2.8 Å crystal structures of recombinant fragment D with and without two peptide ligands: GHRP binding to the “b” site disrupts its nearby calcium-binding site. *Biochemistry.* 2002; 41: 12124–32
- ⁵ Dang, C. V., Shin, C. K., Bell, W. R., Nagaswami, C., Weisel, J. W. Fibrinogen sialic acid residues are low affinity calcium binding sites that influence fibrin assembly. *J Biol Chem.* 1989; 264(25): 15104–8
- ⁶ Fu, Y., Grieninger, G. Fib420: A normal human variant of fibrinogen with two extended chains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 2625
- ⁷ Lauricella, A. M. Variabilidad de las redes de fibrina. *Acta Bioquim Clín Latinoam.* 2007; 41 (1): 7–19
- ⁸ Chung, D. W., Davie, E. W. γ and γ' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing. *Biochemistry.* 1984; 23: 4232–6
- ⁹ Wolfenstein-Todel, C., Mosesson, M. W. Carboxy-terminal amino acid sequence of a human fibrinogen γ chain variant γ' . *Biochemistry.* 1981; 20: 6146–9
- ¹⁰ Mosesson, M. W. Fibrinogen gamma chain functions. *J Thromb Haemost.* 2003; 1 (2): 231–8
- ¹¹ Mosesson, M. W., Finlayson, J. S., Umfleet, R. A. Human fibrinogen heterogeneities: III. Identification of c chain variants. *J Biol Chem* 1972; 247: 5223–7
- ¹² Siebenlist, K. R., DiOrio, J. P., Budzynski, A. Z., Mosesson, M. W. The polymerization and thrombin-binding properties of des- β -fibrin. *J Biol Chem.* 1990; 265: 18650–5
- ¹³ Mosesson, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 1894–904
- ¹⁴ Wolberg, A.S. Fibrinogen and fibrin: synthesis, structure, and function in health and disease. *J Thromb Haemost.* 2023
- ¹⁵ Gorkun, O. V., Veklich, Y. I., Medved, L. V., Henschen, A.H., Weisel, J. W. Role of the α C domains of fibrin in clot formation. *Biochemistry* 1994; 33: 6986–97
- ¹⁶ Mosesson, M. W. Fibrinogen heterogeneity. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408: 97–113
- ¹⁷ Mosesson, M. W., Siebenlist, K. R., Hainfeld, J. F., Wall, J. S. The covalent structure of factor XIIIa crosslinked fibrinogen fibrils. *J Struct Biol.* 1995; 115: 88–101
- ¹⁸ Mosesson, M. W., Siebenlist, K. R., DiOrio, J. P., Matsuda, M., Hainfeld, J. F., Wall, J. S. The role of fibrinogen D domain intermolecular association sites in the polymerization of fibrin and fibrinogen Tokyo II (γ 275 Arg→Cys). *J Clin Invest* 1995; 96: 1053–8
- ¹⁹ Doolittle, R. F., Chen, R., Lau, F. Hybrid fibrin: proof of the intermolecular nature of γ - γ -crosslinking units. *Biochem Biophys Res Commun.* 1971; 44: 94–100
- ²⁰ Siebenlist, K. R., Mosesson, M. W. Evidence for intramolecular crosslinked $A\alpha\gamma$ chain heterodimers in plasma fibrinogen. *Biochemistry.* 1996; 35: 5817–21
- ²¹ Collet, J. P., Park, D., Lesty, C., Soria, J., Soria, C., Montalescot, G., et al. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed. Dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1354–61
- ²² Weisel, J., Veklich, Y., Collet, J., Francis, C. Structural studies of fibrinolysis by electron and light microscopy. *Thromb Haemost.* 1999; 82 (2): 277–82
- ²³ Mosesson, M. W., DiOrio, J. P., Siebenlist, K. R., Wall, J. S., Hainfeld, J. F. Evidence for a second type of fibril branch point in fibrin polymer networks, the trimolecular junction. *Blood.* 1993; 82: 1517–21
- ²⁴ Blombäck, B., Carlsson, K., Fatah, K., Hessel, B., Procyk, R. Fibrin in human plasma: gel architectures governed by rate and nature of fibrinogen activation. *Thromb Res* 1994; 75: 521–38
- ²⁵ Blombäck, B., Carlsson, K., Hessel, B., Liljeborg, A., Procyk, R., Aslund, N. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 997: 96–110
- ²⁶ Kaijzel, E. L., Koolwijk, P., van Erck, M. G., van Hinsbergh, V. W., de Maat, M. P. Molecular weight fibrinogen variants determine angiogenesis rate in a fibrin matrix *in vitro* and *in vivo*. *J Thromb Haemost.* 2006; 4 (9): 1975–81
- ²⁷ Hardy, J. J., Carrell, N. A., McDonagh, J. Calcium ion functions in fibrinogen conversion to fibrin. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408: 279–87
- ²⁸ Schielen, W. J., Voskuilen, M., Tesser, G. I., Nieuwenhuizen, W. The sequence A α -(148–160) in fibrin, but not in fibrinogen, is accessible to monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 8951–4
- ²⁹ Schielen, W. J., Adams, H. P., van Leuven, K., Voskuilen, M., Tesser, G. I., Nieuwenhuizen, W. The sequence gamma-(312–324) is a fibrin-specific epitope. *Blood.* 1991; 77: 2169–73
- ³⁰ Schielen, W. J., Adams, H. P., Voskuilen, M., Tesser, G. I., Nieuwenhuizen, W. The sequence A α -(154–159) of fibrinogen is capable of accelerating the tPA catalyzed activation of plasminogen. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1991; 2: 465–70
- ³¹ Tsurupa, G., Medved, L. Identification and characterization of novel tPA- and plasminogen-binding sites within fibrin(ogen) alpha C-domains. *Biochemistry.* 2001; 40: 801–8

- ³² Marder, V. J., Francis, C. W., Doolittle, R. F. Fibrinogen structure and physiology. En: Colman, R. W., Hirsh, J., Marder, V. J., Salzman, E. W., eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia: JB Lippincott, 1982: 145–163
- ³³ Francis, C. W., Marder, V. J., Barlow, G. H. Plasmic degradation of crosslinked fibrin: characterization of new macromolecular soluble complexes and model of their structure. *J Clin Invest*. 1980; 66: 1033–1043
- ³⁴ Sakata, Y., Aoki, H. Significance of cross-linking of α 2-plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *J Clin Invest*. 1982; 69: 536–42
- ³⁵ Ritchie, H., Lawrie, L. C., Crombie, P. W., Mosesson, M. W., Booth, N. A. Cross-linking of plasminogen activator inhibitor 2 and alpha2-antiplasmin to fibrin(ogen). *J Biol Chem*. 2000; 275: 24915–20
- ³⁶ Fenton, J. W. Jr., Olson, T. A., Zabinski, M. P., Wilner, G. D. Anion-binding exosite of human a-thrombin and fibrin(ogen) recognition. *Biochemistry*. 1988; 27: 7106–12
- ³⁷ Seegers, W. H., Niefert, M., Loomis, E. C. Note on the adsorption of thrombin on fibrin. *Science*. 1945; 101: 520–1
- ³⁸ Meh, D. A., Siebenlist, K. R., Mosesson, M. W. Identification and characterization of the thrombin binding sites on fibrin. *J Biol Chem*. 1996; 271: 23121–5
- ³⁹ Pechik, I., Madrazo, J., Mosesson, M. W., Hernandez, I., Gilliland, G. L., Medved, L. Crystal structure of the complex between thrombin and the central E region of fibrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 2718–23
- ⁴⁰ Loscalzo, J., Weinfeld, M., Fless, G. M., Scanu, A. M. Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis*. 1990; 10: 240–5
- ⁴¹ Leung, L. L. K. Interaction of histidine-rich glycoprotein with fibrinogen and fibrin. *J Clin Invest*. 1986; 77: 1305–11
- ⁴² Lijnen, H. R., Hoylaerts, M., Collen, D. Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen. Role in the regulation of fibrinolysis and identification as hisitidine-rich glycoprotein. *J Biol Chem*. 1980; 255: 10214–22
- ⁴³ Odrlijin, T. M., Shainoff, J. R., Lawrence, S. O., Simpson-Haidaris, P. J. Thrombin cleavage enhances exposure of a heparin binding domain in the N-terminus of the fibrin beta chain. *Blood*. 1996; 88: 2050–61
- ⁴⁴ Hamaguchi, M., Bunce, L. A., Sporn, L. A., Francis, C. W. Spreading of platelets on fibrin is mediated by the amino terminus of the β chain including peptide β 15–42. *Blood*. 1993; 81: 2348–56
- ⁴⁵ Odrlijin, T. M., Francis, C. W., Sporn, L. A., Bunce, L. A., Marder, V. J., Simpson-Haidaris, P. J. Heparin-binding domain of fibrin mediates its binding to endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 1544–51
- ⁴⁶ Chalupowicz, D. G., Chowdhury, Z. A., Bach, T. L., Barsigian, C., Martinez, J. Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation. *J Cell Biol*. 1995; 130: 207–15
- ⁴⁷ Ribes, J. A., Bunce, L. A., Francis, C. W. Mediation of fibrin-induced release of von Willebrand factor from cultured endothelial cells by the fibrin β chain. *J Clin Invest*. 1989; 84: 435–41
- ⁴⁸ Cheresh, D. A. Human endothelial cells synthesize and express an arg-gly-asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84: 6471–5
- ⁴⁹ Andrieux, A., Hudry-Clergeon, G., Ryckwaert, J.-J. Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GP IIb-IIIa. *J Biol Chem*. 1989; 264: 9258–65
- ⁵⁰ Flick, M. J., Du, X., Witte, D. P., Jirouskova, M., Soloviev, D. A., Busuttill, S. J., Plow, E. F., Degen, J. L. Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor α 5 β 1/Mac-1 is critical for host inflammatory response *in vivo*. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1596–606
- ⁵¹ Ugarova, T. P., Solovjov, D. A., Zhang, L., Loukinov, D. I., Yee, V. C., Medved, L. V., Plow, E. F. Identification of a novel recognition sequence for integrin α 5 β 1 within the γ -chain of fibrinogen. *J Biol Chem*. 1998; 273: 22519–27
- ⁵² Mustard, J. F., Packham, M. A., Kinlough-Rathbone, R., Perry, D. W. and Regoeczi, E. Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. *Blood*. 1978; 52(2): 453–466
- ⁵³ Matsuka, Y. V., Migliorini, M. M., Ingham, K. C. Cross-linking of fibronectin to C-terminal fragments of the fibrinogen alpha-chain by factor XIIIa. *J Protein Chem*. 1997; 16: 739–45
- ⁵⁴ Kamykowski, G. W., Mosher, D. F., Lorand, L., et al. Modification of shear modulus and creep compliance of fibrin clots by fibronectin. *Biophys Chem*. 1981; 13: 25–28
- ⁵⁵ Sahni, A., Guo, M., Sahni, S. K., Francis, C. W. Interleukin-1 beta but not IL-1 alpha binds to fibrinogen and fibrin and has enhanced activity in the bound form. *Blood*. 2004; 104: 409–14
- ⁵⁶ Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994; 344(8924): 721–724
- ⁵⁷ Sies H. Oxidative stress: Introductory remarks. (Sies H, Ed.). *Oxidative stress*. 1985: 1–8
- ⁵⁸ Sies H. Oxidative stress: Eustress and distress in redox homeostasis. In *Stress: physiology, biochemistry, and pathology* 2019 Jan 1 (pp. 153-163). Academic Press.
- ⁵⁹ Sies H. Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. In *Oxidative stress* 2020 Jan 1 (pp. 3-12). Academic Press
- ⁶⁰ Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*. 2015; 4: 180–3
- ⁶¹ Sies, H., Berndt, C., Jones, DP. Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*. 2017; 86(1): 715–48
- ⁶² Dhawan, V. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. En: Ganguly, N. K. et al. *Studies on Respiratory Disorders*. New York: Humana Press, 2014. Chapter 2, p. 27–47
- ⁶³ Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82: 47–95
- ⁶⁴ Sies, H., Ryan J. Mailloux, and Ursula Jakob. Fundamentals of redox regulation in biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2024; 1–19

- ⁶⁵ Karve, T. and Cheema, A. Small Changes Huge Impact: The Role of Protein Posttranslational Modifications in Cellular Homeostasis and Disease. *Journal of Amino Acids*. 2011; 1: 1–13
- ⁶⁶ Harman, D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78: 7124–7128
- ⁶⁷ Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1987; 201: 875–880
- ⁶⁸ Gielis, J. F., Lin, J. Y., Wingler, K. et al. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50(7): 765–776
- ⁶⁹ Lushchak, V. I. Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI Journal*. 2014; 13(1): 922–937
- ⁷⁰ Crapo, J. D. Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage. *Eur Respir J*. 2003; 22(44): 4–6
- ⁷¹ Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1): 44–84
- ⁷² Stadtman, E. and Berlett, B. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug metabolism reviews*. 1998; 30 (2): 225–43
- ⁷³ Palmer, R. M., Rees, D. D., Ashton, D. S. et al. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980; 153(3): 1251–1256
- ⁷⁴ Farinati, F., Della Libera, G., Cardin, R., Molari, A., Plebani, M., Rugge, M., Di Mario, F. and Naccarato, R. J. Gastric antioxidant, nitrites, and mucosal lipoperoxidation in chronic gastritis and *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Gastroenterol*. 1996; 22: 275–281
- ⁷⁵ Pacher, P., Beckman, J., and Liaudet, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2007; 87(1): 315–424
- ⁷⁶ Butler, A., Megson, I. and Wright, P. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998; 1425(1): 168–76
- ⁷⁷ Hurtado, F. J., Nin, N., Rubbo, H. Estrés oxidativo y nitrosativo en la sepsis. *Med Intensiva*. 2005; 29(3): 159–65
- ⁷⁸ Bartosz, G. Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide. *Acta Biochimica Polonica*. 1996; 43: 645–660
- ⁷⁹ Wall, S., Oh, J., Diers, A. and Landar, A. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling. *Frontiers of Physiology*. 2012; 3(1): 1–9
- ⁸⁰ Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M. and Cayota, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010; 30(5): 463–488
- ⁸¹ Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., Beckman, J. S. Peroxynitrite: a cloaked oxidant from superoxide and nitric oxide. *Chem Res Toxicol*. 1992; 5: 834–842
- ⁸² Radi, R., Cosgrove, T. P., Beckman, J. S., Freeman, B. A. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem J*. 1993; 290: 51–57
- ⁸³ Botti, H., Batthyány, C., Trostchansky, A., Radi, R., Freeman, B., Rubbo, H. Peroxynitrite-mediated α -tocopherol oxidation in low-density lipoprotein: a mechanistic approach. *Free Rad Biol Med*. 2004; 36: 152–62
- ⁸⁴ Hughes, M. N., Nicklin, H. G. The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *J. Chem. Soc*. 1968; (A): 450–452
- ⁸⁵ Ramezani, M. S., Padmaja, S., Koppenol, W. H. Nitration and hydroxylation of phenolic compounds by peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*. 1996; 9: 232–240
- ⁸⁶ Ischiropoulos, H., Al-Mehdi, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett*. 1995; 364: 279–282
- ⁸⁷ Radi, R. Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant. *Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288(37): 26464–26472
- ⁸⁸ Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B. A., Radi, R. Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem Res Toxicol*. 1996; 9: 390–396
- ⁸⁹ Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. M., Freeman, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 1620–4
- ⁹⁰ Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., Freeman, B. A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*. 1991; 266: 4244–50
- ⁹¹ Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, H. M., Martin, J. C., Smith, C. D., Beckman, J. S. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 298: 431–7
- ⁹² Halliwell, B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation *in vivo*? *FEBS Letters*. 1997; 411: 157–160
- ⁹³ Salman-Tabcheh, S., Guérin, M., Torreilles, J. Nitration of tyrosyl-residues from extra and intracellular proteins in human whole blood. *Free Radical Biol Med*. 1995; 19: 695–698
- ⁹⁴ Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H., Crow, J. P. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods in Enzymology*. 1994; 233: 229–240
- ⁹⁵ Radi, R., Denicola, A., Ferrer, G., Álvarez, B., Rubbo, H. The biological chemistry of peroxynitrite. En: Ignarro L, editor. *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*. San Diego: Academic Press, 2000. p. 57–82
- ⁹⁶ Sies H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of biochemistry*. 1993; 215 (2): 213–9
- ⁹⁷ Li, J. X. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Exp Biol Med*. 1999; 222(3): 283–292
- ⁹⁸ Faraci, F. M., Didion, S. P. Vascular protection superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 1367–1373
- ⁹⁹ Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997; 82 (2): 291–5
- ¹⁰⁰ Levine R. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002; 32 (9): 790–796

- ¹⁰¹ Berlett, BS. and Stadtman, ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272 (1): 20313–20316
- ¹⁰² Hoshi, T. and Heinemann, S. Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *The Journal of Physiology*. 2001; 531 (1): 1–11
- ¹⁰³ Poole, LB., Nelson, KJ. Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. *Current opinion in chemical biology*. 2008; 12(1): 18–24
- ¹⁰⁴ Kim, H. and Gladyshev, V. Methionine sulfoxide reductases: selenoprotein forms and roles. *The Biochemical Journal*. 2007; 407 (3): 321–329
- ¹⁰⁵ Uchida, K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino acids*. 2003;25 :249–57
- ¹⁰⁶ Mann, M. and Jensen, O. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*. 2003; 21 (1): 255–261
- ¹⁰⁷ Shacter, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*. 2000; 32 (3-4): 307–26
- ¹⁰⁸ Kaur, J., Arora, S., Singh, B., Thakur, L. C., Gambhir, J., Prabhu, K. M. Role of oxidative stress in pathophysiology of transient ischemic attack and stroke. *Int J Biol Med Res*. 2011; 2(3): 611–615
- ¹⁰⁹ Lakhan, SE., Kirchgessner, A., Hofer, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med*. 2009; 7: 1
- ¹¹⁰ Jelinek, M., Jurajda, M., Duris, K. Oxidative Stress in the Brain: Basic Concepts and Treatment Strategies in Stroke. *Antioxidants*. 2021; 10: 1886
- ¹¹¹ GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, Regional, and National Burden of Stroke and Its Risk Factors, 1990-2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *LancetNeurol*. 2021; 20: 795–820
- ¹¹² Hackembruch, H. J., Perna, A., Ketzoian, C., Mortality due to Stroke in Uruguay. *J Neurol Sci*. 2013; 11: 209–310
- ¹¹³ Chen, S. D., Yang, D. I., Lin, T. K., Shaw, F.Z., Liou, C. W., Chuang, Y. C. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 alpha and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int J Mol Sci*. 2011; 12(10): 7199–7215
- ¹¹⁴ Martin, R. L., Lloyd, H. G., Cowan, A. I. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci*. 1994; 17(6): 251–257
- ¹¹⁵ Katsura, K., Kristian, T., Siesjo, B. K. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans*. 1994; 22(4): 991–996
- ¹¹⁶ Bretón, R. R., Rodríguez, J. C. G. Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke. En: *Acute Ischemic Stroke*. Croatia: University Campus, 2012. Chapter 2, p. 29–59
- ¹¹⁷ Lin, M. T., Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006; 443(7113): 787–795
- ¹¹⁸ Vishal, C., Chaurasia, B., Garg, K., Deora, H., Umana, GE., Palmisciano, P., Scalia, G., Lu, B. Molecular mechanisms of oxidative stress in stroke and cancer. *Brain Disorders*. 2022; 5: 100029
- ¹¹⁹ Cojocaru, I. M., Cojocaru, M., Sapira, V., Ionescu, A. Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med*. 2013; 51(2): 97–106
- ¹²⁰ Sethi, S., Singh, M. P., Dikshit, M. Mechanisms involved in the augmentation of arachidonic acid-induced free-radical generation from rat neutrophils following hypoxia-reoxygenation. *Thromb Res*. 2000; 98(5): 445–450
- ¹²¹ Ohtsubo, T., Rovira, I. I., Starost, M. F., Liu, C., Finkel, T. Xanthine oxidoreductase is an endogenous regulator of cyclooxygenase-2. *Circ Res*. 2004; 95(11): 1118–1124
- ¹²² Allen, C. L., Bayraktutan, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke*. 2009; 4(6): 461–470
- ¹²³ Stoll, G., Jander, S., Schroeter, M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol*. 1998; 56(2): 149–171
- ¹²⁴ McGarry, T., Biniacka, M., Veale, D., Fearon, U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018; 125: 15–24
- ¹²⁵ Leopold, J. A., Loscalzo, J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009; 47(12): 1673–1706
- ¹²⁶ Galkina, E., Ley, K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annual review of immunology*. 2009; 27(1): 165–97
- ¹²⁷ Libby, P., Ridker, PM., Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105(9): 1135–43
- ¹²⁸ Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. and Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2003; 329(1-2): 23–38
- ¹²⁹ Halliwell, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992; 59(5): 1609–1623
- ¹³⁰ Radak, D., Resanovic, I., Isenovic, E. R. Link Between Oxidative Stress and Acute Brain Ischemia. *Angiology*. 2014; 65: 667–676
- ¹³¹ Sugawara, T., Chan, P. H. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal*. 2003; 5(5): 597–607
- ¹³² Woodruff, T. M., Thundiyil, J., Tang, S. C., Sobey, C. G., Taylor, S. M., Arumugam, T. V. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener*. 2011; 6(1): 11
- ¹³³ Weigandt, K., White, N., Chung, D., Ellingson, E., Wang, Y., Fu, X. and Pozzo, D. Fibrin clot structure and mechanics associated with specific oxidation of methionine residues in fibrinogen. *Biophysical Journal*. 2012; 103 (11): 2399–2407

- ¹³⁴ Radi, R. Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Functional Effects. *Accounts of Chemical Research*. 2012; 46(2): 550–559
- ¹³⁵ Ohshima, H., Friesen, M., Brouet, I., Bartsch, H. Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food Chem. Toxicol.* 1990; 28: 647–652
- ¹³⁶ Petruzzelli, S., Puntoni, R., Mimotti, P., Pulera, N., Baliva, F., Fornai, E., Giuntini, C. Plasma 3-Nitrotyrosine in Cigarette Smokers. *C Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: 1902–1907
- ¹³⁷ Pitt, A. and Spickett, C. Mass spectrometric analysis of HOCl- and freeradical-induced damage to lipids and proteins. *Biochemical Society Transactions*. 2008; 36 (1): 1077–1082
- ¹³⁸ Safinowski, M., Wilhelm, B., Reimer, T., Weise, A., Thomé, N., Hänel, H., Forst, T., Pfützner, A. Determination of nitrotyrosine concentrations in plasma samples of diabetes mellitus patients by four different immunoassays leads to contradictory results and disqualifies the majority of the tests. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2009; 47 (4): 483–488
- ¹³⁹ Teixeira, D., Fernandes, R., Prudêncio, C., Vieira, M. 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges. *Biochimie*. 2016; 125 (1): 1–11
- ¹⁴⁰ Crow, J., Ischiropoulos, H. Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: *In vivo* marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol*. 1996; 269: 185–194
- ¹⁴¹ Herce-Pagliai, C., Kotecha, S., Shuker, D. E. G. Analytical Methods for 3-Nitrotyrosine as a Marker of Exposure to Reactive Nitrogen Species. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 1998; 2(5): 324–336
- ¹⁴² Franze, T., Weller, M. G., Niessner, R., Poschl, U. Enzyme immunoassays for the investigation of protein nitration by air pollutants. *Analyst*. 2003; 128: 824–831
- ¹⁴³ Khan, J., Brennan, D. M., Bradley, N. et al. 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem J*. 1998; 330: 795–801
- ¹⁴⁴ Martinez, M., Weisel, J. W., Ischiropoulos, H. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots. *Free Radic Biol Med*. 2013; 65: 411–418
- ¹⁴⁵ Gole, M. D., Souza, J. M., Choi, I., Hertkorn, C., Malcolm, S., Foust, R. F. 3rd, Finkel, B., Lanken, P. N., Ischiropoulos, H. Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 278 (5): L961–L967
- ¹⁴⁶ Pignatelli, B., Li, CQ., Boffetta, P., Chen, Q., Ahrens, W., Nyberg, F., Mukeria, A., Bruske-Hohlfeld, I., Fortes, C., Constantinescu, V., Ischiropoulos, H. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer research*. 2001; 61(2): 778–84
- ¹⁴⁷ Piroddi, M., Palmese, A., Pilolli, F., Amoresano, A., Pucci, P., Ronco, C., Galli, F. Plasma nitroproteome of kidney disease patients. *Amino Acids*. 2011; 40 (2): 653–667
- ¹⁴⁸ Vadseth, C., Souza, J. M., Thomson, L., Seagraves, A., Nagaswami, C., Scheiner, T., et al. Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *J Biol Chem*. 2004; 279: 8820–6
- ¹⁴⁹ Martinez, M., Cuker, A., Mills, A., Lightfoot, R., Fan, Y., Tang, WH., Hazen, SL and Ischiropoulos, H. Nitrated fibrinogen is a biomarker of oxidative stress in venous thromboembolism. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012; 53 (2): 230–236
- ¹⁵⁰ Parastatidis, I., Thomson, L., Burke, A., Chernysh, I., et al. Fibrinogen β -chain tyrosine nitration is a prothrombotic risk factor. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(49): 33846–53
- ¹⁵¹ Shacter, E., Williams, J., Lim, M. and Levine, R. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by Western blot immunoassay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994; 17 (5): 429–437
- ¹⁵² Shishehbor, M., Aviles, R., Brennan, M., Fu, X., Goormastic, M., Pearce, G., Gokce, N., Keaney, J., Penn, M., Sprecher, D., Vita, J. and Hazen, S. Association of Nitrotyrosine Levels With Cardiovascular Disease and Modulation by Statin Therapy. *JAMA*. 2003; 238 (13): 1675–1680
- ¹⁵³ Ill-Raga, G. I., Palomer, E., Ramos Fernández, E., et al. Fibrinogen nitrotyrosination after ischemic Stroke impairs thrombolysis and promotes neuronal death. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015; 1852: 421–428
- ¹⁵⁴ Nowak, P., Wachowicz, B. Peroxynitrite-mediated modification of fibrinogen affects platelet aggregation and adhesion. *Platelets*. 2002; 13: 293–299
- ¹⁵⁵ Meredith, S., Parekh, G., Towler, J., Schouten, J., Davis, P., Griffiths, H., Spickett, C. P87. Mapping nitro-tyrosine modifications in fibrinogen by mass spectrometry as a biomarker for inflammatory disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 75: S21–S53
- ¹⁵⁶ Luo, Y., Shi, J., Li, J. Peroxynitrite induced fibrinogen site identification. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2015; 26: S2241–S2248
- ¹⁵⁷ Tang, Z., Wu, H., Du, D., Wang, J. et al. Sensitive immunoassays of nitrated fibrinogen in human biofluids. *Talanta*. 2010; 81: 1662–1669
- ¹⁵⁸ Kollman, J. M., Pandi, L., Sawara, M. R., Riley, M., Doolittle, R. F. Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry*. 2009; 48(18): 3877–86
- ¹⁵⁹ Adams, Jr., Harold, P., Birgitte, H., Bendixen, L., Jaap, K., Biller, J., Betsy, B., Love, D., and Marsh, E. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993; 24(1): 35–41
- ¹⁶⁰ Medeiros, R., Chiozzzone, R. and Borthagaray, G. Quality peroxynitrite can be produced in any laboratory. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018; 120: S135
- ¹⁶¹ Longas, M. O., Newman, J. and Johnson, A. J. An improved method for the purification of human fibrinogen. *International Journal of Biochemistry*. 1980; 11(6): 559–564

- ¹⁶² Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier; 1985 Aug 1.
- ¹⁶³ Larsen, J. B., Hvas, A. M. Fibrin clot formation and lysis in plasma. *Methods and Protocols*. 2020; 3(4): 67
- ¹⁶⁴ Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J.V., Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*. 2006; 1(6): 2856–2860
- ¹⁶⁵ Levitt M. A simplified representation of protein conformations for rapid simulation of protein folding. *Journal of molecular biology*. 1976; 104(1): 59-107
- ¹⁶⁶ Voth GA. Coarse-graining of condensed phase and biomolecular systems. CRC press; 2008.
- ¹⁶⁷ Kelley, LA., Mezulis, S., Yates, CM., Wass, MN., Sternberg, MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 2015; 10(6): 845–858
- ¹⁶⁸ ULC C. Molecular operating environment (MOE), 2022.02. Chemical Computing Group ULC, McGill University: Montreal, QC, Canada. 2024.
- ¹⁶⁹ Darré, L., Machado, M. R., Brandner, A. F., González, H. C., Ferreira, S. and Pantano, S. SIRAH: a structurally unbiased coarse-grained force field for proteins with aqueous solvation and long-range electrostatics. *Journal of chemical theory and computation*. 2015; 11(2): 723–739
- ¹⁷⁰ Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Molec Graphics*. 1996; 14: 33–38.
- ¹⁷¹ Case DA, Aktulga HM, Belfon K, Cerutti DS, Cisneros GA, Cruzeiro VW, Forouzesh N, Giese TJ, Götz AW, Gohlke H, Izadi S. AmberTools. *Journal of chemical information and modeling*. 2023 Oct 8;63(20):6183-91.
- ¹⁷² Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*. 2005; 26(16): 1781–802
- ¹⁷³ Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics*. 1993 Jun 15;98(12):10089-92.
- ¹⁷⁴ Jones JE. On the determination of molecular fields.—I. From the variation of the viscosity of a gas with temperature. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*. 1924 Oct 1;106(738):441-62
- ¹⁷⁵ Jones JE. On the determination of molecular fields.—II. From the equation of state of a gas. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*. 1924 Oct 1;106(738):463-77
- ¹⁷⁶ Martyna GJ. Remarks on “Constant-temperature molecular dynamics with momentum conservation”. *Physical Review E*. 1994; 50(4): 3234
- ¹⁷⁷ Feller SE, Zhang Y, Pastor RW, Brooks BR. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *The Journal of chemical physics*. 1995; 103(11): 4613-21
- ¹⁷⁸ Swope WC, Andersen HC, Berens PH, Wilson KR. A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *The Journal of chemical physics*. 1982; 76(1): 637-49
- ¹⁷⁹ Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of chemical physics*. 1983; 79(2): 926-35
- ¹⁸⁰ Ribeiro, J.V., Bernardi, R.C., Rudack, T., Stone, J.E., Phillips, J.C., Freddolino, P.L. and Schulten, K. QwikMD-integrative molecular dynamics toolkit for novices and experts. *Sci. Rep*. 2016; 6(1): 26536
- ¹⁸¹ Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E. M., Mittal, J., Feig, M. and MacKerell, A. D. Optimization of the additive CHARMM All-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ 1 and χ 2 dihedral Angles. *J Chem Theory Comput*. 2012; 8: 3257–3273
- ¹⁸² MacKerell, A. D., Jr., Bashford, D., Bellott, M., R. L., Jr., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao J., Guo, H., Ha S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kucsera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiórkiewicz-Kucsera, J., Yin, D. and Karplus M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B*. 1998; 102: 3586–3616
- ¹⁸³ P.J. Turner, XMGRACE, Version 5.1. 19. Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, Oregon (USA), 2005.
- ¹⁸⁴ Medeiros, R., Sousa, B., Rossi, S., *et al.* Identification and relative quantification of 3-nitrotyrosine residues in fibrinogen nitrated in vitro and fibrinogen from ischemic stroke patient plasma using LC-MS/MS. *Free Radic Biol Med*. 2021; 165: 334–347
- ¹⁸⁵ Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989; 246 (4926): 64–71
- ¹⁸⁶ Verrastro, I., Pasha, S., Tveen Jensen, K., Pitt, A.R., Spickett, C.M. Mass spectrometry-based methods for identifying oxidized proteins in disease: advances and challenges. *Biomolecules*. 2015; 5(2): 378–411
- ¹⁸⁷ Regalado, E.L., Schafer, W., McClain, R., Welch, C.J. Chromatographic resolution of closely related species: Separation of warfarin and hydroxylated isomers. *Journal of Chromatography*. 2013; 1314: 266–275
- ¹⁸⁸ Pitt, A. Application of electrospray mass spectrometry in biology. *Natural Products Reports*. 1998; 15 (1): 59–72
- ¹⁸⁹ Mitchell Wells, J. and McLuckey, S.A. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods in Enzymology*. 2005; 402 (1): 148–185
- ¹⁹⁰ Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A. and Pappin, D.J. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2004; 3 (12): 1154–69
- ¹⁹¹ Miskeli, K. 1993. Quadrupole mass spectrometer. US Patent. 5,227,629. 1 (1), 1-2.

- ¹⁹² Hoffmann, E. and Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3rd ed. Chichester: Wiley-Blackwell. 2007; 85–134
- ¹⁹³ Anderson, L. and Hunter, C. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2005; 5 (4): 573–588
- ¹⁹⁴ Harris, D. *Quantitative Chemical Analysis*. 8th ed. New York: W. H. Freeman and Company. 2010; 514–515
- ¹⁹⁵ Domon, B. and Aebersold, R. *Mass Spectrometry and Protein Analysis*. Science. 2006; 80 (312): 212–217
- ¹⁹⁶ Abello, N., Kerstjens, H., Postma, D. and Bischoff, R. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *Journal of Proteome Research*. 2009; 8 (7): 3222–3238
- ¹⁹⁷ Stevens, Prokai-Tatrai and Laszlo Prokai. Factors That Contribute to the Misidentification of Tyrosine Nitration by Shotgun Proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2008; 7 (1): 2442–2451
- ¹⁹⁸ Petersson, AS., Steen, H., Kalume, DE., Caidahl, K., Roepstorff, P. Investigation of tyrosine nitration in proteins by mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*. 2001; 36(6): 616–25
- ¹⁹⁹ Nowak, P., Zbikowska, H. M., Ponczek, M., Kolodziejczyk, J., Wachowicz, B. Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: functional consequences. *Thromb Res*. 2007; 121(2): 163–174
- ²⁰⁰ Aslan, M., Ryan, T. M., Townes, T. M., Coward, L., Kirk, M. C., Barnes, S., Alexander, C. B., Rosenfeld, S. S., Freeman, B. A. Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem*. 2003; 278(6): 4194–4204
- ²⁰¹ Petre, BA., Ulrich, M., Stumbaum, M., Bernevic, B., Moise, A., Doring, G., Przybylski, M. When is mass spectrometry combined with affinity approaches essential? A case study of tyrosine nitration in proteins. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2012; 23(11): 1831–40
- ²⁰² Batthyany, C., Souza, J. M., Duran, R., Cassina, A., Cervenansky, C., Radi, R. Time course and site(s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxynitrite, *Biochemistry*. 2005; 44(22): 8038–8046
- ²⁰³ Lorentzen, LG., Chuang, CY., Rogowska-Wrzesinska, A., Davies, MJ. Identification and quantification of sites of nitration and oxidation in the key matrix protein laminin and the structural consequences of these Modifications. *Redox Biol*. 2019; 24.
- ²⁰⁴ Laskowitz, DT., Kasner, SE., Saver, J., Remmel, KS., Jauch, EC., Group, BS. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) study. *Stroke*. 2009; 40 (1): 77–85
- ²⁰⁵ Janeway, Jr CA., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, MJ. The interaction of the antibody molecule with specific antigen. *In Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition 2001. Garland Science.
- ²⁰⁶ Hennion, M. and Barcelo, D. Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review. *Analytica Chimica Acta*. 1998; 362 (1): 3–34
- ²⁰⁷ Crowther, JR. ELISA. Theory and practice. *Methods Mol Biol*. 1995; 42: 1-218
- ²⁰⁸ Owen J (2012). *Kuby Immunology*. 7th ed. New York: Macmillan. 500.
- ²⁰⁹ Harris and Markl. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*. 1999; 30 (6): 597–623
- ²¹⁰ Franze, T., Weller, M. G., Niessner, R., Poschl, U. Comparison of Nitrotyrosine Antibodies and Development of Immunoassays for the Detection of Nitrated Proteins. *Analyst*. 2004; 129(7): 589–96
- ²¹¹ Onorato, J., Thorpe, S. and Baynes, J. Immunohistochemical and ELISA assays for biomarkers of oxidative stress in aging and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998; 854 (1): 277–290
- ²¹² Matyas, G., Wassef, N., Rao, M. and Alving, C. Induction and detection of antibodies to squalene. *Journal of Immunological Methods*. 2002; 267 (1): 119–129
- ²¹³ Duncan, M. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids*. 2002; 25 (3-4): 351–361
- ²¹⁴ López, E., Bonino, L., Medeiros, R., Lena, A., Vaucher, A. Evaluación de los factores de riesgo vasculares convencionales en pacientes con ataque cerebrovascular isquémico en un hospital de Uruguay. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam*. 2021; 55(4): 429–438
- ²¹⁵ Kernan, W., Ovbiagele, B., Black, H., Bravata, D., Chimowitz, M., Ezekowitz, M., Fang, M., Fisher, M., Furie, K., Heck, D., et al. Guidelines for the Prevention of Stroke in Patients with Stroke and Transient Ischemic Attack. A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/ American Stroke Association. *Stroke*. 2014; 45(7): 2160–2236
- ²¹⁶ López, E., Bonino, L., Medeiros, R., Lena, A., Vaucher, A., Esperón, P. Evaluation of Parameters of Inflammation, Thrombotic State and Genetic Variants in Patients with Ischemic Stroke in an Uruguayan Hospital. *Revista Uruguaya de Medicina Interna*. 2023; 8(3): 35–47
- ²¹⁷ Medeiros, R., Rossi, S., López, E., Miraballes, I. and Borthagaray, G. Development and application of novel ELISA-based analytical tools for assessing nitroxidative distress biomarkers in ischemic stroke: implications for improved diagnosis and clinical management. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2024; 45(2): 122–49
- ²¹⁸ Du J, Wang J, Xu T, Yao H, Yu L, Huang D. Hemostasis strategies and recent advances in nanomaterials for hemostasis. *Molecules*. 2023; 28(13): 5264
- ²¹⁹ Blombäck, B., Okada, M. Fibrin gel structure and clotting time. *Thrombosis Research*. 1982; 25(1-2): 51–70
- ²²⁰ Duque González, P. Tromboelastometría. *Revista Electrónica AnestesiaR*. 2016; 9(7): 3
- ²²¹ Sugo, T., Endo, H., Matsuda, M., Ohmori, T., Madoiwa, S., Mimuro, J., et al. A classification of the fibrin network structures formed from the hereditary dysfibrinogens. *J Thromb Haemost*. 2006; 4 (8): 1738–46
- ²²² Gerth, C., Roberts, W. W., Ferry, J. D. Rheology of fibrin clots. II. Linear viscoelastic behavior in shear creep. *Biophys Chem*. 1974; 2: 208–17

- 223 Scheiner T., Jirouskova, M., Nagaswami, C., Coller, B. S., Weisel, J.W. A monoclonal antibody to the fibrinogen gamma-chain alters fibrin clot structure and its properties by producing short, thin fibers arranged in bundles. *J Thromb Haemost.* 2003; 1 (12): 2594–602
- 224 Beebe, D., Aronson, D. An automated fibrinolytic assay performed in microtiter plates. *Thromb Res.* 1987; 47: 123–128
- 225 Neergaard-Petersen, S., Mogensen, V.B., Veirup, M.S., Grove, E.L., Kristensen, S.D., Hvas, A.M. Fibrin clot lysis assay: Establishment of a reference interval. *Thromb. Res.* 2018; 167: 9–11
- 226 Veirup, M.S., Mogensen, V.B., Neergaard-Petersen, S., Hvas, A.M. Fibrin Clot Lysis Analysis: Tissue Factor versus Thrombin as Activator. *Proceedings of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.* 2019.
- 227 Pieters, M., Philippou, H., Undas, A., De Lange, Z., Rijken, D.C., Mutch, N.J. An international study on the feasibility of a standardized combined plasma clot turbidity and lysis assay: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2018; 16: 1007–1012
- 228 Lisman, T., De Groot, P.G., Meijers, J.C., Rosendaal, F.R. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood.* 2005; 105: 1102–1105
- 229 Ząbczyk, M., Natarska, J., Janion-Sadowska, A., Metzger-Gumiela, A., Polak, M., Plens, K., Janion, M., Skonieczny, G., Mizia-Stec, K., Undas, A. Prothrombotic fibrin clot properties associated with NETs formation characterize acute pulmonary embolism patients with higher mortality risk. *Sci. Rep.* 2020; 10: 11433
- 230 Neergaard-Petersen, S., Hvas, A.M., Kristensen, S.D., Grove, E.L., Larsen, S.B., Phoenix, F., Kurdee, Z.; Grant, P.J., Ajjan, R.A. The influence of type 2 diabetes on fibrin clot properties in patients with coronary artery disease. *Thromb. Haemost.* 2014; 112: 1142–1150
- 231 Bos, S., van den Boom, B., Kamphuisen, P.W., Adelmeijer, J., Blokzijl, H., Schreuder, T., Lisman, T. Haemostatic profiles are similar across all aetiologies of cirrhosis. *Thromb. Haemost.* 2019; 119: 246–253
- 232 Semeraro, F., Colucci, M., Caironi, P., Masson, S., Ammollo, C.T., Teli, R., Semeraro, N., Magnoli, M., Salati, G., Isetta, M., et al. Platelet drop and fibrinolytic shutdown in patients with sepsis. *Crit. Care Med.* 2018; 46: e221–e228
- 233 Undas, A., Slowik, A., Wolkow, P., Szczudlik, A., Tracz, W. Fibrin clot properties in acute ischemic stroke: Relation to neurological deficit. *Thromb Res.* 2010; 125: 357–361
- 234 Undas, A., Szuldrzinski, K., Stepień, E., Zalewski, J., Godlewski, J., Tracz, W., Pasowicz, M., Zmudka, K. Reduced clot permeability and susceptibility to lysis in patients with acute coronary syndrome: Effects of inflammation and oxidative stress. *Atherosclerosis.* 2008; 196: 551–557
- 235 Goyal, M., Bijoy, K., Wim, H., Zwam, V., Diederik, W.J., Peter, J., Mitchell, A., Demchuk, A., et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet.* 2016; 387(10029): 1723–1731
- 236 Singh, P., Soroush, D., Reinhard, M., Ivanovas, V., Taschner, C. Immunohistochemical analysis of thrombi retrieved during treatment of acute ischemic stroke: does stent-retriever cause intimal damage? *Stroke.* 2013; 44(6): 1720–1722
- 237 Shin, J.W., Jeong, H.S., Hyon-Jo, K., Sang Song, K., and Jei, K. High red blood cell composition in clots is associated with successful recanalization during intra-arterial thrombectomy. *PloS one.* 2018; 13(5): e0197492.
- 238 Dobrocky, T., Piechowiak, E., Cianfoni, A., Zibold, F., Roccatagliata, L., Mosimann, P., Jung, S., Fischer, U., Mordasini, P., and Gralla, J. Thrombectomy of calcified emboli in stroke. Does histology of thrombi influence the effectiveness of thrombectomy? *Journal of neurointerventional surgery.* 2018; 10(4): 345–350
- 239 Varjú, I., Sótonyi, P., Machovich, R., Szabó, L., Tenekedjiev, K., Silva, C., Kolev, K. Hindered dissolution of fibrin formed under mechanical stress. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2011; 9(5): 979–986
- 240 Heo, J., Suk Nam, K., Dae Kim, Y., Kyo Choi, J., Moon Kim, B., Joon Kim, D., Kwon, I. Pathophysiologic and therapeutic perspectives based on thrombus histology in stroke. *Journal of Stroke.* 2020; 22(1): 64
- 241 Rui-Gang, X., and Ariëns, R. Insights into the composition of stroke thrombi: heterogeneity and distinct clot areas impact treatment. *Haematologica.* 2020; 105(2): 257
- 242 Watson, T., Shantsila, E., and Lip, G. Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *The Lancet.* 2009; 373(9658): 155–166
- 243 Aliena-Valero, A., Baixauli-Martín, J., Torregrosa, G., Tembl, J., and Salom, J. Clot composition analysis as a diagnostic tool to gain insight into ischemic stroke etiology: a systematic review. *Journal of stroke.* 2021; 23(3): 327
- 244 Mousavi, J.S., Mostafa, S., Faghihi, D., Sommer, K., Bhurwani, M., Tatsat, R., Santo, B., Waqas, M. et al. Realistic computer modelling of stent retriever thrombectomy: a hybrid finite-element analysis-smoothed particle hydrodynamics model. *Journal of the Royal Society Interface.* 2021; 18(185): 20210583
- 245 Boeckh-Behrens, T., Kleine, J.F., Zimmer, C., Neff, F., Scheipl, F., Pelisek, J., Schirmer, L., Nguyen, K., Karatas, D., and Poppert, H. Thrombus histology suggests cardioembolic cause in cryptogenic stroke. *Stroke.* 2016; 47(7): 1864–1871
- 246 Maekawa, K., Shibata, M., Nakajima, H., Mizutani, A., Kitano, Y., Seguchi, M., Yamasaki, M. et al. Erythrocyte-rich thrombus is associated with reduced number of maneuvers and procedure time in patients with acute ischemic stroke undergoing mechanical thrombectomy. *Cerebrovascular diseases extra.* 2018; 8(1): 39–49
- 247 Martinod, K., and Wagner, D. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2014; 123(18): 2768–2776
- 248 Fuchs, T., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D., Wroblewski, S., Wakefield, T., Hartwig, J., and Wagner, D. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010; 107(36): 15880–15885
- 249 Laridan, E., Martinod, K., and De Meyer, S. Neutrophil extracellular traps in arterial and venous thrombosis. In *Seminars in thrombosis and hemostasis*, vol. 45, no. 01, pp. 086-093. Thieme Medical Publishers, 2019.

- 250 Lisman, T. Platelet–neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease. *Cell and tissue research*. 2018; 371(3): 567–576
- 251 Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680–685
- 252 Köhler, G. & Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature*. 1975; 256: 495–497
- 253 Southern, E. M. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975; 98: 503–517
- 254 Alwine, J. C., Kemp, D. J. & Stark, G. R. Method for Detection of Specific RNAs in Agarose Gels by Transfer to Diazobenzyloxymethyl-Paper and Hybridization With DNA Probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74: 5350–5354
- 255 Burnette, W. N. Western Blotting: Remembrance of Things Past. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1312: 9–12
- 256 Burnette, W.N. “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981; 112: 195–203
- 257 Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. Transfer of Proteins From Gels to Diazobenzyloxymethyl-Paper and Detection With Antisera: A Method for Studying Antibody Specificity and Antigen Structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76: 3116–3120
- 258 Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76: 4350–4354
- 259 Björck L. and Kronvall G. Purification and some properties of streptococcal protein g, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol*. 1984; 133: 969–74
- 260 Harlow, E. and Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1999
- 261 Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry*. 2000; 72(6): 1156–62
- 262 Staessens, S., Denorme, F., François, O., et al. Structural analysis of ischemic stroke thrombi: histological indications for therapy resistance. *Haematologica*. 2019; 105(2): 498–507
- 263 Xu, R. G., Ariëns, R. A. S. Insights into the composition of stroke thrombi: heterogeneity and distinct clot areas impact treatment. *Haematologica*. 2020; 105(2): 257–259
- 264 Wolberg, A. S. Plasma and cellular contributions to fibrin network formation, structure and stability. *Haemophilia*. 2010; 16(S3): 7–12
- 265 Angles-Cano, E., de la Pena Diaz, A., Loyau, S. Inhibition of fibrinolysis by lipoprotein(a). *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 936: 261–275
- 266 Nair, C. H., Dhall, D. P. Studies on fibrin network structure: the effect of some plasma proteins. *Thromb Res*. 1991; 61: 315–325
- 267 Weisel, J. W. Structure of fibrin: impact on clot stability. *J Thromb Haemost*. 2007; 5(S1): 116–124
- 268 Weisel, J. W. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem*. 2005; 70: 247–299
- 269 Talens, S., Leebeek, F. W., Demmers, J. A., Rijken, D. C. Identification of fibrin clot-bound plasma proteins. *PLoS One*. 2012;7(8):e41966.
- 270 Howes, J. M., Richardson, V. R., Smith, K. A., Schroeder, V., Somani, R., et al. Complement C3 is a novel plasma clot component with anti-fibrinolytic properties. *Diab Vasc Dis Res*. 2012; 9: 216–225
- 271 Capobianco, E., White, V., Sosa, M. et al. Regulation of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Activities by Peroxynitrites in Term Placentas From Type 2 Diabetic Patients. *Reprod. Sci*. 2012; 19: 814–822
- 272 Chen H, Guan B, Shen J. Targeting ONOO-/HMGB1/MMP-9 signaling cascades: potential for drug development from Chinese medicine to attenuate ischemic brain injury and hemorrhagic transformation induced by thrombolytic treatment. *Integrative Medicine International*. 2016; 3(1-2): 32–52
- 273 Sultana R, Butterfield DA. Oxidatively modified, mitochondria-relevant brain proteins in subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2009; 41: 441–6
- 274 Lim SY, Raftery MJ, Goyette J, Hsu K, Geczy CL. Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. *Journal of leukocyte biology*. 2009; 86(3): 577–87
- 275 Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Frontiers in immunology*. 2018; 9: 1298
- 276 Senturk A, Alver A, Karkucak M, Küçük M, Rendi TA. Oxidative modification of carbonic anhydrase by peroxynitrite trigger immune response in mice and rheumatic disease patients. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2023; 366(6): 438–48
- 277 Sultana R, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Merchant M, Klein JB, Markesbery WR, Butterfield DA. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiology of disease*. 2006; 22(1): 76–87
- 278 Audagnotto, M., Dal Peraro, M. Protein post-translational modifications: *In silico* prediction tools and molecular modeling. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2017; 15: 307–319
- 279 Pollack, L. Klaus Schulten Reflects on his 2015 National Lecture. Available online: <http://www.ks.uiuc.edu/events/NationalLecture2015/reflection/>
- 280 Feynman RP, Leighton RB, Sands M. The Feynman lectures on physics, Vol. I: The new millennium edition: mainly mechanics, radiation, and heat. Basic books; 2015 Sep 29.
- 281 McCammon JA, Gelin BR, Karplus M. Dynamics of folded proteins. *nature*. 1977 Jun 16;267(5612):585–90.
- 282 Cramer CJ. *Essentials of computational chemistry: theories and models*. John Wiley & Sons; 2013 Apr 29.

- ²⁸³ Leach AR. Molecular modelling: principles and applications. Pearson education; 2001
- ²⁸⁴ Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The protein data bank. *Nucleic acids research*. 2000; 28(1): 235-42
- ²⁸⁵ Lipkowitz K. Abuses of molecular mechanics: pitfalls to avoid. *Journal of chemical education*. 1995; 72(12): 1070
- ²⁸⁶ Ryu H, Park J, Kim HK, Park JY, Kim ST, Baik MH. Pitfalls in computational modeling of chemical reactions and how to avoid them. *Organometallics*. 2018; 37(19): 3228-39
- ²⁸⁷ Car R, Parrinello M. Unified approach for molecular dynamics and density-functional theory. *Physical review letters*. 1985; 55(22): 2471
- ²⁸⁸ Warshel A. Energetics of enzyme catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1978; 75(11): 5250-4
- ²⁸⁹ Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Computational enzymatic catalysis—clarifying enzymatic mechanisms with the help of computers. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012; 14(36): 12431-41
- ²⁹⁰ Riniker S. Fixed-charge atomistic force fields for molecular dynamics simulations in the condensed phase: An overview. *Journal of chemical information and modeling*. 2018; 58(3): 565-78
- ²⁹¹ Aminpour M, Montemagno C, Tuszynski JA. An overview of molecular modeling for drug discovery with specific illustrative examples of applications. *Molecules*. 2019; 24(9): 1693
- ²⁹² Gerzabek MH, Aquino AJ, Balboa YI, Galicia-Andrés E, Grančič P, Oostenbrink C, Petrov D, Tunega D. A contribution of molecular modeling to supramolecular structures in soil organic matter#. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2022; 185(1): 44-59
- ²⁹³ Verlet L. Computer "experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical review*. 1967; 159(1): 98
- ²⁹⁴ Klein ML, Shinoda W. Large-scale molecular dynamics simulations of self-assembling systems. *science*. 2008; 321(5890): 798-800
- ²⁹⁵ Levitt M, Warshel A. Computer simulation of protein folding. *Nature*. 1975; 253(5494): 694-8
- ²⁹⁶ Hall CE, Slayter HS. The fibrinogen molecule: its size, shape, and mode of polymerization. *The Journal of Cell Biology*. 1959; 5(1): 11-27
- ²⁹⁷ Mosesson MW, Hainfeld J, Wall J, Haschemeyer RH. Identification and mass analysis of human fibrinogen molecules and their domains by scanning transmission electron microscopy. *Journal of Molecular Biology*. 1981; 153(3): 695-718
- ²⁹⁸ Slayter HS. Electron microscopic studies of fibrinogen structure: historical perspectives and recent experiments. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1983; 408(1): 131-45
- ²⁹⁹ Erickson, H. P., and Fowler, W. E. Electron microscopy of fibrinogen, its plasmic fragments and small polymers. *Ann NY Acad Sci*. 1983; 408: 146–163
- ³⁰⁰ Weisel JW, Stauffacher CV, Bullitt E, Cohen C. A model for fibrinogen: domains and sequence. *Science*. 1985; 230(4732): 1388-91
- ³⁰¹ Privalov PL. Domains in the fibrinogen molecule. *Journal of Molecular Biology*. 1982; 159(4): 665-83
- ³⁰² Medved' LV, Gorkun OV, Privalov PL. Structural organization of C-terminal parts of fibrinogen A α -chains. *FEBS letters*. 1983; 160(1-2): 291-5
- ³⁰³ Medved L, Litvinovich S, Ugarova T, Matsuka Y, Ingham K. Domain structure and functional activity of the recombinant human fibrinogen γ -module (γ 148– 411). *Biochemistry*. 1997; 36(15): 4685-93
- ³⁰⁴ Spraggon G, Everse SJ, Doolittle RF. Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature*. 1997; 389(6650): 455-62
- ³⁰⁵ Madrazo, J., Brown, J. H., Litvinovich, S., et al. Crystal structure of the central region of bovine fibrinogen (E5 fragment) at 1.4-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(21): 11967–11972
- ³⁰⁶ Soria J, Mirshahi S, Mirshahi SQ, Varin R, Pritchard LL, Soria C, Mirshahi M. Fibrinogen α C domain: its importance in physiopathology. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2019; 3(2): 173-83
- ³⁰⁷ Weisel JW, Medved L. The structure and function of the α C domains of fibrinogen. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001; 936(1): 312-27
- ³⁰⁸ Medved, L., and Weisel, J. W. The story of the fibrin (ogen) α C-domains: evolution of our view on their structure and interactions. *Thrombosis and haemostasis*. 2022; 122(8): 1265–1278
- ³⁰⁹ Collet JP, Moen JL, Veklich YI, Gorkun OV, Lord ST, Montalescot G, Weisel JW. The α C domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. *Blood*. 2005; 106(12): 3824-30
- ³¹⁰ Casini A, Neerman-Arbez M, Ariens RA, De Moerloose P. Dysfibrinogenemia: from molecular anomalies to clinical manifestations and management. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015; 13(6): 909-19
- ³¹¹ McPherson HR, Duval C, Baker SR, Hindle MS, Cheah LT, Asquith NL, Domingues MM, Ridger VC, Connell SD, Naseem KM, Philippou H. Fibrinogen α C-subregions critically contribute blood clot fibre growth, mechanical stability, and resistance to fibrinolysis. *Elife*. 2021; 10: e68761
- ³¹² Medved, L., Weisel, J. W. Fibrinogen and Factor XIII Subcommittee of Scientific Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Haemostasis. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J Thromb Haemost*. 2009; 7(2): 355–359
- ³¹³ Williams, R. C. Morphology of fibrinogen monomers and of fibrin protofibrils. *Ann N Y Acad Sci*. 1983; 408: 180–193
- ³¹⁴ Doolittle RF. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion. *Advances in protein chemistry*. 1973; 27: 1-09
- ³¹⁵ Doolittle, R. F., Watt, K. W., Cottrell, B. A. et al. The amino acid sequence of the alpha-chain of human fibrinogen. *Nature*. 1979; 280: 464–468

- ³¹⁶ Henschen, A., Lottspeich, F., and Hessel, B. Amino acid sequence of human fibrin. Preliminary note on the completion of the intermediate part of the alpha-chain sequence. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1979; 360: 1951–1956
- ³¹⁷ Wall J, Hainfeld J, Haschemeyer RH, Mosesson MW. Analysis of human fibrinogen by scanning transmission electron microscopy. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408, 164-179
- ³¹⁸ Veklich YI, Gorkun OV, Medved LV, Nieuwenhuizen W, Weisel JW. Carboxyl-terminal portions of the alpha chains of fibrinogen and fibrin. Localization by electron microscopy and the effects of isolated alpha C fragments on polymerization. *Journal of Biological Chemistry.* 1993; 268(18): 13577-85
- ³¹⁹ Tsurupa G, Tsonev L, Medved L. Structural organization of the fibrin (ogen) α C-domain. *Biochemistry.* 2002; 41(20): 6449-59
- ³²⁰ Protopopova AD, Barinov NA, Zavvalova EG, Kopylov AM, Sergienko VI, Klinov DV. Visualization of fibrinogen α C regions and their arrangement during fibrin network formation by high-resolution AFM. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2015; 13(4): 570-9
- ³²¹ Rudchenko S, Trakht I, Sobel JH. Comparative Structural and Functional Features of the Human Fibrinogen α C Domain and the Isolated α C Fragment: CHARACTERIZATION USING MONOCLONAL ANTIBODIES TO DEFINED COOH-TERMINAL A α CHAIN REGIONS. *Journal of Biological Chemistry.* 1996; 271(5): 2523-30
- ³²² Williamson MP. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochemical journal.* 1994; 297(Pt 2): 249
- ³²³ Makarov AA, Lobachov VM, Adzhubei IA, Esipova NG. Natural polypeptides in left-handed helical conformation A circular dichroism study of the linker histones' C-terminal fragments and β -endorphin. *FEBS letters.* 1992; 306(1): 63-5
- ³²⁴ Sreerama N, Woody RW. Poly (Pro) II helices in globular proteins: Identification and circular dichroic analysis. *Biochemistry.* 1994; 33(33): 10022-5
- ³²⁵ Cohen C, Weisel JW, Phillips Jr GN, Stauffacher CV, Fillers JP, Daub E. THE STRUCTURE OF FIBRINOGEN AND FIBRIN: I. ELECTRON MICROSCOPY AND X-RAY CRYSTALLOGRAPHY OF FIBRINOGEN. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1983; 408(1): 194-213
- ³²⁶ Scholl CL, Tsuda S, Graham LA, Davies PL. Crystal waters on the nine polyproline type II helical bundle springtail antifreeze protein from *Granisotoma rainieri* match the ice lattice. *The FEBS Journal.* 2021; 288(14): 4332-47
- ³²⁷ Burton RA, Tsurupa G, Medved L, Tjandra N. Identification of an ordered compact structure within the recombinant bovine fibrinogen α C-domain fragment by NMR. *Biochemistry.* 2006; 45(7): 2257-66
- ³²⁸ Burton RA, Tsurupa G, Hantgan RR, Tjandra N, Medved L. NMR solution structure, stability, and interaction of the recombinant bovine fibrinogen α C-domain fragment. *Biochemistry.* 2007; 46(29): 8550-60
- ³²⁹ Tsurupa G, Hantgan RR, Burton RA, Pechik I, Tjandra N, Medved L. Structure, stability, and interaction of the fibrin (ogen) α C-domains. *Biochemistry.* 2009; 48(51): 12191-201
- ³³⁰ Klykov O, Van Der Zwaan C, Heck AJ, Meijer AB, Scheltema RA. Missing regions within the molecular architecture of human fibrin clots structurally resolved by XL-MS and integrative structural modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2020; 117(4): 1976-87
- ³³¹ Tsurupa G, Mahid A, Veklich Y, Weisel JW, Medved L. Structure, stability, and interaction of fibrin α C-domain polymers. *Biochemistry.* 2011; 50(37): 8028-37
- ³³² Protopopova AD, Litvinov RI, Galanakis DK, Nagaswami C, Barinov NA, Mukhitov AR, Klinov DV, Weisel JW. Morphometric characterization of fibrinogen's α C regions and their role in fibrin self-assembly and molecular organization. *Nanoscale.* 2017; 9(36): 13707-16
- ³³³ Köhler S, Schmid F, Settanni G. The internal dynamics of fibrinogen and its implications for coagulation and adsorption. *PLoS computational biology.* 2015; 11(9): e1004346
- ³³⁴ Janin M, Ortiz-Barahona V, de Moura MC, Martínez-Cardús A, Llinàs-Arias P, Soler M, Nachmani D, Pelletier J, Schumann U, Calleja-Cervantes ME, Moran S. Epigenetic loss of RNA-methyltransferase NSUN5 in glioma targets ribosomes to drive a stress adaptive translational program. *Acta neuropathologica.* 2019; 138: 1053-74