



Estudio *in silico* de propiedades de ácidos grasos nitrados ($\text{NO}_2\text{-FA}$) en diversos entornos hacia su interacción y reactividad con APX, un ascorbato peroxidasa vegetal

Tesina de Grado
Licenciatura en Bioquímica
Constanza Ceretta García

Tutora
Dra. E. Laura Coitiño
Cotutora
Lic. Fabiana Salazar

Montevideo, 2025

Laboratorio de Química Teórica y Computacional (LQTC),
Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias,
Universidad de la República, Uruguay

Agradecimientos

Agradezco de corazón a todas las personas que hicieron que todo esto fuera posible:

A Laura, por abrirme las puertas de su laboratorio sin dudar, por enseñarme acerca de la química teórica y hacer que descubriera un campo nuevo de la ciencia, y varias cosas sobre la vida.

A Fabi, por responderme las mismas preguntas varias veces, por explicarme las cosas tan claramente, y por darme *tips* sin los cuales esta tesina todavía estaría por la mitad.

A mis padres, por aguantarme durante toda esta etapa, por darme para adelante y por transmitirme los consejos más sabios que se les ocurrieron.

A Abi, por enseñarme tanto sobre la vida y por ayudarme siempre que pudo (y por siempre ofrecerse, aunque supiera que no podía).

A Juan, por ser mi físico preferido, por ser de los que más me entendieron y me cuidaron, y por ofrecerse a leer este documento a pesar de importarle muy poco las proteínas.

A mi barra amiga: Vale, Pieri, Manu, Naty, Fran, por todas las cenas con charlas profundas cuando algo me estresó.

A Vicky y Agus, sin las que los laboratorios durante la carrera hubiesen sido mucho más aburridos.

A Juli y a Anto, por hacer que me divirtiera muchísimo en nuestro rinconcito del LQTC.

A mis abuelos: Francisco, Mabel, Chela y Alberto, que me fueron quedando por el camino, pero que fueron de los que siempre estuvieron 100% seguros de que me iba a recibir, aunque yo no lo estuviera.

Gracias totales :)

Tabla de Contenidos

0. Resumen

1. Introducción

1.1 Los ácidos grasos y sus nitroalquenos derivados (NO₂-FA) en eucariotas

1.2 Los ácidos grasos y NO₂-FA en las plantas

1.3 La nitroalquilación de proteínas por NO₂-FA

1.4 El estrés oxidativo: ROS y mecanismos antioxidantes

1.5 Las ascorbato peroxidasas (APX)

1.6 La importancia de los cultivos de soja en Uruguay y el mundo

1.7 Objetivos

2. Metodología

2.1 Barrido de propiedades de NO₂-FA con la polaridad del medio y validación de modelos reducidos (RM)

2.2 Caracterización de mecanismos de reacción con los RM

2.3 Estructura y dinámica de APX y la reactividad de Cys32

3. Resultados y su discusión

3.1 Barrido de propiedades de NO₂-FA según la polaridad del solvente

3.2 Validación de modelos reducidos de NO₂-LN

3.3 Caracterización del mecanismo de reacción de nitroalquilación de Cys por NO₂-LN

3.4 Estructura y dinámica de APX y la reactividad de Cys32

4. Conclusiones y perspectivas

5. Referencias bibliográficas

6. Anexo

o. Resumen

Los ácidos grasos nitrados ($\text{NO}_2\text{-FA}$) se han comenzado a estudiar recientemente como señalizadores celulares en sistemas vegetales, donde uno de sus roles principales es el de la señalización en las vías del estrés (hídrico, por falta de nutrientes, etc.) que causan la formación de especies reactivas del oxígeno, dañinas para las células.

Es posible que estos $\text{NO}_2\text{-FA}$, especialmente el ácido linolénico nitrado ($\text{NO}_2\text{-LN}$), participen en la modulación de la respuesta antioxidante de la célula vegetal de diversas maneras, dada su gran electrofilia, debida a la presencia del grupo $-\text{NO}_2$, que causa deficiencia de electrones en el carbono en posición beta (C_β), por lo que este está predispuesto a reaccionar como electrófilo.

El $\text{NO}_2\text{-LN}$ puede reaccionar con las enzimas antioxidantes de la célula, causando modificaciones postraduccionales capaces de afectar su catálisis. Una de estas modificaciones es la nitroalquilación, en la que el C_β del $\text{NO}_2\text{-FA}$ forma un aducto con residuos de histidina, lisina o cisteína (Cys) mediante reacción de Michael, o tiol-Michael en el último caso.

Este trabajo se centró en el estudio de la nitroalquilación mediante reacción de tiol-Michael de la Cys32 del ascorbato peroxidasa citosólica de la soja, APX.

En primer lugar, se realizó un barrido en el que se estudiaron 4 familias de $\text{NO}_2\text{-FA}$, dentro de cada una evaluando las nitraciones en todas las insaturaciones, determinando potenciales diferencias en sus propiedades que permitieran identificar candidatos para seguir estudiando la reacción. Se evaluaron propiedades moleculares relevantes para la reacción, en 6 solventes diferentes, para identificar efectos del medio sobre la reactividad y simular diferentes ambientes celulares en los que estas especies podrían encontrarse en el sistema biológico. Para esto se realizaron optimizaciones de geometría para cada $\text{NO}_2\text{-FA}$, simulando el solvente con modelo de solvente implícito (IEFPCM), concluyendo que no había diferencias entre familias ni entre diferentes sitios de nitración, por lo que se continuó con la familia en la que se había estudiado la nitroalquilación de APX en la literatura: los $\text{NO}_2\text{-LN}$, estudiando una nitración en cada una de sus 3 insaturaciones. Se concluyó, además, que el medio modula la reactividad de los $\text{NO}_2\text{-FA}$, siendo más reactivos en ambientes más polares.

Con los 3 regioisómeros de $\text{NO}_2\text{-LN}$ seleccionados se estudió el mecanismo de la reacción de nitroalquilación utilizando modelos reducidos previamente validados para los $\text{NO}_2\text{-FA}$ escogidos y metil-tiolato como representante de la cisteína de la proteína. Para esto se identificaron las especies estables y estado de transición, y se calculó el camino de reacción (IRC), para observar el cambio de propiedades clave a lo largo del avance de la reacción.

Finalmente, sabiendo que hay información experimental que evidencia la existencia del aducto, se realizaron simulaciones de dinámica molecular de la enzima con este aducto formado y sin él, para identificar cambios estructurales que puedan suceder gracias a esta reacción, y que brinden una posible explicación a los cambios en la catálisis evidenciados experimentalmente en la APX, lográndose obtener la estructura del aducto y encontrando interacciones entre el mismo con un residuo catalítico clave (Arg172), que podrían impedir la unión del sustrato y de esta forma inhibir la catálisis.

Palabras clave: ácidos grasos nitrados, nitroalquilación, ascorbato peroxidasa, modificación postraduccional (PTM), efectos del medio

1. Introducción

1.1 Los ácidos grasos y sus nitroalquenos derivados (NO₂-FA) en eucariotas

Los ácidos grasos (FAs, del inglés “*fatty acids*”) son ácidos carboxílicos alifáticos, que pueden tener dobles enlaces, en general en configuración *cis*. Estas especies se clasifican como lípidos, y son abundantes en las células eucariotas, con roles cruciales que van desde la reserva energética a funciones estructurales en la membrana celular, o señalizadoras dentro de la célula. Pueden sufrir beta-oxidación en mitocondrias o peroxisomas, que culmina en la producción de acetil-CoA, como se ilustra en la **Figura 1**. Los ácidos grasos insaturados y/o de número de carbonos impares dan propionil-CoA como producto de la última tiólisis, que debe sufrir otras reacciones catalizadas enzimáticamente para dar el producto final. El acetil-CoA producido se puede utilizar para la producción de ATP y cofactores reducidos como NADH y FADH₂ que actúen en la cadena transportadora de electrones (1).

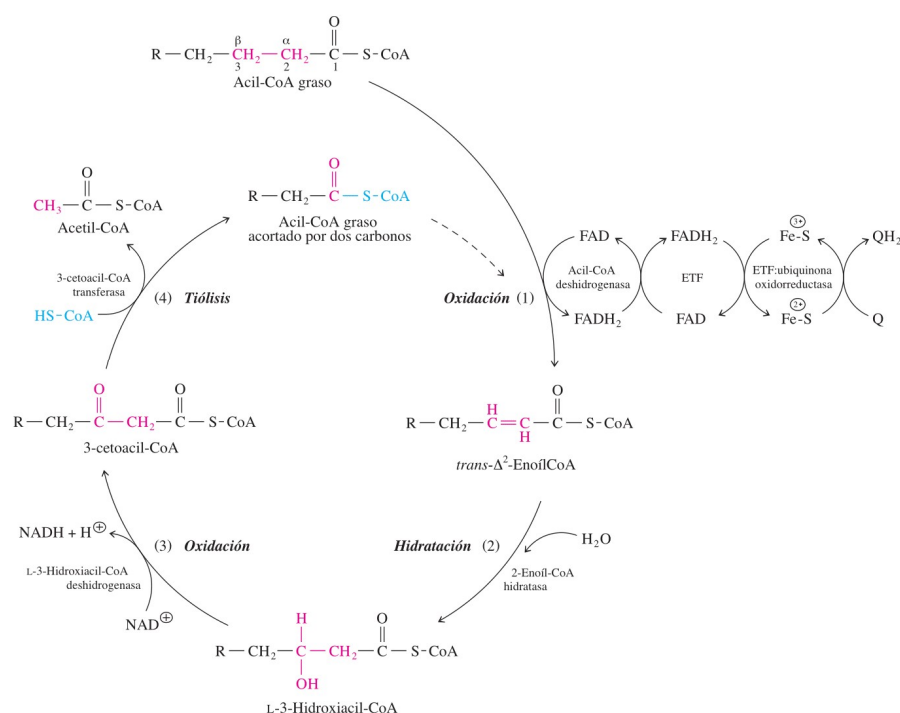


Figura 1- Proceso de beta-oxidación de los ácidos grasos saturados de número de carbonos par, que consiste en ciclos sucesivos de 4 etapas: oxidación, hidratación, oxidación y tiólisis. Extraído de (1).

De no ser necesaria la producción de energía, los FAs pueden sintetizarse *de novo* y actuar como reservorios energéticos (2). Son componentes esenciales de las membranas lipídicas que conforman la membrana celular y de otros organelos, como el retículo endoplásmico, mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, etc. otorgándole diversidad, gracias a su naturaleza anfipática y a la existencia de FAs saturados e insaturados, y dentro de estos últimos, con una sola insaturación (MUFAs, del inglés “*mono-unsaturated fatty acids*”) o múltiples (PUFAs, del inglés “*poly-unsaturated fatty acids*”). Los ácidos

grasos saturados confieren menos fluidez a la membrana que los insaturados, y de esa manera los FAs afectan diversas propiedades biofísicas de las membranas (3).

Tanto los MUFAs y los PUFAs como los ácidos grasos saturados son capaces de sufrir modificaciones químicas, o incorporarse a nuevas moléculas más complejas, como los glicerofosfolípidos y los triacilglicéridos (TAGs), lo que les confiere nuevas propiedades y por lo tanto nuevos roles dentro y fuera de la célula (2). Una de estas posibles modificaciones es la nitración, que ocurre por la adición de especies reactivas del nitrógeno derivadas del óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), y del nitrito (NO_2^-) sobre uno de los carbonos de las insaturaciones de los PUFAs o sobre la única insaturación de los MUFAs, y cuyo mecanismo *in vivo* todavía se discute (4–6). Se plantean 3 posibles mecanismos de formación de dióxido de nitrógeno radical que llevan a la nitración de ácidos grasos: la nitración dependiente de $\bullet\text{NO}$, la de producción de dióxido de nitrógeno radical ($\bullet\text{NO}_2$) por hemo-peroxidasas, y la de producción de $\bullet\text{NO}_2$ por pH ácido, los cuales se esquematizan en la **Figura 2a**.

El ataque de las especies reactivas del nitrógeno, como el $\bullet\text{NO}_2$ sobre la o las insaturaciones de un FA tiene como resultado un ácido graso nitrado ($\text{NO}_2\text{-FA}$) (7), cuya estructura 2D se esquematiza en la **Figura 2b** junto con la de un FA saturado, un MUFA, un PUFA y un TAG.

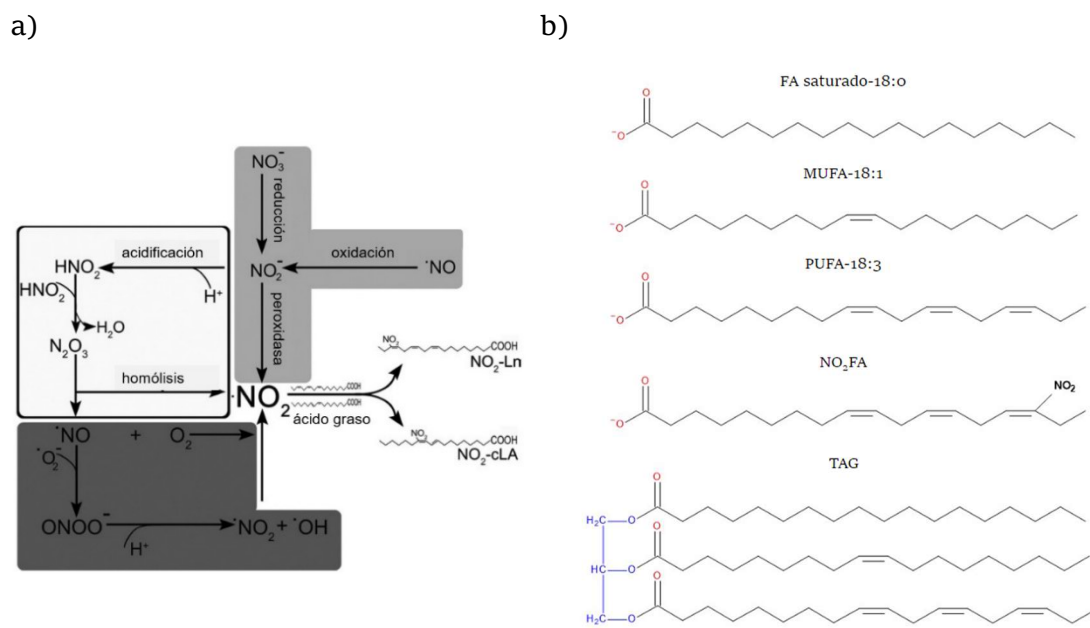


Figura 2- a) Vías posibles de formación de $\bullet\text{NO}_2$ previo a la nitración de los ácidos grasos *in vivo*. Adaptado de (8). b) Representaciones 2D para ejemplos de un FA saturado, un MUFA, un PUFA, un $\text{NO}_2\text{-FA}$ y un TAG. Generado con BIOVIA Draw (9).

La introducción del grupo $-\text{NO}_2$ a la molécula del FA, tiene como resultado un aumento en su electrofilia, dado que es un grupo electroattractor. Este aumento se da sobre el carbono en posición β con respecto al carbono nitrado, y en el carbono en posición δ en el caso de haber dobles enlaces conjugados que permitan deslocalización electrónica (10).

En la **Tabla 1** se reportan los principales FA cuya nitración se ha estudiado en sistemas biológicos, reportando la cantidad de regioisómeros nitrados posibles para cada uno. En la **Figura 3** se muestra la estructura 2D de estos FAs, mostrando todos los posibles sitios de nitración (en cada carbono de cada insaturación). Sin embargo, los sitios preferenciales de nitración cambian según si los dobles enlaces entre carbonos son aislados o conjugados. Un ejemplo de esto es el ácido linoleico conjugado, que contiene dos dobles enlaces conjugados entre sí. En él se observó experimentalmente que la nitración ocurre sobre los carbonos 9 y 12 preferentemente, antes que en el 10 y 13 (11).

Tabla 1- Nombre común y IUPAC, fórmula molecular, esquema de estructura 2D y notación taquigráfica de los principales FAs cuya nitración se ha estudiado en sistemas biológicos.

Nombre común	Notación taquigráfica de lípidos	Nombre IUPAC	Fórmula molecular	Nº regioisómeros nitrados
Ácido oleico	18:1	ácido cis-9-octadecenoico	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	2
Ácido linoleico	18:2 $\Delta^{9,12}$	ácido(9Z,12Z)-9,12-octadecadienoico	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	4
Ácido linoleico conjugado	18:2 $\Delta^{9,11}$	ácido(9Z,11E)-9,11-octadecadienoico	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	4*
Ácido araquidónico	20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$	ácido(5Z,8Z,11Z,14Z)-5,8,11,14-eicosatetraenoico	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$	8
Ácido α -linolénico	18:3 $\Delta^{9,12,15}$	ácido(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-octadecatrienoico	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$	6

*Si bien existen 4 regioisómeros nitrados, no se estudian todos en este trabajo, gracias a la abundancia relativa que se reportó experimentalmente como se explicó anteriormente.

En el ser humano se han detectado NO_2 -FA provenientes de la dieta y de formación endógena en el estómago tras la ingesta de FAs (12-14). Entre los detectados en estos organismos se encuentran los provenientes de los ácidos linoleico (LA), oleico (OA), araquidónico (AA) y linoleico conjugado (cLA), cuya información química se reporta en la **Tabla 1**, y cuya estructura 2D se representa en la **Figura 3**. El ácido α -linolénico (LN) se encuentra principalmente en sistemas vegetales, y se profundizará sobre él en la sección siguiente.

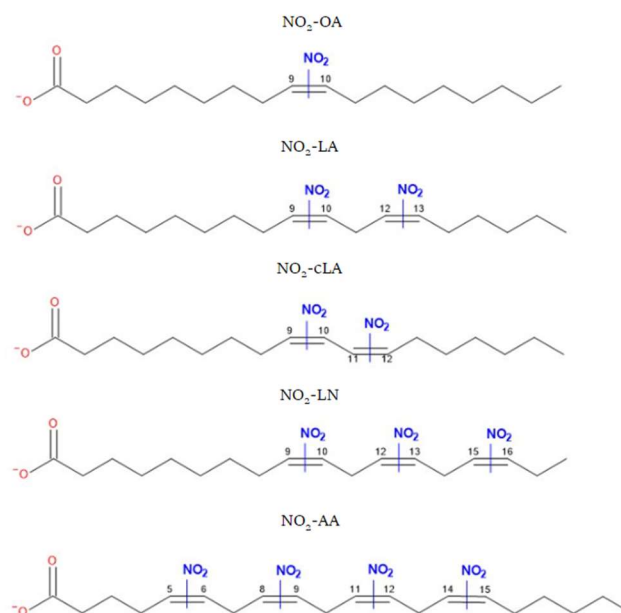


Figura 3-Representación 2D de los principales NO₂-FA que se han detectado en diferentes organismos: NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-cLA, NO₂-LN y NO₂-AA. El grupo -NO₂ se muestra entre los 2 carbonos de cada insaturación para representar que puede posicionarse sobre cualquiera de ellos. Generado con BIOVIA Draw (9).

A pesar de que el énfasis en estudios de los NO₂-FA como señalizadores celulares ha estado en el ser humano y en otros mamíferos, el interés en los sistemas vegetales ha ido aumentando en las últimas décadas (15–18).

1.2 Los ácidos grasos y NO₂-FA en las plantas

En las plantas los ácidos grasos no se sintetizan en el citosol, sino que, dentro de los plastos, lo que implica mecanismos adicionales de exportación para que lleguen a toda la célula (19). En estos organismos los FA predominantes son los de 18 carbonos, como el oleico, linoleico y α -linolénico (20,21). Además de las funciones mencionadas para todos los eucariotas en la subsección anterior, en los sistemas vegetales los FAs tienen roles adicionales en las vías del estrés, como precursores de moléculas activadoras de la respuesta adquirida a patógenos (SAR), como el ácido jasmónico (JA) y el ácido azelaico (AzA), hormonas centrales en este tipo de respuestas, ya que son las que se generan en el sitio de infección y viajan por el floema para activar las defensas en otros sitios de la planta (22).

Con respecto a su rol estructural en las plantas, los FAs de la membrana tilacoidal cumplen un rol fundamental en la función del fotosistema II, necesario para la fotosíntesis (23), y se ha visto que cambios en las proporciones de FAs en la membrana plasmática son los que permiten la adaptación a diferentes temperaturas, aumentando los ácidos grasos saturados a medida que la temperatura también lo hace (24). Adicionalmente, también forman parte de estructuras extracelulares como la quitina, suberina y ceras (19).

Con respecto a los nitroalquenos derivados de los FAs, en sistemas vegetales se han detectado tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés. Los FAs cuyas variantes nitradas se han detectado en plantas son el LA, OA, cLA y LN, todos con cadenas carbonadas de 18 carbonos, como se reporta en la **Tabla 1**. Algunos de ellos, como el NO₂-OA, el NO₂-LA y el NO₂-cLA ya se mencionaron anteriormente, ya que están presentes en sistemas animales y vegetales. El ácido araquidónico (AA), muy importante como precursor de hormonas en los mamíferos, no se encuentra en las plantas. El NO₂-FA más abundante en las plantas es el ácido nitro-linolénico (NO₂-LN), que no se encuentra endógenamente en el ser humano, pero es beneficioso para la salud, por lo que se lo obtiene de la ingesta de productos derivados de vegetales como el aceite de oliva (15).

En la **Tabla 2** se reporta en qué especies vegetales se encontraron los NO₂-FA provenientes de los FAs mencionados anteriormente, junto con el estadio/órgano de la planta que se estudió, el método experimental utilizado para cuantificarlos y la concentración que se obtuvo para cada uno. Se observa que las concentraciones encontradas en todos los casos están en el orden de pmol-nmol/g, lo que es coherente con los roles de señalización celular que se abordarán a continuación.

Los NO₂-FA tienen varias funciones conocidas en la célula vegetal, sobre todo de señalización, reaccionando con facilidad gracias a su gran electrofilia (25). *In vitro* se ha visto que el NO₂-LN puede actuar como donante de óxido nítrico (•NO), por un mecanismo no del todo elucidado, que podría involucrar una reacción de Nef modificada y un intermediario nitroso, como se representa en la **Figura 4** (26). Más adelante, se detectó mediante espectroscopía de resonancia paramagnética (EPR, del nombre en inglés) que el NO₂-LA, NO₂-cLA y NO₂-OA también liberan NO en solución, cuya aparición puede seguirse con esta técnica, ya que es una especie química de capa abierta (25).

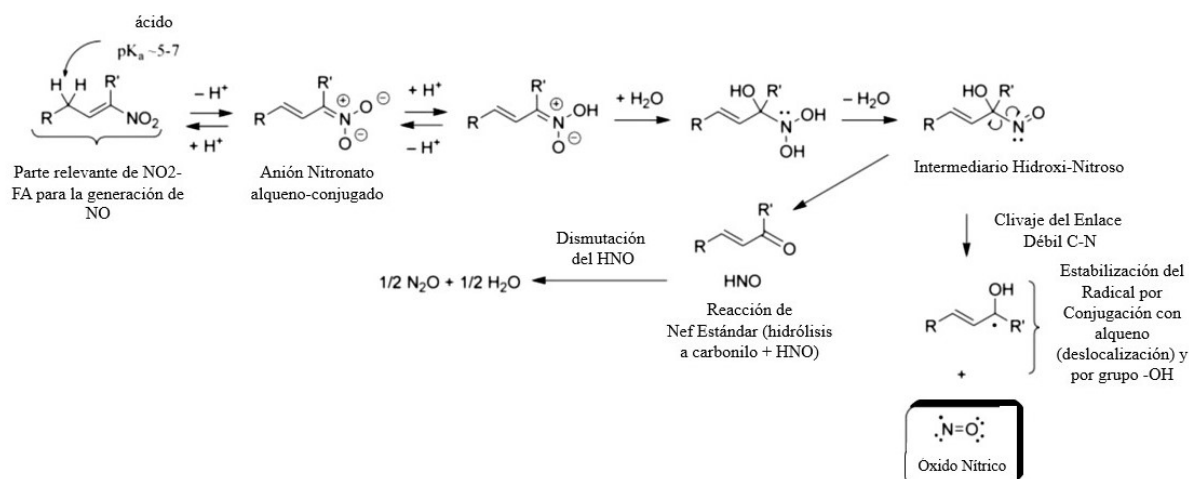


Figura 4- Esquema de mecanismo tentativo de reacción de liberación de óxido nítrico a partir de NO₂-FA, a través de una reacción de Nef modificada luego de la formación de un intermediario hidroxi-nitroso. Adaptado de (26).

Tabla 2- Resumen de organismos vegetales donde se encontró cada NO₂-FA, el método utilizado para detectarlos, la concentración (expresada por gramo de peso fresco) y su referencia.

NO ₂ -FA	Organismo y estadio	Método de detección	Concentración	Ref.
Ácido nitro-oleico (NO₂-OA)	<i>Olea europaea</i> (cultivar Picuar), cáscara de fruto	HPLC-ESI-MS/MS *Se detectó en forma de aductos NO ₂ -OA-Cys	50 pmol/g	(13)
	<i>Brassica napus</i> , semilla	LC-MS	1.6987 nmol/g	(27)
	<i>Brassica napus</i> , brote (2 días desde germinación)		0.3701 nmol/g	
	<i>Brassica napus</i> , brote completo (7 días desde germinación)		0.6622 nmol/g	
	<i>Brassica napus</i> , tallo de brote (7 días desde germinación)		0.3470 nmol/g	
	<i>Brassica napus</i> , raíz de brote (7 días desde germinación)		0.4260 nmol/g	
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , brote (14 días desde germinación)	MS/MS de infusión directa †	0.476 pmol/g	(28)
Ácido nitro-linoleico (NO₂-LA)	<i>Arabidopsis thaliana</i> , brote (14 días desde germinación)	MS/MS de infusión directa †	0.563 pmol/g	(28)
Ácido nitro-linoleico conjugado (NO₂-cLA)	<i>Olea europaea</i> , aceite extra-virgen	HPLC-MS/MS	N/D	(15)
Ácido nitro-linolénico (NO₂-LN)	<i>Arabidopsis thaliana</i> , brote (14 días desde germinación)	MS/MS de infusión directa †	1.945 pmol/g	(28)
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , semilla	LC-MS/MS	11.18 pmol/g	(16)
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , brote (14 días desde germinación)		3.84 pmol/g	
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , hoja (30 días desde germinación)		0.36 pmol/g	
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , hoja (45 días desde germinación)		0.54 pmol/g	
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cultivo celular en suspensión (9 días)		0.28 pmol/g	
	<i>Pisum sativum</i> , raíz	LC-MS/MS	0.072 pmol/g	(17)
	<i>Pisum sativum</i> , hojas		0.084 pmol/g	
	<i>Oryza sativa</i> , hojas		0.748 pmol/g	

† En estos casos las cuantificaciones se realizaron a partir de extractos de la fracción lipídica de las plantas analizadas.

La función de los NO₂-FA como reservorios de NO celular compite con la de reacción con nucleófilos blandos intracelulares, como los tioles de las cisteínas proteicas o tioles de bajo peso molecular, como el glutatión reducido (GSH) intracelular. Otros destinos, como la reacción con nucleófilos nitrogenados (como lisina y arginina), la reducción del

nitroalqueno a un nitroalcano, y la β -oxidación, entre otros, también son posibles dentro del ambiente celular (29).

Por más que los roles reguladores de los NO_2 -FA no se hayan elucidado aún por completo, se ha visto que al agregarle NO_2 -OA a una suspensión de células y a hojas de *Solanum lycopersicum* (tomate), y a hojas de *Arabidopsis thaliana*, se produce liberación de ROS en el citosol (medido a través del aumento de H_2O_2), gracias a la activación de la enzima NADPH oxidasa, lo que implica una entrada de Ca^{2+} desde el compartimento extracelular y la acción de proteínas-quinasas. La NADPH oxidasa se encarga de la liberación de ROS al apoplasto en presencia de patógenos, aunque también lo hace en determinadas etapas del desarrollo y ante estrés abiótico (30,31). Adicionalmente, se observó que se produce el cierre de los estomas de hojas y la inhibición del crecimiento de la raíz primaria en *Arabidopsis thaliana* (31,32), indicando un rol importante en la respuesta a posibles patógenos o estrés externo. Además, se han evidenciado instancias en las que NO_2 -FA actúan en cadenas de señalización que culminan en la activación de genes. Por ejemplo, el tratamiento con NO_2 -LN a plántulas de *Arabidopsis thaliana* indujo la expresión de genes de HSPs (proteínas del shock térmico), HSFs (factores de shock térmico), y proteínas de plegamiento de respuesta al estrés del retículo endoplásmico. Todas estas familias de proteínas están relacionadas a la resistencia al estrés térmico, al aclimatamiento de las plantas al calor, y a la respuesta a la intensidad de la luz, indicando otro posible rol de los NO_2 -FA como señalizadores en la respuesta al estrés (33).

1.3 La nitroalquilación de proteínas por NO_2 -FA

Una de las reacciones más estudiadas de la que pueden participar los NO_2 -FA es la nitroalquilación de residuos de cisteína proteicos presentes en proteínas de relevancia fisiológica y fisiopatológica, mediante una reacción de tiol-Michael formando un aducto, lo que se ilustra en la **Figura 5**. La reacción sucede mediante un ataque nucleofílico del tiol de la cisteína al carbono nucleofílico (C_β) del NO_2 -FA, formando un intermediario aniónico, que luego se protona.

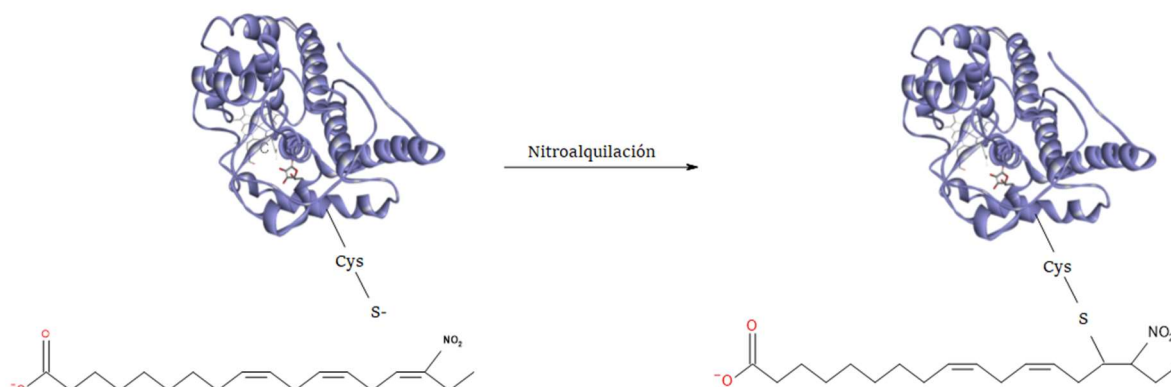


Figura 5- Esquema de la reacción de nitroalquilación, en la que la cisteína de una proteína (violeta) reacciona con el C_β electrofílico de un NO_2 -FA, para formar un aducto. Generado con BIOVIA Draw (9), estructura de la APX con DSV (34).

El proceso de adición nucleofílica es reversible, y, por lo tanto, a diferencia de muchas otras modificaciones postraduccionales, el aducto de tiol-Michael resultante de estas reacciones puede ser eliminado de las proteínas (5,35,36). La formación del aducto entre el NO₂-FA y las cisteínas proteicas, puede llegar a modificar su actividad. La reversibilidad de la nitroalquilación, sumada a la capacidad de los aductos de tiol-Michael de afectar la actividad catalítica de algunas enzimas, ha llevado a que se haya comenzado a considerar a la nitroalquilación como una vía de señalización regulada (37).

Además, se vio que los NO₂-FA también pueden formar aductos con otros nucleófilos proteicos, aunque sean más débiles que el tiolato (o tiol) de la cisteína. Por ejemplo, pueden reaccionar con el grupo imidazol de los residuos de histidina, o el grupo amino de los residuos de lisina, mediante una reacción de Michael, tanto en sistemas animales como vegetales (18,35).

Tanto en animales como en vegetales se ha estudiado la reacción de NO₂-FA con GSH, dada su importancia para el mantenimiento de la homeostasis redox de las células eucariotas. Respecto a los vegetales, se observó en células de tomate que se forma el aducto NO₂-OA-GS con una concomitante reducción de la concentración de GSH (38). Respecto a sistemas animales, aductos de NO₂-OA-GS y NO₂-LA-GS se detectaron en glóbulos rojos humanos sanos, causando además la migración del aducto hacia la membrana plasmática (35).

También se ha estudiado la interacción con cisteínas proteicas, principalmente en animales, como la formación de un aducto entre NO₂-OA y 6 de los residuos de cisteína de Keap1, un inhibidor de Nrf2, una proteína que, en condiciones normales se ubiquitina y degrada en el proteasoma. Sin embargo, cuando se forma este aducto se inhibe la degradación y se acumula Nrf2, que se transloca al núcleo, induciendo genes codificantes de antioxidantes (como las superóxido dismutasas, catalasas, peroxirredoxinas, entre otras) y enzimas detoxificadoras (como la NADPH deshidrogenasa quinasa-1 y la glutatión S-transferasa), que tienen el elemento ARE (del inglés *antioxidant response element*), en sus promotores (39-42). Se hablará de los sistemas enzimáticos antioxidantes celulares más a profundidad en la subsección siguiente.

Aunque el estudio de los aductos se haya centrado en los animales, también se han encontrado en vegetales. En frutos de olivo, se detectaron aductos entre el NO₂-OA y cisteínas proteicas (se analizaron proteínas hidrolizadas provenientes de todo el fruto, u órganos específicos como la cáscara y el mesocarpo, por lo que no se identificó una proteína ni un residuo específico de cisteína dentro de ellas) (15). Otro ejemplo de un sistema vegetal en el que se han evidenciado los aductos de tiol-Michael de los NO₂-FA con las cisteínas proteicas es el de la ascorbato peroxidasa (APX) de soja, una enzima de vital importancia para el metabolismo redox de las plantas, sobre la que se profundizará en las subsecciones siguientes. Mediante espectrometría de masas se evidenció la presencia de aductos de NO₂-LN, con cisteínas, histidinas y lisinas de la APX, causando una disminución de actividad que se atribuyó a la formación de estos, aunque aún no se ha explicado el posible mecanismo de la inhibición (18).

Además de poder afectar la actividad biológica de las proteínas, se ha planteado que los aductos de tiol-Michael también actúan como reservorios de NO₂-FA (36), liberándolos

al aumentar la concentración de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (RNS y ROS, respectivamente), cuando tanto las enzimas antioxidantes, como estos señalizadores pequeños, deberían aumentar su actividad (18).

1.4 El estrés oxidativo: ROS y mecanismos antioxidantes

Las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés, *reactive oxygen species*) son un conjunto de moléculas e iones moleculares que pueden ser radicalarios, pero no exclusivamente, que contienen oxígeno, y reaccionan fácilmente con los componentes celulares, oxidándolos (22,43). Qué tan reactivas son depende de la inestabilidad de cada especie (44). Un ejemplo de ROS son los oxígenos singuletes (como el $^1\text{O}_2$), que se generan cuando el O_2 gana energía y reorganiza sus electrones, pasando de un estado triplete de capa abierta, a un estado singulete de capa cerrada (44). Este puede generarse en el cloroplasto, gracias a la energía disipada en la captación de energía lumínica por las clorofilas (45). Otro ejemplo de ROS es el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que se obtiene cuando el oxígeno molecular gana un electrón (46,47). Un ROS no radicalario muy abundante es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una molécula de capa cerrada que puede formarse por la dismutación del superóxido u otros mecanismos. El peróxido de hidrógeno puede reaccionar por sí mismo, pero también puede dar lugar a oxidantes más fuertes al reaccionar con otros componentes celulares, por ejemplo, dando lugar a radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que pueden continuar reaccionando a través de distintos tipos de procesos químicos (44).

La producción de ROS es continua en la célula, ya que es una consecuencia de los procesos metabólicos de las mitocondrias, peroxisomas, cloroplastos, entre otros organelos (48,49). En condiciones de homeostasis, los mecanismos antioxidantes de la célula mantienen a las ROS a las concentraciones necesarias para que puedan actuar como segundos mensajeros y señalizadores, participando como factores de transcripción, comunicadores entre interior y exterior celular, entre otros (50).

Por otro lado, el exceso de estas especies en los compartimentos celulares produce daño en las biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos), que puede afectar la viabilidad de las células. Pueden producir peroxidación de lípidos (LPO), en la que se oxidan lípidos de la membrana celular y de los organelos, en su mayoría PUFAs, además dando lugar a nuevos radicales lipídicos, que pueden empeorar el estrés (51). Esto causa pérdidas de fluidez de la membrana, y que sea más permeable a moléculas a las que generalmente no lo es (52). También puede ocurrir la oxidación de proteínas, en la que algunos residuos se modifican covalentemente, en general de forma irreversible (53). Por ejemplo, una modificación común, que se utiliza como señalizador de oxidación proteica es la carbonilación de cadenas laterales, que involucra pérdidas de función y mayor degradación por el proteasoma (52,54). Las ROS también pueden dañar el ADN, modificando las bases nitrogenadas o el esqueleto azúcar-fosfato, provocando depurinaciones, desaminaciones, entrecruzamientos (*cross-linking*, en inglés) de hebras, entre otros (43,55). Esto puede traer errores en la replicación y en la transcripción, la introducción de mutaciones en el genoma y la activación de procesos de reparación celular que pueden causar la eliminación de partes de la secuencia nucleotídica (56–58).

El delicado balance necesario en las células en las concentraciones de ROS en las plantas es mantenido activamente por sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Algunos de los sistemas antioxidantes no enzimáticos incluyen la acción del ácido ascórbico (ASH), que actúa como cofactor en enzimas y cumple un rol vital en el ciclo del glutatión-ascorbato (GSH-ASH) (59–61). El ASH es capaz de actuar como reductor en varias reacciones, llevando a la formación de especies menos reactivas y más inocuas para la célula. Una es la de reducción del radical superóxido a radical oxhidrilo en las membranas celulares. Otra, la regeneración de otros sistemas antioxidantes, recuperando el α -tocoferol a partir de radical tocoferoxilo. El glutatión (GSH) también participa en sistemas antioxidantes no enzimáticos, estando involucrado en la expresión de genes relacionados al estrés, en vías metabólicas, eliminación de xenobióticos, entre otras funciones. La homeostasis redox de las células depende del balance entre el glutatión reducido y su forma oxidada (GSSG) (62–64). Otros antioxidantes no enzimáticos son: el ya mencionado α -tocoferol, que cumple su rol de *scavenger* en las membranas, gracias a su naturaleza lipídica, eliminando radicales que se generan como producto de la LPO (65,66); los carotenoides, con rol fotoprotector (67); los flavonoides, que neutralizan radicales y participan en la defensa contra fitopatógenos (68); y la prolina, que además de eliminar ROS formados en algunos tipos de estrés, como excesos de sales y metales, es un importante señalizador del estado redox de la planta, acumulándose en condiciones de estrés (69–72).

Dentro de los mecanismos antioxidantes enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa (SOD) [EC 1.15.1.1], que produce H_2O_2 a partir de radical superóxido, y necesita de un cofactor metálico, que puede ser un catión de cobre, zinc, manganeso o hierro (73,74) y las catalasas (CAT) [EC 1.11.1.6], que transforman el H_2O_2 en H_2O y O_2 , por lo que son vitales para el procesamiento del peróxido generado en procesos metabólicos esenciales como la β -oxidación de ácidos grasos (que se esquematiza en la **Figura 1**), el metabolismo de purinas, etc. (75). Adicionalmente, utilizan un grupo hemo como cofactor (76). Otros ejemplos son la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) [EC 1.6.5.4], que recicla el monodehidroascorbato de vuelta a ascorbato reducido, con NAD(P)H como donante de electrones (77,78); la glutatión deshidrogenasa (antes llamada dehidroascorbato peroxidasa, por lo que se la puede encontrar con el nombre resumido DHAR) [EC 1.8.5.1], que hace algo análogo, reduciendo el dehidroascorbato (DHA), utilizando el GSH como agente reductor (79); la glutatión S-transferasa (GST) [EC 2.5.1.18] y la glutatión peroxidasa (GPX) [EC 1.11.1.9], que utilizan el GSH para conjugarlo a xenobióticos electrofílicos, o para reducir el H_2O_2 y otros peróxidos, respectivamente (80,81).

Uno de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes en el citosol y cloroplastos de las plantas superiores, además de los antes mencionados, son las APX [EC 1.11.1.11], sobre las que se profundizará en la subsección siguiente (82).

1.5 Las ascorbato peroxidadasas (APX)

Las APX son una familia de enzimas hemo-peroxidadasas de clase I (83) presentes en plantas y algas eucariotas, que utilizan peróxido de hidrógeno y ascorbato como sustratos, para dar agua y monodehidroascorbato radical (84), que luego puede transformarse de vuelta en ascorbato gracias a la acción de una monodehidroascorbato reductasa. De estar ausente esta enzima, 2 radicales monodehidroascorbato pueden dismutar, dando ácido dehidroascórbico y ascorbato como productos. En la **Figura 6a** se muestra un esquema de la reacción catalizada por las APX. Todas las APX tienen un grupo protoporfirina IX como cofactor. Allí, el átomo de hierro, que se encuentra en reposo como Fe^{3+} , se encuentra tetracoordinado en posición ecuatorial (como se observa en el diagrama de la **Figura 6c**), mientras que un residuo de histidina ocupa el quinto enlace de coordinación, en posición axial. En algunas APX, como es el caso de la de soja, una molécula de agua puede ocupar el sexto enlace de coordinación como ligando axial (85).

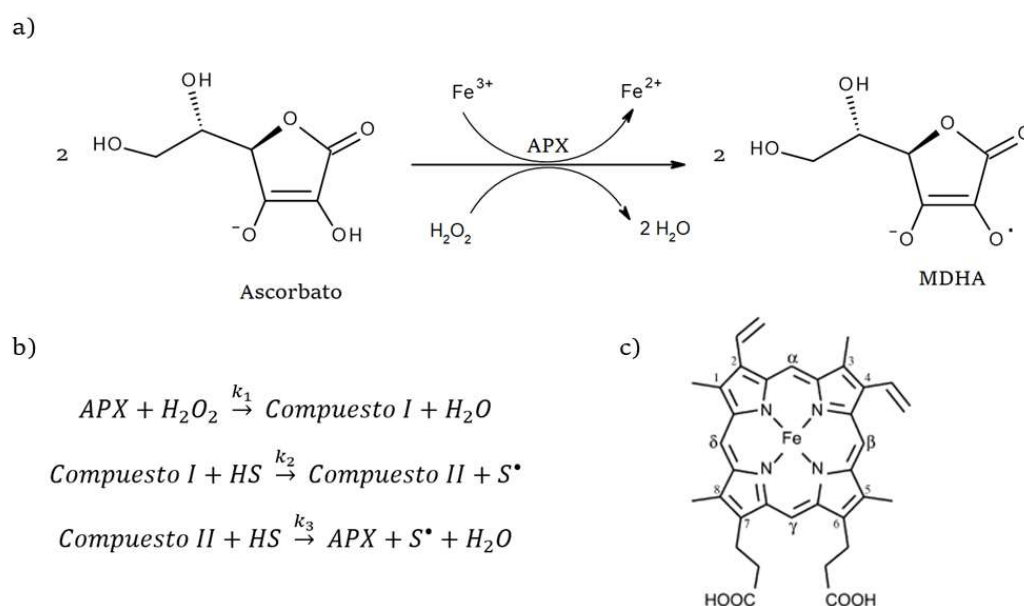


Figura 6- a) Esquema de la reacción catalizada por las APX. Generado en BIOVIA Draw (9). b) Resumen del mecanismo de la reacción, en la que HS=sustrato (ascorbato en el panel a)) y $\text{S}^\bullet$ =radical oxidado del sustrato (MDHA en el panel a)). c) Estructura de la protoporfirina IX, cofactor de la APX, marcando la nomenclatura de cada lado de la molécula. Paneles b) y c) adaptados de (85).

El mecanismo de la reacción catalizada por las APX, que se resume en la **Figura 6**, comienza con la oxidación del cofactor, para formar el Compuesto I, que contiene un radical centrado en la protoporfirina, con la concomitante reducción del peróxido de hidrógeno a agua. El Compuesto I luego es reducido, formando Compuesto II, y generando un sustrato radicalario oxidado (que en el caso del ascorbato corresponde al monodehidroascorbato). Por último, el Compuesto II reacciona con otra molécula de sustrato, para reducirse nuevamente y regenerar al grupo hemo, generando otra molécula de monodehidroascorbato y agua (85).

Además de encontrarse en plantas superiores y algas eucariotas, se ha detectado APX en Tripanosomas (86) y en el ojo bovino (87), enfatizando la importancia de la eliminación

del peróxido de hidrógeno mediante el uso del ascorbato como donante de electrones, a lo largo de la evolución de los eucariotas.

En los diferentes compartimentos celulares hay distintas isoformas de la APX presentes: hay algunas que se insertan en las membranas tilacoidales, microsomales y mitocondriales, las *tAPX*, *mAPX* y *mitAPX*, respectivamente. Otras, se encuentran en forma soluble, en el citosol (*cAPX*) y estroma del cloroplasto (*sAPX*) (88-94). Las APX tienen una alta afinidad por el ascorbato como donante de electrones, presentando K_D mucho menor que las CAT, que catalizan reacciones similares, pero tienen menor especificidad de sus sustratos (95,96).

Se conocen varios inhibidores de esta enzima, como el azida y el cianuro, que afectan la protoporfirina, y otros que modifican los tioles, como el p-cloromercuribenzoato y el ácido ditionitrobenzoico (96). Más recientemente, se ha descrito la formación del aducto de Michael de la cisteína de la APX con los NO_2 -LN como otro posible mecanismo de inhibición (18).

Las APX que se han estudiado a mayor profundidad incluyen las citosólicas de *Lathyrus oleraceus* (arveja), *Nicotiana tabacum* (tabaco), y la de *Glycine max* (soja). Inicialmente se comenzaron a estudiar gracias a su alta identidad de secuencia con una de las peroxidasas más estudiadas: la citocromo c peroxidasa (CcP), ya que se creía que podría presentar una catálisis similar a la de esta enzima, que forma un radical en un residuo de triptófano (Trp191) al generarse el Compuesto I (luego se observó que esto no ocurre en la APX, que forma el radical dentro de la protoporfirina como la mayoría de las otras peroxidasas conocidas, como se mencionó anteriormente) (85).

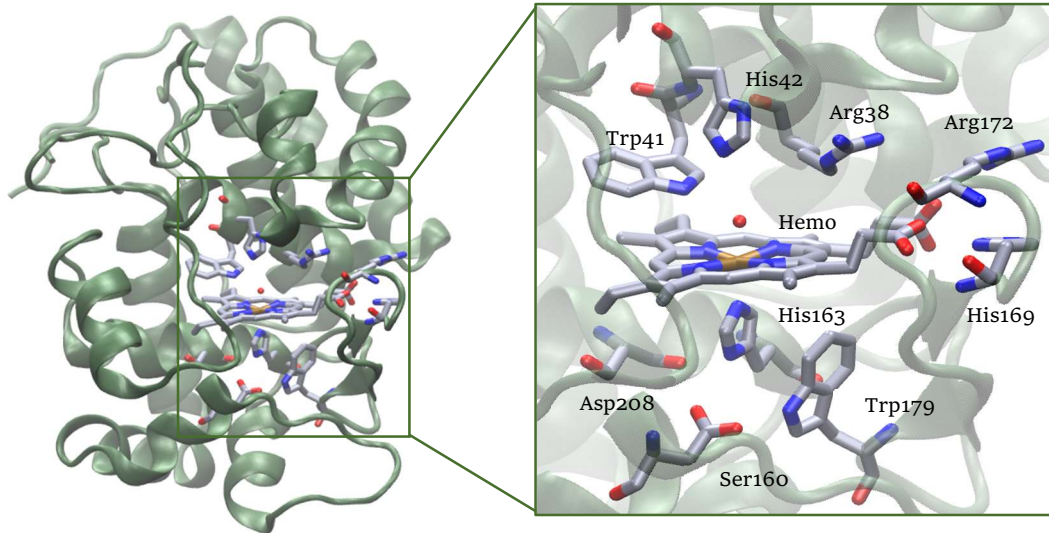
Particularmente la APX citosólica de la soja (*GmAPX*) es una enzima pequeña, de 250 residuos. Hay 33 estructuras experimentales de la *GmAPX* depositadas en el PDB (Protein Data Bank) hasta la fecha, de las cuales sólo 2 contienen al ascorbato unido, y 12 contienen mutaciones. Una de las primeras estructuras experimentales obtenidas de la *GmAPX*, depositada en el PDB con el código 1OAG es la que se utilizó en este trabajo, ya que además tiene una estructura hermana que surge de la misma publicación en la que la enzima se encuentra en complejo con el ascorbato (con el código 1OAF) (97). Respecto a su estructura secundaria, la *GmAPX* (1OAG) presenta un 47% de bucles, 41% de α -hélices, y tan solo 1% de hojas- β según el criterio de Kabsch y Sander (98).

En la **Figura 7a** se puede observar dónde se posiciona el grupo hemo, sobre la estructura de la APX (1OAG), destacándose los aminoácidos que interactúan con él según la literatura (97). Se puede apreciar que la APX citosólica de soja es una de las APX que tienen una molécula de agua coordinada con el átomo de hierro axialmente, mientras que la histidina que se coordina desde el otro lado del plano de la protoporfirina IX en este caso es la His163. Los propionatos de la protoporfirina interactúan con la His169 y la Arg172, siendo este último el único residuo que interactúa directamente con el hemo que también tiene un rol en la interacción con el ascorbato, cuando este se une.

En la **Figura 7b** se observa que el ascorbato se posiciona superficialmente sobre la proteína, pero de todas formas logra interactuar con una de las caras del grupo hemo. Además, a su alrededor se encuentra la Cys32, con la que no interactúa directamente,

pero su cercanía permite que modificaciones a este residuo puedan impactar el sitio de unión del ascorbato. Como se mencionó anteriormente, también interactúa con la Arg172, y la Lys30.

a)



b)

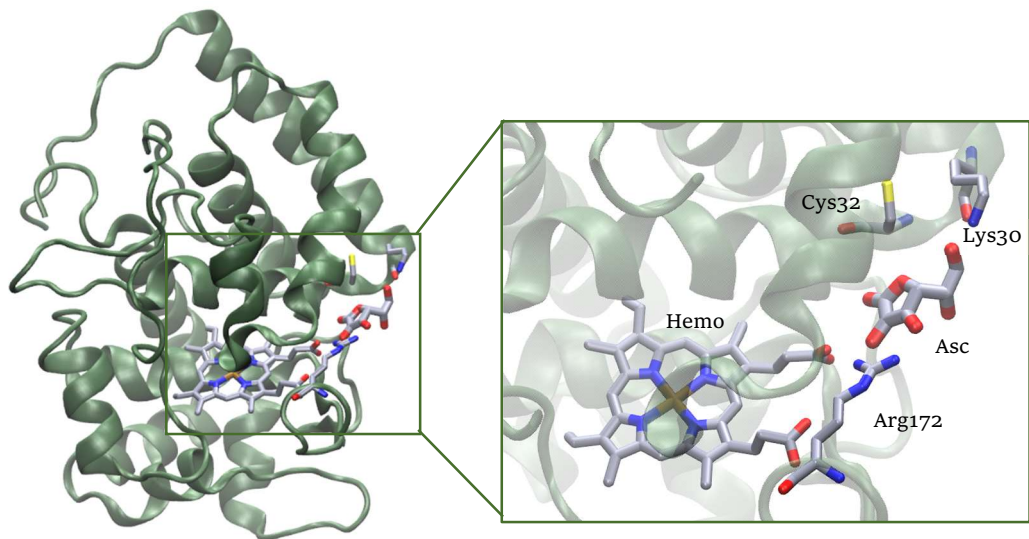


Figura 7- Estructuras cristalográficas de la APX en presencia/ausencia de ascorbato (Asc) mostrando sus estructuras 3D y entornos de interacción de a) el grupo hemo, sobre la estructura PDB:1OAG, y b) el ascorbato, sobre la estructura PDB:1OAF. Generado con VMD (99).

1.6 La importancia de los cultivos de soja en Uruguay y el mundo

La soja es una planta oleaginosa de la familia de las legumbres (100), cultivada para producir aceite a partir de sus semillas, aunque su alto contenido proteico también la hacen atractiva para otros productos, tanto para consumo humano como animal (100-102). Su cultivo ha aumentado en los últimos años, en 2009 llegando a ser el principal cultivo oleaginoso en el mundo, seguida de la colza, el algodón, maní, entre otros. (103).

Además, su simbiosis con las bacterias fijadoras de nitrógeno de la familia *Rhizobium* han permitido que se utilice en cultivos rotatorios para recuperar la tierra (101).

Alrededor del 85% de la soja producida mundialmente se cultiva en América, siendo los principales países productores Estados Unidos, Brasil, Argentina y China (104). En el Uruguay, la soja es el principal cultivo de verano de grano seco por superficie sembrada, con 82% de la superficie total de cultivos de verano en 2023 (1009899 hectáreas sembradas) (105). Sin embargo, aunque ha ido en aumento la superficie de soja cultivada en el país, la productividad (kg/ha) no ha aumentado como lo hizo en otros países. Por esto, se ha buscado mejorar las prácticas de manejo de los cultivos, y el mejoramiento genético de la planta (106,107).

Los diferentes tipos de estrés abiótico a los que se puede enfrentar la planta, como por la salinidad excesiva del suelo, por sequía, por temperaturas extremas, o por metales pesados, causan una mayor producción de ROS, y afectan el correcto desarrollo y crecimiento, muchas veces llevando a pérdidas importantes en los cultivos (108–112). Dado el rol central a nivel mundial y local del cultivo de soja, y el efecto que los sistemas de respuesta al estrés de la planta pueden tener sobre la productividad de los cultivos, es de vital importancia entender a fondo la regulación de estos sistemas. En este caso, el estudio de la inhibición de uno de los posibles mecanismos de regulación antioxidante, la APX, permite el acercamiento a uno de los mecanismos de la planta que puede ser un blanco interesante de mejoramiento genético.

1.7 Objetivos

Objetivo General: Contribuir desde el modelado y simulación computacional a la comprensión de la forma en que distintos ambientes locales (representativos de membrana celular y citoplasma) modulan propiedades fisicoquímicas de un conjunto de FA insaturados de 18C y sus derivados NO₂-FA presentes en plantas, aportando nuevo conocimiento del efecto que tiene sobre la estructura 3D, dinámica y reactividad de la APX la nitroalquilación del residuo Cys32 por NO₂-FA junto a la construcción de un modelo del mecanismo que conduce a dicha PTM.

Objetivos Específicos:

1. Caracterizar por modelado DFT/PCM las propiedades fisicoquímicas de 4 ácidos grasos FA (oleico, linoleico, linoleico conjugado y linolénico) y 14 nitroalquenos NO₂-FA derivados de los anteriores en medios de distinta polaridad, permitiendo examinar la modulación por parte del entorno en distintas dimensiones de comparación.
2. Caracterizar a nivel DFT/PCM el mecanismo de reacción de nitroalquilación de Cys por NO₂-LN empleando un modelo reducido que contenga los fragmentos esenciales responsables de la reactividad del NO₂-FA y siguiendo un mecanismo de ataque tipo tiol-Michael.
3. Determinar por simulaciones MD el efecto de la formación del producto de nitroalquilación en Cys32 por NO₂-LN sobre la estructura, dinámica y reactividad de la APX de la soja.

2. Metodología

2.1 Barrido de propiedades de NO₂-FA con la polaridad del medio y validación de modelos reducidos (RM)

Las estructuras de los 4 FA (OA, LA, cLA y LN) y sus 14 variantes nitradas se obtuvieron por optimización de geometría sin restricciones en diferentes entornos utilizando la teoría del funcional de la densidad (DFT) a nivel ω B97XD/6-31G(d) (113,114), empleando una grilla de integración ultrafina. La elección del funcional se debe a que ya se ha utilizado con éxito para describir reacciones de tiol-Michael, para las que se necesita incluir la dispersión (115). Para la descripción del medio se utilizó el Método de Continuo Polarizable (PCM) en su implementación IEFPCM (116), empleando radios de Bondi para la construcción de las cavidades (117) e incluyendo componentes no electrostáticas (cavitación, dispersión, repulsión) en el cálculo de energías y derivadas (118–120). La naturaleza de todas las estructuras obtenidas se verificó como puntos estacionarios en la superficie de energía potencial (SEP) mediante el análisis de los valores propios del Hessiano analítico al mismo nivel y condiciones de cálculo. Se empleó el software Gaussian 16 Rev. C.01 (121).

Los 6 medios empleados abarcan constantes dieléctricas en el rango de 2.3 a 78.4, como se muestra en la **Tabla 3**, para describir ambientes de diferente polaridad en los que se puedan encontrar estas moléculas en el ambiente celular, con el objetivo de evaluar cambios en su reactividad. El benceno ($\epsilon=2.3$) se utilizó como representante de un ambiente apolar de membrana, en la que los NO₂-FA se almacenan y no reaccionan, dada la similitud de sus constantes dieléctricas (122). Por otro lado, el agua ($\epsilon=78.4$), se utilizó como representante del citosol más polar, en el que estos compuestos reaccionan con la enzima citosólica. Los demás medios se eligieron por sus polaridades intermedias entre los dos extremos anteriores, con el objetivo de obtener un barrido de las propiedades de los (NO₂)-FA al variar la constante dieléctrica.

Tabla 3-Solventes utilizados en el barrido de propiedades de (NO₂)-FA, con sus respectivas constantes dieléctricas (ϵ).

Solvente	Agua	DMSO	Acetona	n-Octanol	Dietiléter	Benceno
ϵ	78.4	46.8	20.5	9.9	4.2	2.3

Los descriptores de reactividad utilizados para caracterizar las especies se definen en el marco del DFT Conceptual (123). A partir de aproximar la afinidad electrónica y el potencial de ionización mediante la energía de los orbitales KS de frontera LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), y HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*), respectivamente identificadas como ϵ_{LUMO} y ϵ_{HOMO} , (aproximación de orden cero) (123).

$$\text{Dureza global } (\eta) = \frac{\epsilon_{LUMO} - \epsilon_{HOMO}}{2} \quad \text{Ec. 1}$$

$$\text{Blandura global } (S) = \frac{1}{\eta} \quad \text{Ec. 2}$$

$$\text{Potencial Químico } (\mu) = -\frac{\varepsilon_{HOMO} + \varepsilon_{LUMO}}{2} \quad \text{Ec. 3}$$

$$\text{Electrofilia global } (\omega) = \mu^2 / 2\eta \quad \text{Ec. 4}$$

A su vez, a partir de un análisis poblacional NPA sobre un tratamiento NBO de Weinhold (124,125) se calcularon cargas atómicas y órdenes de enlace de Wiberg (WBI) (126).

A partir de los resultados obtenidos, se continuó el estudio únicamente con la familia de NO₂-LN, en agua y octanol como medios.

Se calculó la función de Fukui de ganancia electrónica f^+ (123,127), calculada como la sustracción de las densidades electrónicas de los sistemas de referencia (N) y con un electrón más (N+1), mapeada sobre la densidad electrónica del sistema de referencia, (con un valor de isodensidad de 0.0003 a.u.), graficándose sobre las estructuras optimizadas.

Esta función se calculó a nivel atómico para los C_β utilizando la carga atómica en los sistemas N y N+1. Estas últimas se obtuvieron mediante cálculos *single point* sobre la geometría del sistema de referencia:

$$\text{Fukui condensada de ganancia del } C_{\beta} (f_{C_{\beta}}^+) = q_{N+1} - q_N \quad \text{Ec. 5}$$

Adicionalmente, se calculó la electrofilia local del C_β de las especies de la siguiente manera:

$$\text{Electrofilia local } (\omega_l) = f_{C_{\beta}}^+ * \omega \quad \text{Ec. 6}$$

Luego de seleccionar 3 regioisómeros de NO₂-LN para caracterizar el mecanismo de reacción, se repitió el procedimiento descrito en 2.1 para la obtención de estructuras y propiedades de modelos reducidos (RM) representativos. Estos RM incluyen los átomos relevantes para la reacción, como se ejemplifica en la **Figura 8**. Con el fin de validar estos RM se compararon sus propiedades con las de sus respectivos modelos completos para asegurar que la reactividad y otras características relevantes se mantengan y se pueda modelar la reacción de forma precisa.

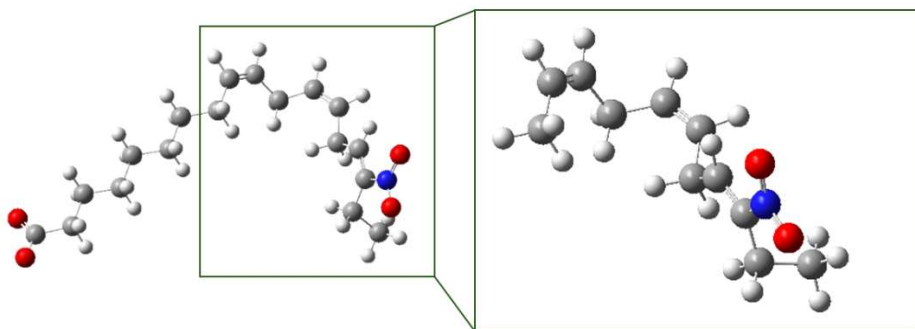


Figura 8- Molécula completa de 16-NO₂-LN (izquierda) junto con su RM (derecha). La caja verde muestra dónde se realizó el corte en la molécula completa. Se ilustra el 16-NO₂-LN, pero se realizó análogamente con los otros 2 regioisómeros estudiados.

2.2 Caracterización de mecanismos de reacción con los RM

Luego de validados los modelos reducidos de los 3 regioisómeros de NO₂-LN seleccionados, se modeló la reacción de nitroalquilación de la cisteína (en su forma tiolato), utilizando metiltiolato como modelo material de mínima para representar a esta última, habiéndose comprobado en una tesina de grado previa realizada en el mismo grupo de investigación (LQTC) que ésta es apropiada para representar las propiedades de la cisteína (128). La estructura del metiltiolato se obtuvo al mismo nivel y condiciones (en octanol y agua) descriptas en 2.1.

Se caracterizaron las estructuras geométricas de los estados de transición (TS), complejos de reactivos (RC) e intermediario aniónico (IA) para las 3 reacciones en ambos medios, siguiendo el mismo protocolo que en 2.1. Se obtuvieron caminos de reacción en coordenadas intrínsecas (IRC) que los conectan, utilizando el algoritmo HPC (200 pasos en cada dirección y un tamaño de paso de 0.03 Bohr) (129,130).

Se determinó la energética de activación y de reacción (la termoquímica se calculó a 298 K y 1 atm) usando la termodinámica estadística con las aproximaciones implementadas en Gaussian16 Rev. C.01.

Adicionalmente, se siguió la evolución de propiedades relevantes en la reacción y a lo largo del camino de reacción (distancias de enlace, ángulos diedros, cargas NPA de átomos participantes, y WBI de los enlaces C_α=C_β y C_β-S). Esto se realizó mediante 40 cálculos *single point* partiendo de estructuras provenientes del IRC, al mismo nivel de cálculo que en la subsección anterior.

Se calculó el grado de avance porcentual de la reorganización electrónica en las reacciones al llegar al TS, utilizando los valores de WBI para los enlaces C_α=C_β y C_β-S, de la siguiente forma:

$$\text{Grado de Avance (\%)} = \frac{WBI_{TS} - WBI_{RC}}{WBI_{IA} - WBI_{RC}} * 100 \quad \text{Ec. 6}$$

Donde WBI representa el valor de dicha propiedad para uno de los enlaces antes mencionados, para las diferentes especies.

Con esta información se eligió un único regioisómero de NO₂-LN para estudiar las características del aducto formado, como se describe en la siguiente sección.

2.3 Estructura y dinámica de APX y la reactividad de Cys32

Se obtuvo la estructura de partida de la APX citosólica de soja a partir de la determinación experimental de difracción de rayos X de resolución 1.75Å depositada en el PDB ID 1OAG (97). Se determinó el estado de protonación de los residuos a pH=7.4, representativo del citosol celular vegetal, con el servidor H⁺⁺ (131). Sobre esto se generó una estructura con la Cys32 como tiol (Cys32-SH) y como tiolato (Cys32-S⁻). Se agregaron los átomos de hidrógeno faltantes y se solvató el sistema con una caja de agua TIP3P (132) octaédrica truncada extendida hasta 12 Å alrededor de la proteína, neutralizando con iones K⁺ (representativo del interior celular), utilizando el módulo *leap* implementado en AMBER20 (133).

Los residuos proteicos se describieron utilizando el campo de fuerza AMBER ff19SB (134). El cofactor fue descrito con el campo de fuerza GAFF (135), utilizando los parámetros obtenidos por el grupo del prof. Estrin en la UBA (136,137). Las cargas para el residuo modificado en el aducto se generaron utilizando el protocolo RESP (138), y AMBER-parm99 (133,139) para los parámetros restantes.

Los 3 sistemas (APX con Cys32SH, Cys32S⁻ y con el aducto) se minimizaron por etapas utilizando el módulo Sander de AMBER20 (133), empleando 20000 pasos en total, de los cuales 10000 se realizaron con el algoritmo *Steepest Descent*, y los restantes con Gradiente Conjugado. Primero se minimizó aplicando restricciones sobre la proteína, con un potencial armónico de 10 kcal.mol⁻¹Å⁻² y luego eliminando las restricciones, liberando el sistema completo. Los sistemas se calentaron a 298 K durante 100 ps en un ensemble NVT, y el termostato de Langevin (140). Posteriormente se equilibraron durante 1 ns a 1 atm, en un ensemble NPT, y el baróstato de Monte Carlo (141). El tiempo de simulación fue de 500 ns, y realizados utilizando el módulo *pmemd.cuda* de AMBER20 (133), con un paso de integración de 2 fs limitando los enlaces que involucran hidrógeno con el algoritmo SHAKE (142). La temperatura se mantuvo a 298 K utilizando el termostato de Langevin, y la presión a 1 atm con el baróstato Monte Carlo.

El análisis de las trayectorias obtenidas se realizó con el módulo *cpptraj* de AmberTools21 (133). Se evaluó la convergencia de cada simulación mediante la evolución del RMSD de los carbonos α (C $_{\alpha}$). El RMSF de los C $_{\alpha}$ se utilizó como indicador de la flexibilidad de cada residuo en cada sistema.

Se estudió la red de enlaces de hidrógeno en torno a Cys32 en los 3 sistemas y el grado de exposición de este residuo en su forma Cys32S⁻/Cys32SH, utilizando el módulo *cpptraj* de AmberTools21 (133).

Las trayectorias de las 3 simulaciones se agruparon en 5 *clusters* cada una, mediante *clustering* jerárquico aglomerativo. Para análisis se consideraron las estructuras representativas de los clusters que tuvieran una presencia de 10% o más en sus respectivas simulaciones. Para el análisis de interacciones no covalentes, se consideraron únicamente las estructuras de los clusters más poblados para cada sistema.

Para estudiar la reactividad de la Cys32 en la APX, en sus formas Cys32S⁻ y Cys32SH, se realizaron cálculos *single point* ONIOM (143) a nivel ω B97XD/6-31+G(d):AMBER, sobre las estructuras representativas de la proteína obtenidas de los *clusters* con más de 10% de permanencia en cada simulación. La región QM se ubicó en todos los casos sobre la cadena lateral de la cisteína. El descriptor calculado para evaluar la reactividad fue la dureza global, como se describe en la **Ec. 1**.

3. Resultados y su discusión

3.1 Barrido de propiedades de NO₂-FA según la polaridad del solvente

Con el fin de evaluar los cambios en la reactividad de los NO₂-FA que pudieran suceder gracias al cambio en la polaridad del medio en el que se encuentran se estudió su dureza y su electrofilia. La dureza nos da un indicio de la reactividad general de las especies, pudiendo evidenciar las diferencias en esta que provoca la nitración, y además las posibles diferencias entre regioisómeros que se nitraron en carbonos diferentes. La electrofilia, por su parte, describe la aversez de una especie por los electrones, algo crucial para que se de la reacción de nitroalquilación, en la que, como se describió en la Sección 1.3, los NO₂-FA se comportan como electrófilos. La variación de ambas propiedades para todas las familias de NO₂-FA estudiadas, así como las de sus variantes sin nitrar, con la polaridad del medio se reportan en la **Figura 9**.

Allí, en el panel a), se observa que para todas las familias estudiadas se cumple que las especies nitradas presentan una menor dureza que los ácidos grasos sin nitrar, en todos los medios. Cabe destacar que los tioles celulares son especies blandas, por lo que una menor dureza de los ácidos grasos nitrados habla de una mejor compatibilidad entre ellos y el tiol de la cisteína de la APX para poder reaccionar.

Además, se observa que sí hay una modulación de la dureza por el solvente, en todos los casos aumentando en el rango de $\epsilon=2-20$, entrando en un *plateau* entre 20 y 78, que se aprecia mejor en la **Figura A1** del Anexo. Esto nos indica que el comportamiento de estas especies podría mantenerse si se los estudia en este último rango. Además, esto es lógico al pensar en que, en el contexto de las membranas celulares, donde estos compuestos se almacenan, serían menos reactivos, mientras que al ser extraídos de la membrana y entrar en el ambiente más polar del citosol podrían ser más reactivos (en el citosol es donde se da la reacción de nitroalquilación con la APX). Tanto al comparar los valores de dureza obtenidos para los regioisómeros dentro de cada familia, como comparando las familias entre ellas, se observa que presentan valores de dureza equivalentes, por lo que en principio todos son igualmente reactivos.

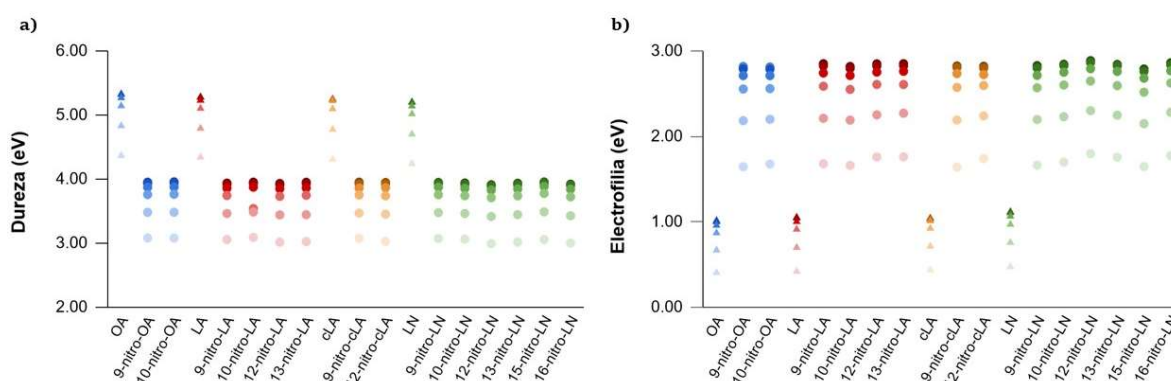


Figura 9- a) Dureza y b) Electrofilia de todas las especies estudiadas, con los NO₂-FA representados como círculos y los FA como triángulos. La polaridad del medio se representa a través de la intensidad del color (a mayor polaridad del medio, más intenso el color). Cada color corresponde a una familia: azul-oleico, rojo-linoleico, naranja-linoleico conjugado y verde-linolénico.

Al igual que para la dureza, al analizar la electrofilia se observa que esta varía de la misma manera con la polaridad de solvente, y que los valores se mantienen tanto dentro de cada familia, entre regioisómeros, como entre todos los estudiados. Igualmente se observa una leve variación entre los regioisómeros del ácido linolénico, lo que se observa claramente en la **Figura 9b** (y en la **Figura A2** del Anexo). En este caso se obtuvo que las especies nitradas son más electrófilas que las no nitradas, lo que era de esperar, gracias a la presencia del grupo nitro, que tiene una gran avidez por los electrones.

Se aprecia que la electrofilia presenta algo más de variabilidad que la dureza, especialmente en la familia de los ácidos linolénicos, pero de todas formas los cambios son mínimos. También se observa la gran separación de los puntos de color menos intenso (aumento grande de dureza/electrofilia que se observa en las **Figuras A1** y **A2**, y la superposición de los puntos de color más intenso (*plateau*)).

Luego de haber determinado que las familias tenían propiedades equivalentes, se decidió continuar trabajando con la del ácido linolénico, debido a que es con la que se reportan los aductos de tiol-Michael con la APX experimentalmente.

Además de utilizar la electrofilia global, se puede calcular la electrofilia local de cada átomo, sabiendo que el que ataca a la cisteína de la proteína es el C_β . La electrofilia local de este átomo en los regioisómeros de NO_2 -LN se estudió en benceno y en agua, los dos extremos del rango de dieléctricos utilizado en este trabajo. Esto se reporta en la **Figura 10**.

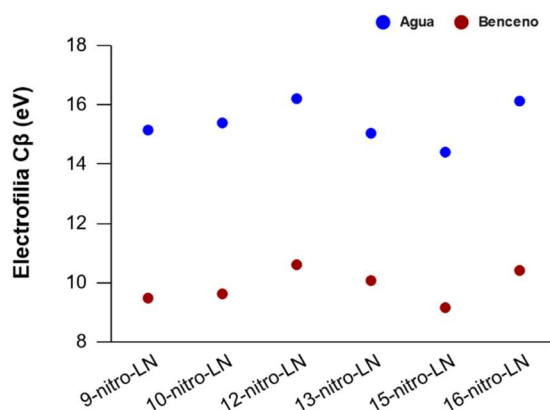


Figura 10- Electrofilia local del C_β de los regioisómeros del NO_2 -LN, en agua ($\epsilon=78.4$) y en benceno ($\epsilon=2.3$).

Se observa una clara disminución de la electrofilia en el benceno, en comparación con el agua. Este comportamiento nuevamente concuerda con el aumento de reactividad de estos compuestos al ser liberados al citosol, de constante dieléctrica mayor que el ambiente de membrana en el que se almacenan.

A diferencia de la electrofilia global, la electrofilia local del C_β sí presenta diferencias más marcadas entre regioisómeros, aunque con diferencias dentro del rango de 2 eV. En ambos medios estudiados los ácidos linolénicos nitrados en las posiciones 12 y 16 tienen los C_β más electrófilos. Centrándonos en el medio en el que ocurrirá la reacción (agua),

estos dos últimos regioisómeros son los de C_β más electrófilo, seguidos de los nitrados en posición 9 y 10, y por último los nitrados en posición 12 y 13, con el C_β menos electrofílico.

Teniendo en cuenta las variaciones mínimas de electrofilia local del C_β dentro de la familia de los NO₂-LN, se eligieron solamente 3 para continuar con el estudio del mecanismo de la reacción de nitroalquilación. Primeramente, se continúa estudiando 1 solo isómero de cada una de las 3 insaturaciones que contiene el LN, de forma de que quede contemplada la posibilidad de que la posición de la nitración sobre el LN afecte de alguna forma el mecanismo de la reacción. Entonces, se eligieron el 9-NO₂-LN, que se nitra en la primera insaturación del LN; el 13-NO₂-LN, que se nitra en la segunda; y el 16-NO₂-LN, que se nitra en la tercera y última insaturación. Estos regioisómeros, además, presentaron electrofilias locales del C_β levemente diferentes, como se mencionó anteriormente, encontrándose el 16-NO₂-LN entre los que tienen el C_β más electrófilo, el 9-NO₂-LN entre los de electrofilia intermedia, y el 13-NO₂-LN entre los de menor electrofilia del C_β. De esta forma, se incluye en el estudio del mecanismo de reacción de nitroalquilación todo el espectro de electrofilias del C_β dentro de la familia de los NO₂-LN, pudiendo evaluarse su efecto sobre la cinética de las reacciones obtenidas.

3.2 Validación de modelos reducidos de NO₂-LN

Para estudiar la reacción de nitroalquilación con la cisteína de la APX, se utilizaron modelos reducidos de los NO₂-FA, dado que el carboxilato y la cadena hidrocarbonada adyacente no participan en la reacción y aumentan el costo computacional. Para estudiar el mecanismo de la reacción, se eligieron los 9-, 13- y 16-NO₂-LN, como se explicitó anteriormente. Qué átomos de la molécula de NO₂-LN se incluyeron en los modelos reducidos se muestra en la **Figura 8**.

Para validar estos modelos reducidos (RM) se compararon las algunas de sus propiedades relevantes para la reacción con las de sus respectivos modelos completos. En la **Tabla 4** se recopilan propiedades relevantes para la reacción de nitroalquilación de los modelos completos y los reducidos, para los 3 regioisómeros estudiados.

Tabla 4- Comparación de propiedades moleculares (a.u.) y energías de orbitales de frontera (eV) para sistemas completos de NO₂-LN y sus RM.

Modelo de NO ₂ -LN	q NPA N	q NPA C _α	q NPA C _β	WBI C-N	WBI C _α =C _β	ε _{HOMO}	ε _{LUMO}
9-LN	0.525	0.067	-0.101	0.939	1.783	-8.67	-0.78
RM 9-LN	0.523	0.061	-0.105	0.937	1.780	-8.71	-0.82
13-LN	0.525	0.065	-0.099	0.935	1.786	-8.45	-1.29
RM 13-LN	0.526	0.066	-0.098	0.937	1.785	-8.91	-0.84
16-LN	0.523	0.072	-0.100	0.941	1.789	-8.66	-0.82
RM 16-LN	0.524	0.069	-0.106	0.935	1.791	-8.75	-0.82

Al comparar las cargas de los átomos relevantes para la reacción, como lo son el nitrógeno del grupo nitro (N), el carbono que sufre la nitración (C_α), y el carbono que va a reaccionar, sufriendo el ataque nucleofílico por parte del átomo de azufre de la cisteína (C_β), se ven diferencias mínimas entre los modelos, para todos los regioisómeros. Un comportamiento similar se observa en ambos enlaces estudiados, el C_α -N y el C_α = C_β . Respecto a la reactividad, se pueden comparar los valores de las energías de los orbitales de frontera, con especial relevancia del LUMO, dado que estos compuestos se comportarán como electrófilos en la reacción en estudio. Una menor energía del LUMO representa una mayor facilidad para aceptar electrones, en este caso siempre con valores negativos, lo que muestra la gran electrofilia de estas moléculas. En los 3 regioisómeros las energías de ambos orbitales de frontera se mantienen aproximadamente constantes entre los modelos completos y reducidos.

Además de calcular la electrofilia global de estas especies, se puede representar la avidez por electrones de forma gráfica, utilizando la función de Fukui de ganancia mapeada sobre una superficie de isodensidad electrónica, lo que se reporta en la **Figura 11**. Allí se evidencia que los RM de los 3 regioisómeros estudiados de NO₂-LN reproducen lo que se observa en sus sistemas completos: la mayor tendencia a la ganancia de electrones se encuentra localizada sobre el grupo -NO₂, seguida del C_β , que también presenta avidez por electrones (que era lo esperado para estas moléculas, y es especialmente importante en este caso ya que es este carbono el que hará de electrófilo en la reacción de tiol-Michael que se estudió en el objetivo siguiente).

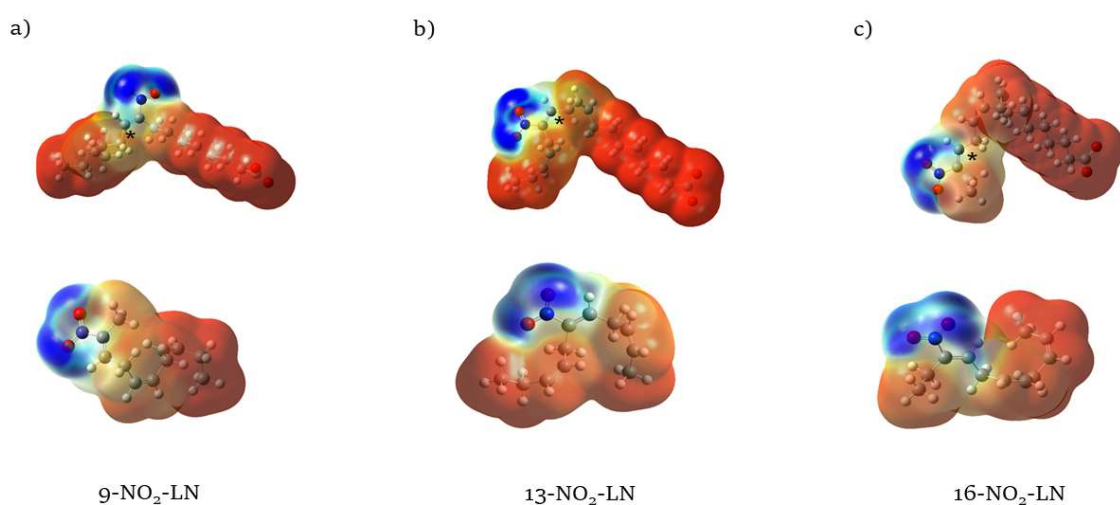


Figura 11- Fukui de ganancia mapeada sobre la densidad electrónica del estado basal de electrones para los modelos completos (arriba) y reducidos (abajo) de a) 9-NO₂-LN, b) 13-NO₂-LN y c) 16-NO₂-LN. Valores desde -1×10^{-5} (rojo) a 3.5×10^{-4} a.u. (azul).

Dado que los modelos reducidos de los 3 regioisómeros estudiados del NO₂-LN replican tanto propiedades globales, como locales, relacionadas a la reacción de interés, se considera que son apropiados para estudiar la reacción de tiol-Michael en lugar de los modelos completos.

3.3 Caracterización del mecanismo de reacción de nitroalquilación de Cys por NO₂-LN

Se caracterizó la reacción de nitroalquilación de las cisteínas por los 3 regioisómeros del NO₂-LN elegidos anteriormente, utilizando los RM de los mismos validados en el objetivo anterior y el metiltiolato (CH₃S⁻) como modelo reducido de la cisteína. Como se evidenciará más adelante, no se lograron obtener verdaderos RC para las reacciones de ninguno de los 3 regioisómeros de NO₂-LN estudiados, ya que todos presentaron una energía potencial levemente mayor a la de los reactivos separados al infinito (ver **Tablas A1** y **A2** del Anexo). Por este motivo, se presentan como RC las estructuras más estables que se encontraron para cada sistema, aunque no correspondan a verdaderos RC.

En la **Figura 12** se observan las estructuras obtenidas para RC, TS e IA para cada regioisómero en agua. Sus correspondientes en octanol son similares y se muestran en el Anexo (**Figura A3**). La flexibilidad de las cadenas hidrocarbonadas les permite plegarse para formar interacciones hidrofóbicas que estabilicen la especie, de diferentes formas según la posición del grupo NO₂.

Cabe destacar que para el caso del 13-NO₂-LN se exploró el ataque desde la otra cara del doble enlace C=C, lográndose obtener un TS, y generándose un camino de reacción IRC, pero no logrando encontrar un RC, por lo que se intentó con la cara que se muestra en la **Figura 12**. El ataque por esta cara en principio parecería tener más impedimento estérico, pero se termina logrando obtener un complejo de reactivos, en el que el metiltiolato logra tener un ángulo de ataque similar al de los demás regioisómeros. Debe tenerse en cuenta que la reacción de nitroalquilación que finalmente interesa abordar, en realidad ocurre en una cisteína proteica, que puede no tener la misma accesibilidad que el metiltiolato, dificultando que logre acomodarse correctamente.

El ángulo Φ , formado entre el doble enlace C_α=C_β y el átomo de azufre, es muy similar entre regioisómeros para cada estructura, y aumenta al formarse en enlace en todos los casos (ver **Figura 12**). Un Φ cercano al del RC fue vital para la obtención de las especies estables, y pequeñas variaciones en la estructura de partida causaban que no se obtuviera el complejo. Esto destaca la sensibilidad e importancia de este ángulo en esta reacción. En el caso de los regioisómeros 9- y 16- nitrados, el ángulo aumenta 15.8° y 17.1° entre el RC y el IA, respectivamente. En el caso del 13-NO₂-LN el ángulo aumenta únicamente 8.5°, lo que puede deberse a los impedimentos estéricos que se generan en este caso, como se mencionó anteriormente. Los regioisómeros del NO₂-LN no se diferenciaron únicamente en el aumento de este ángulo Φ al progresar la reacción, sino que, el 13-NO₂-LN presenta un valor aproximadamente 10° mayor a los otros dos en su RC. Este ángulo más abierto indica diferencias estructurales que podrían estar relacionadas a la energética desfavorable que se encontró para la reacción con este regioisómero más adelante en esta sección.

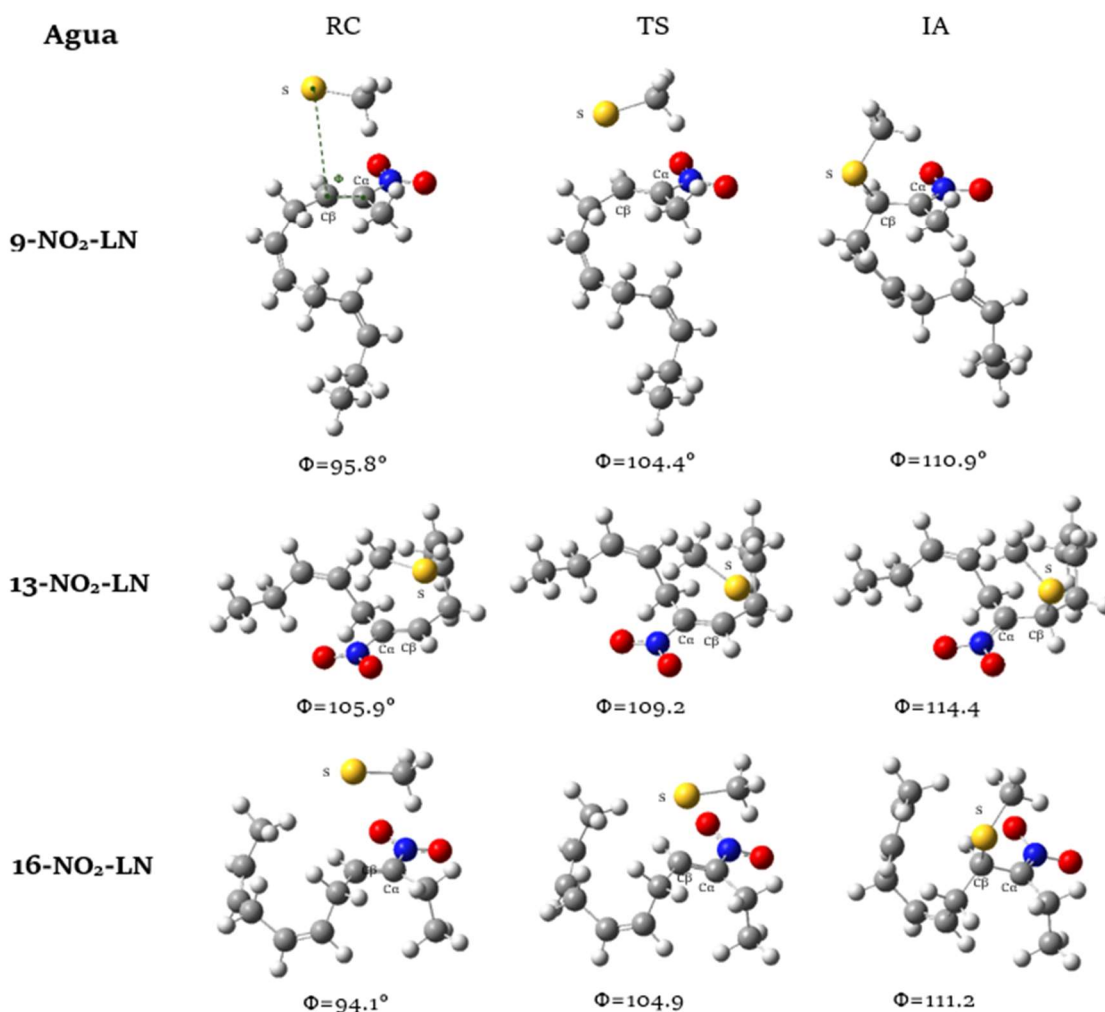


Figura 12- Estructuras de complejo de reactivos (RC), estado de transición (TS) e intermediario aniónico (IA) de la reacción de tior-Michael de los regioisómeros 9-, 13- y 16-NO₂-LN en agua. Para todas las estructuras mostradas se evidencia el valor del ángulo C_α-C_β-S (Φ), definido en la primera de ellas en verde.

En la **Figura 13** se muestran los caminos de reacción (IRC) obtenidos para cada regioisómero de NO₂-LN en agua (y sus respectivos gradientes en la **Figura A4** del Anexo) y la evolución de parámetros y propiedades de interés para la reacción. En particular las distancias entre el C_β y el azufre del metiltiolato, que forman un nuevo enlace; entre los C_α y C_β, cuyo doble enlace debe debilitarse para que pueda formarse el enlace nuevo ya mencionado; y entre el C_α y el nitrógeno del grupo NO₂. Se muestran en esta figura además las cargas NPA de los átomos relevantes: además de los anteriormente mencionados, se evalúa la de los 2 átomos de oxígeno del grupo NO₂. Por último, se evalúa el WBI del enlace en formación (C_β-S) y el doble enlace que se debilita (C_α=C_β), que permiten evaluar si los procesos de de formación y ruptura se dan de forma sincrónica. Estos mismos aspectos se estudiaron en octanol, obteniéndose resultados similares, que se muestran en el Anexo (**Figura A5**).

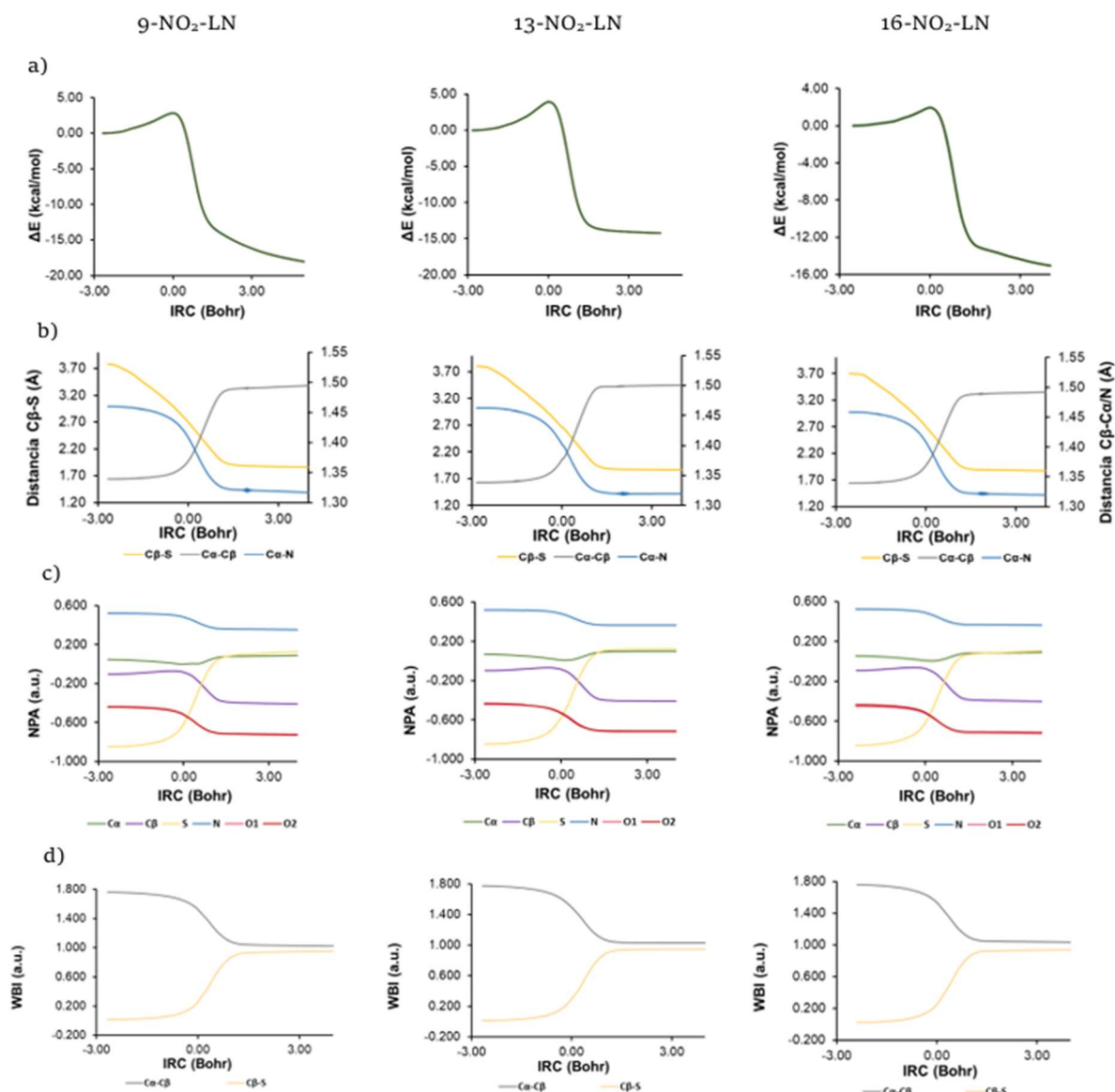


Figura 13- Para los regioisómeros 9-, 13- y 16-NO₂-LN con el agua como solvente se muestran a) Los caminos de reacción obtenidos para cada uno, b) Las distancias de los enlaces relevantes para la reacción, c) las cargas NPA para átomos relevantes, y d) WBI del enlace en formación (C_β-S) y del enlace que se debilita (C_α=C_β).

Se observa que en los 3 casos la distancia del enlace C_β-S se va acortando, a medida que se forma el enlace simple que daría lugar al IA. Como era esperado, también se alarga la distancia entre C_α=C_β, a medida que el enlace se debilita, pasando de 1.35 Å a 1.50 Å. A medida que se acorta la distancia entre el C_β y el S, también se alarga la distancia C_α-N, que va desde 1.32 Å a 1.45 Å. Esto puede significar que la densidad electrónica necesaria para formar el nuevo enlace no sale únicamente del doble enlace C_α=C_β, sino que hay otros enlaces en la molécula, como el C_α-N, que también pierden densidad al formarse el enlace nuevo.

Respecto a las cargas NPA, se observa que para todos los átomos del grupo NO₂ se reducen levemente en valor absoluto al avanzar la reacción, aunque el átomo de nitrógeno continúa siendo positivo, y los de oxígeno negativos. Globalmente, los dos átomos de oxígenos de este grupo se comportan de forma equivalente. La carga del C_β también disminuye al avanzar la reacción, a medida que forma su enlace con el átomo de azufre, cuya carga era negativa al comenzar la reacción (la carga del metiltiolato era -1 a.u. y se observa que el azufre contenía la mayoría de esa carga neta), y se vuelve positiva cuando el enlace nuevo se forma. El otro átomo que aumenta su carga al transcurrir la reacción es el C_α, aunque muy levemente. Esto se cumple para los 3 regioisómeros estudiados, con muy poca variación entre ellos, en ambos solventes.

Respecto a los WBI, se observa que la fuerza del enlace C_β-S aumenta al mismo tiempo que disminuye la del C_α=C_β, en concordancia con lo que se observó con las distancias de enlace.

Tabla 5- WBI (a.u.) de los enlaces C_α=C_β y C_β-S para RC, TS e IA de los 3 regioisómeros estudiados, junto con el grado de avance (GA) calculado a partir de cada uno.

Sistema	Solvente	WBI _{RC}	WBI _{TS}	WBI _{IA}	WBI _{RC}	WBI _{TS}	WBI _{IA}	GA	GA
		C _α =C _β	C _α =C _β	C _α =C _β	C _β -S	C _β -S	C _β -S	C _α =C _β	C _β -S
9LN	Agua	1,76	1,53	1,02	0,02	0,26	0,96	32%	25%
	Octanol	1,76	1,56	1,02	0,02	0,23	0,96	27%	22%
13LN	Agua	1,78	1,50	1,03	0,01	0,30	0,95	38%	31%
	Octanol	1,78	1,52	1,03	0,01	0,29	0,94	36%	30%
16LN	Agua	1,76	1,53	1,02	0,02	0,25	0,96	31%	25%
	Octanol	1,73	1,60	1,02	0,05	0,19	0,95	19%	15%

En la **Tabla 5** se reportan los grados de avance de las reacciones en ambos solventes, como se describió en la **Ec. 6**. En todos los casos, se obtiene un grado de avance mayor al llegar al TS en medio acuoso. También se observa que el enlace C_α=C_β se debilitó más en el TS, de lo que se formó el enlace nuevo con el azufre, por lo que en realidad la reacción es concertada y levemente asincrónica, ya que la formación y el debilitamiento no ocurren exactamente a la misma vez. Esto ocurre a ligeramente distintos niveles en las reacciones de los diferentes regioisómeros, observándose la mayor diferencia en los 9- y 13-NO₂-LN en agua (7%) y la menor en el 16-NO₂-LN en octanol (4%). Las reacciones de los 3 regioisómeros son más asíncronas en agua que en octanol, ya que la primera es más polar y favorece las separaciones de carga.

Respecto a la energética de la reacción, en la **Tabla 6** se reportan las energías de reacción y de activación calculadas para cada regioisómero en agua u octanol respecto a los reactivos separados al infinito. Allí se observa en base al ΔG de reacción, que las reacciones estudiadas son espontáneas, a excepción de la del 13-NO₂-LN en ambos solventes. Dentro de la precisión química no se observan diferencias significativas entre los ΔG_{rxn} al utilizar al octanol en comparación con el agua. De todas formas, dentro de cada solvente, el 9-NO₂-LN es el que tiene la reacción más exergónica, seguido por el 16-NO₂-LN, y por último el 13-NO₂-LN, cuyo ΔG es positivo en ambos casos.

Tabla 6- Energética de activación* y reacción (kcal/mol) para los 3 regioisómeros estudiados, en agua u octanol como solventes.

Solvente	Especie	$E_{\text{act}} + \text{ZPVE}$	$E_{\text{rxn}} + \text{ZPVE}$	$\Delta G_{\text{act}}^\dagger$	$\Delta G_{\text{rxn}}^\dagger$
Agua	9-NO ₂ -LN	4.8	-15.6	16.9	-2.7
	13-NO ₂ -LN	6.6	-10.9	19.5	2.0
	16-NO ₂ -LN	3.7	-15.0	16.4	-1.8
Octanol	9-NO ₂ -LN	2.4	-16.6	14.3	-3.7
	13-NO ₂ -LN	4.6	-11.4	17.4	1.6
	16-NO ₂ -LN	2.4	-15.7	15.4	-2.2

* Las energías de activación se calcularon respecto a los reactivos separados al infinito.

†Calculado a T=298K.

Los perfiles de reacción para las 3 especies en ambos solventes se muestran en la **Figura 14**. Tanto en términos de energía potencial como de energía libre de Gibbs, el 13-NO₂-LN muestra una energía de activación mayor y un producto menos estable que los demás regioisómeros, en ambos solventes. En agua, que es el medio de polaridad más similar al citoplasma, donde ocurriría la reacción de nitroalquilación, ocurre que el 9-NO₂-LN tiene una energía de activación similar a la del 16-NO₂-LN, pero este último tiene un producto más estable. Dados los ΔG_{act} obtenidos, se evidencia que la reacción de nitroalquilación es rápida, y se observa que la barrera es levemente menor en octanol que en agua.

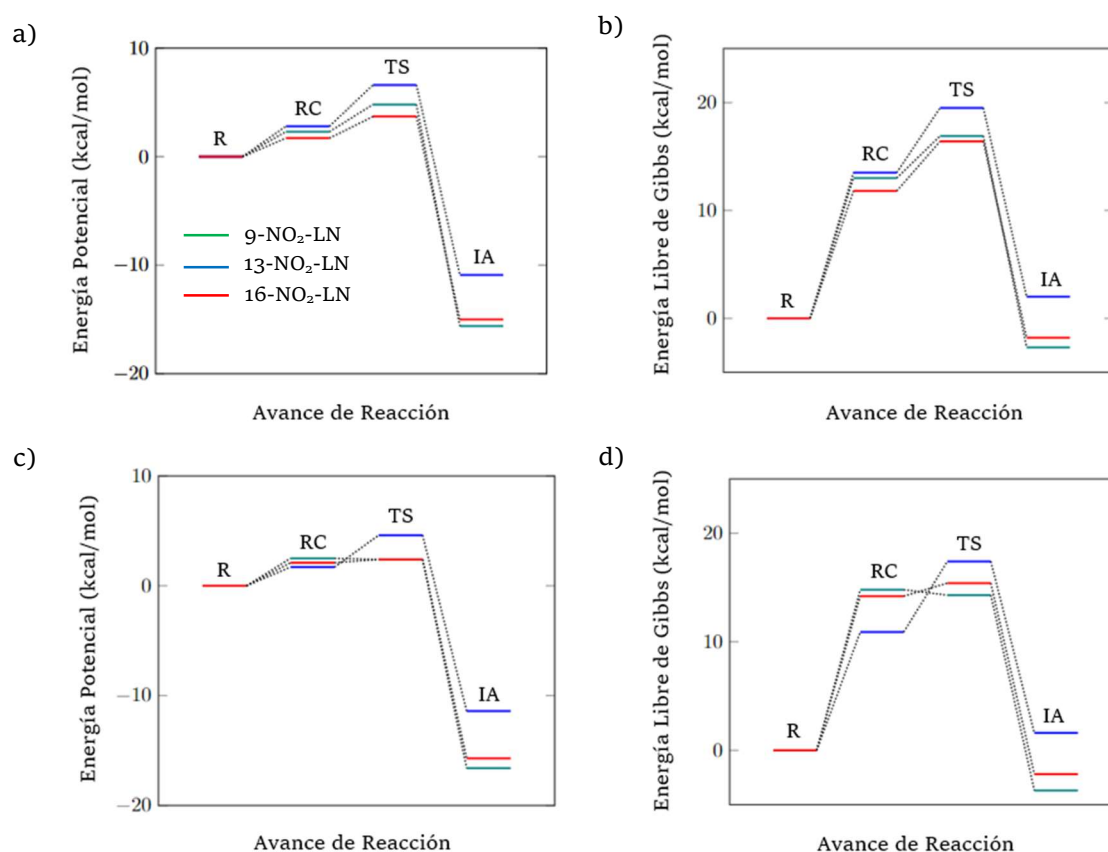


Figura 14- Perfiles de reacción de energía potencial y energía libre de Gibbs relativas para los 3 regioisómeros (9-NO₂-LN, 13-NO₂-LN y 16-NO₂-LN) en a-b) agua y c-d) octanol.

Integrando los resultados obtenidos hasta este punto, el 13-NO₂-LN es el regioisómero que presenta una energía de activación mayor y un producto menos estable, lo que se condice con la electrofilia menor de su C_β encontrada en el primer objetivo. Todo esto, sumado al ΔG positivo obtenido para la reacción en ambos solventes, indicarían que no es el regioisómero más indicado para estudiar la reacción. En cambio, las reacciones del 9-NO₂-LN y 16-NO₂-LN son exergónicas, y no presentan diferencias que marquen cuál es más adecuado para sufrir la reacción. Entonces, podemos pensar en los problemas estéricos que puedan surgir para que se dé la reacción de nitroalquilación con la cisteína de la APX. En el caso del 9-NO₂-LN, el C_β se ubica casi en la mitad de la cadena hidrocarbonada, de forma que, al formarse el aducto, debería plegarse con los dos extremos de la molécula hacia afuera, algo que puede no ser fácil desde el punto de vista estérico. En cambio, el 16-NO₂-LN tiene el C_β más cerca de uno de los extremos, siendo posible que los 2 carbonos que hay hacia ese extremo se logren ubicar hacia adentro de la proteína, y solamente tenga que salir el resto de la cadena hidrocarbonada hacia afuera, sin tener que plegarse como le pasaría al 9-NO₂-LN. Por esta razón, se utilizará el 16-NO₂-LN para la dinámica molecular formando el aducto de nitroalquilación con la APX, en la subsección siguiente.

3.4 Estructura y dinámica de APX y la reactividad de Cys32

Se verificó la convergencia de todas las simulaciones de 500 ns mediante el RMSD de los C_α de los residuos, que se reportan en la **Figura A6** del Anexo.

Las estructuras provenientes de las simulaciones se agruparon en *clusters*, de los cuales se consideraron los que tuvieran un 10% o más de presencia a lo largo de cada simulación. En el caso de la APX-Cys32S⁻ se obtuvieron 3 que cumplen este requisito, en el de la APX-Cys32SH 2 *clusters*, y para la APX-aducto 4 *clusters*. La prevalencia de cada *cluster* en las 3 simulaciones se reporta **Figura 15**.

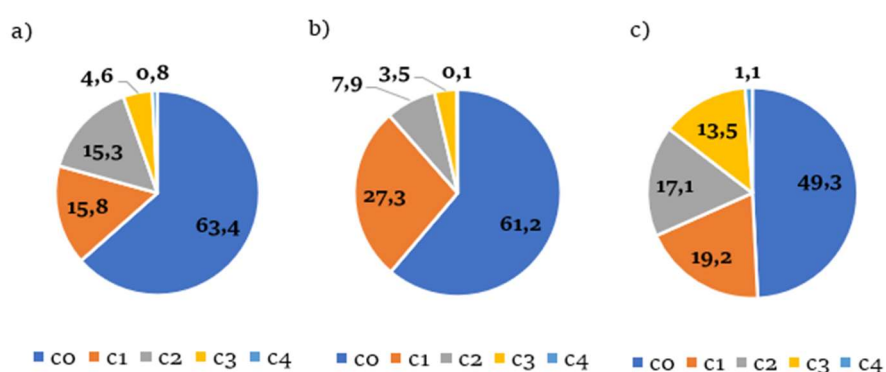


Figura 15- Porcentajes de prevalencia de *clusters* (co-c4) para las simulaciones de APX con su Cys32 a) Como tiolato, b) Como tiol, y c) Formando aducto con 16-NO₂-LN.

Considerando que el pKa de las cisteínas proteicas se suele encontrar en el rango de 5.0-8.0 (144), es de esperar que tanto la APX con Cys32S⁻ como con Cys32SH estén presentes en las células vegetales, dado que el pH de su citosol es generalmente 7.2-7.5 (145). El pasaje de tiol a tiolato puede ser uno de los puntos de regulación de la reacción de nitroalquilación u otras modificaciones de la Cys32, ya que, aunque no afecta la reacción catalizada por la APX en sí misma (dado que la Cys32 no es catalítica), su modificación postraducciona puede afectar la catálisis, como se discute más a profundidad al final de esta sección. Por estos motivos, se consideran ambas formas de la Cys32 en este estudio.

En primer lugar, se superpusieron las estructuras representativas de cada *cluster* para las 3 simulaciones, buscando identificar diferencias en las posiciones de los residuos cruciales para la catálisis o para la reacción de nitroalquilación, que se mostraron previamente en la **Figura 7**. Las superposiciones de las estructuras provenientes de las simulaciones con Cys32S⁻ y Cys32SH no mostraron diferencias en el posicionamiento de los residuos clave o del cofactor, y se muestran en la **Figura A7** del Anexo. Sin embargo, las estructuras provenientes de la simulación con el aducto mostraron diferencias significativas en el posicionamiento de la Cys modificada, dado que la cadena hidrocarbonada tiene una gran movilidad, como se ve en la **Figura 16a**.

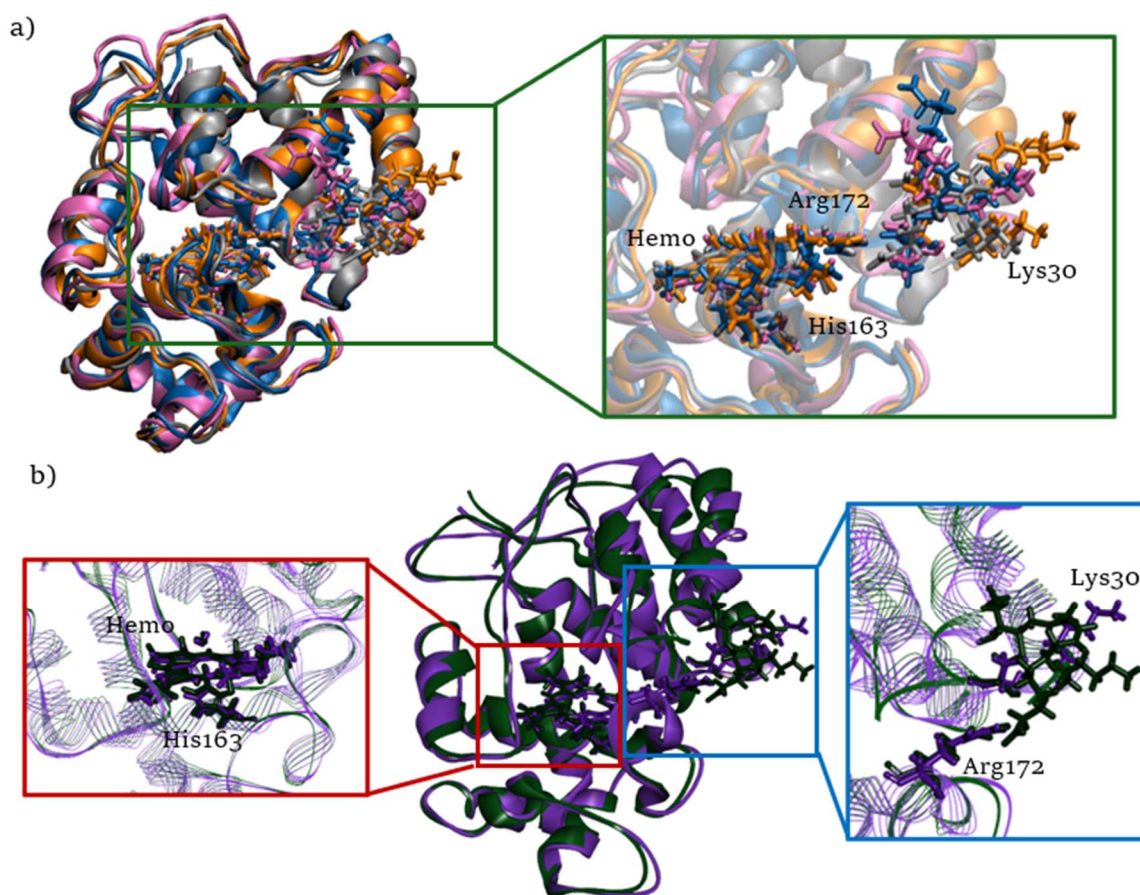
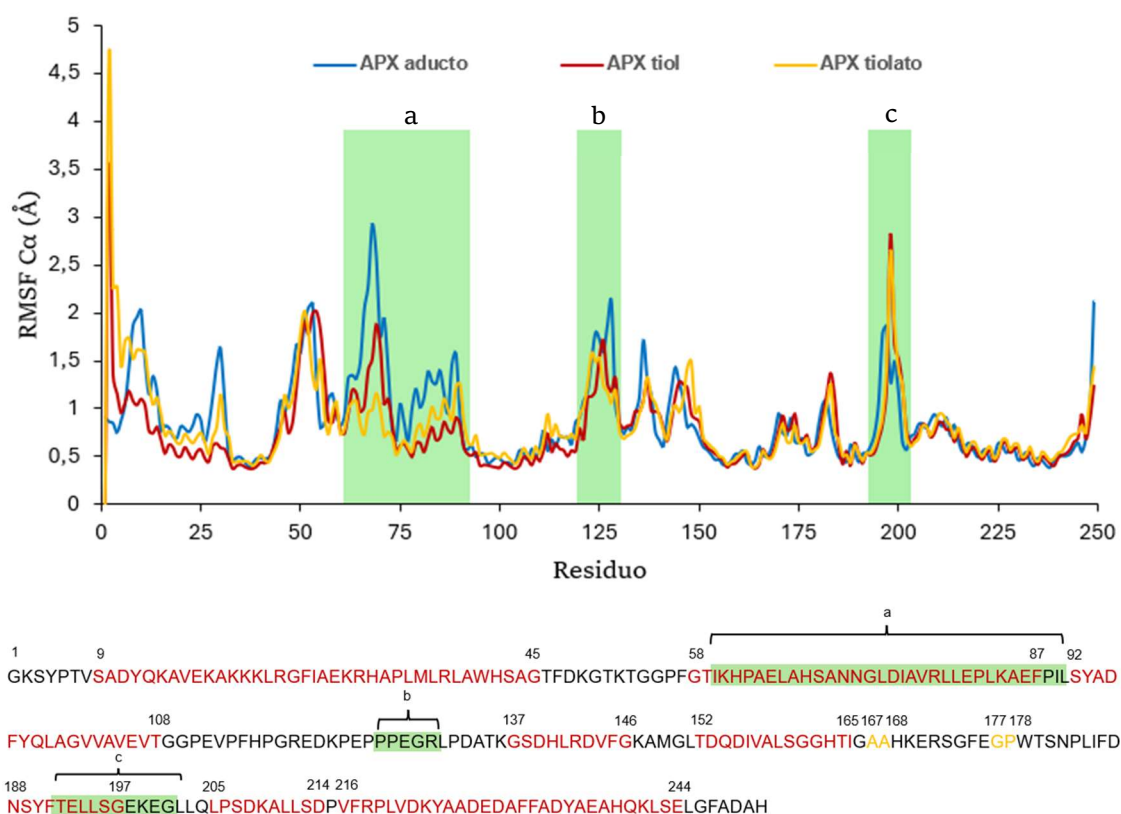


Figura 16- a) Estructuras superpuestas de *clusters* con más de 10% de permanencia para la APX con el aducto. En orden descendente de permanencia se colorea: plateado, rosado, azul y naranja. b) Superposición de estructuras de *clusters* más poblados de APX Cys32S⁻ (violeta) y con aducto (verde). Panel a) generado con VMD (99) y b) con DSV (34).

Se puede observar que tanto el cofactor como la His163 coordinada con el mismo mantienen su disposición en todas las estructuras. Respecto a la cisteína modificada, en el *cluster* con más permanencia se encuentra formando EdH con la Arg172 (que también se mantuvo en la misma posición en todas las estructuras) mediante su grupo carboxilato, mientras que en los 2 siguientes *clusters* con más permanencia lo hace mediante el grupo nitro. El aducto no se encuentra interaccionando con la Arg172 únicamente en el *cluster* con la menor permanencia de todos los considerados (13.5%).

Respecto a los cambios generados en la estructura de la APX al pasar de Cys32S⁻ al aducto, se aprecia que tanto el grupo hemo como la His163 se mantienen rígidos, al igual que la Arg172. En cambio, la Lys30 cambia significativamente su posición, viéndose desplazada por la larga cadena hidrocarbonada del aducto, que se pliega para interaccionar con la Arg172. Este cambio puede ser significativo, ya que es con estos 2 residuos que se han reportado interacciones con el ascorbato, para que este se mantenga unido a la enzima antes de sufrir la reacción catalizada por la APX.

La flexibilidad de los residuos de la APX a lo largo de las simulaciones se evaluó mediante el RMSF de los C_α, lo que se reporta en la **Figura 17**.



Se aprecia que no hay grandes cambios a nivel de la flexibilidad, aunque se ven cambios puntuales en residuos significativos. Se puede observar una levemente menor flexibilidad con la Cys32SH, que aumenta ligeramente al transformarse en Cys32S⁻. La flexibilidad es aún mayor cuando se forma el aducto, que puede plegarse y reorientarse para acomodarse en la solución, algo que se puede observar en la dinámica.

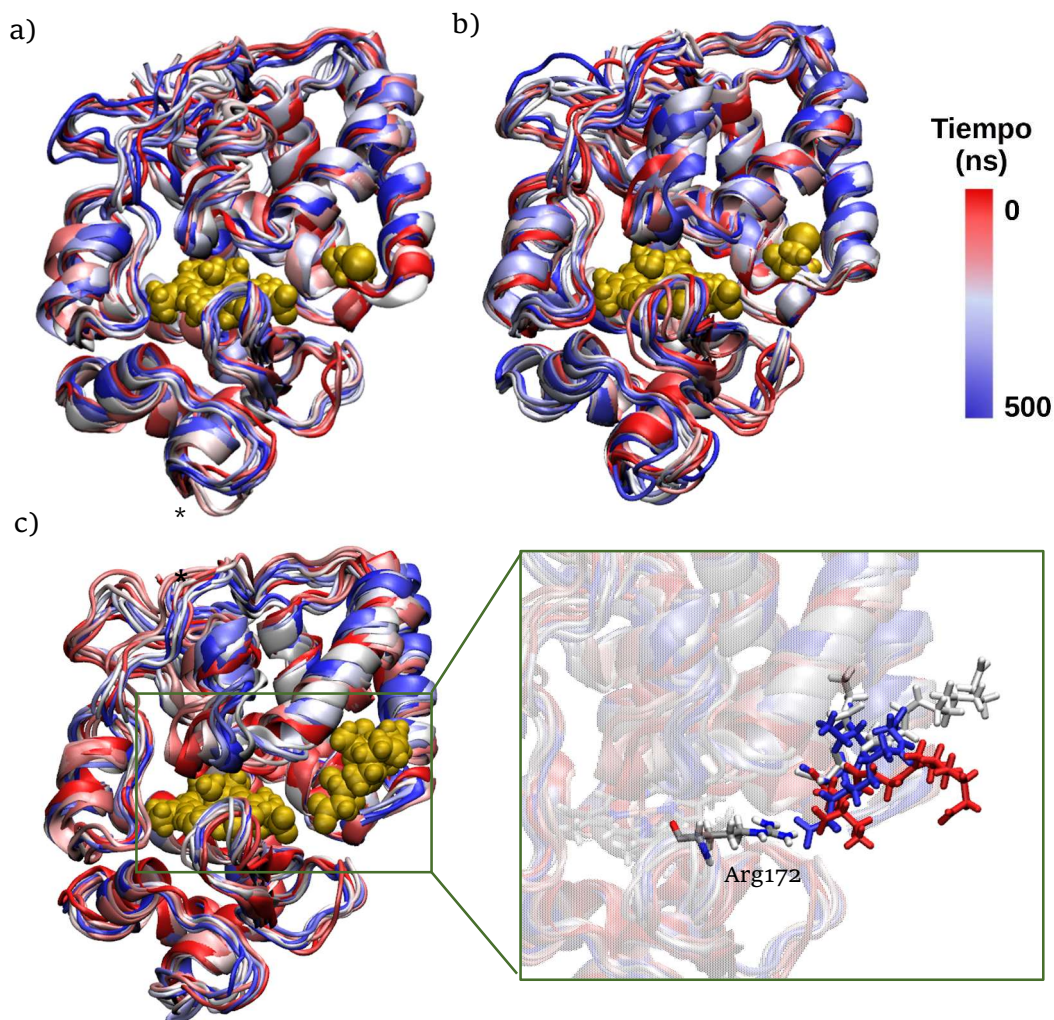


Figura 18- Evolución a lo largo del tiempo de la APX con su a) Cys32S⁻ b) Cys32SH y c) formando el aducto con 16-NO₂-LN, mostrando el grupo hemo y la cisteína/aducto en dorado. En d) se muestran 3 de las conformaciones adoptadas por el aducto Cys-16-NO₂-LN a lo largo de la simulación: rojo a 0 ns, blanco a 250 ns, y azul a 500 ns. Generado con VMD (99).

Además de analizar la flexibilidad de cada residuo en cada simulación, se puede observar cómo varió la estructura de la proteína con el tiempo, lo que se ilustra en la **Figura 18**.

Se observa cómo en las 3 simulaciones hay variaciones a lo largo de la dinámica en las regiones de *loops*, especialmente en los extremos terminales. El pico que se observa para las formas Cys32S⁻ y Cys32SH en el RMSF de los C_α alrededor del residuo 200 (**Figura 17**) corresponde a un *loop* que cambia su posición a los aproximadamente 250 ns, que se marca con un asterisco en la **Figura 18**. Tanto en la forma Cys32S⁻ como en presencia del aducto, hay 2 α -hélices que son móviles, y en el caso del aducto se puede observar que

ellas interactúan con el mismo en la primera mitad de la simulación, antes de que el ácido graso nitrado quede interaccionando con la Arg172 mediante su carboxilato, lo que sucede en la segunda mitad de la simulación y se mantiene en el tiempo. Esto se corresponde con el aumento en flexibilidad que se observó en el RMSF en los residuos 58-87. Hay una pequeña región, entre los residuos 45-57, que en la APX con su Cys32S⁻ toman la conformación de *loop*, pero en la forma Cys32SH y en el aducto forman una pequeña hélice.

El aducto de Cys32-16-NO₂-LN es muy flexible, y toma varias conformaciones a lo largo de la simulación. Como se observa en la **Figura 18**, en los primeros momentos interacciona con el solvente, luego plegándose hacia la proteína para interaccionar con las α -hélices antes mencionadas. Finalmente, en la segunda mitad de la simulación, forma una interacción con su grupo carboxilato con la Arg172, que se mantiene hasta el final de la dinámica. Antes de interactuar con este residuo mediante su grupo carboxilato, también se pueden ver interacciones con su grupo -NO₂, cuando no se encontraba tan plegado sobre sí mismo, al comienzo de la simulación, lo que ya se había evidenciado en las estructuras representativas de los *clusters* presentadas en la **Figura 16**.

Respecto a la exposición de la Cys32 respecto a las 2 formas presentes en equilibrio en la APX sin modificar, se evaluó la superficie de exposición al solvente (SASA) de este residuo para las simulaciones con Cys32S⁻ y Cys32SH, lo que se presenta en la **Figura 19**.

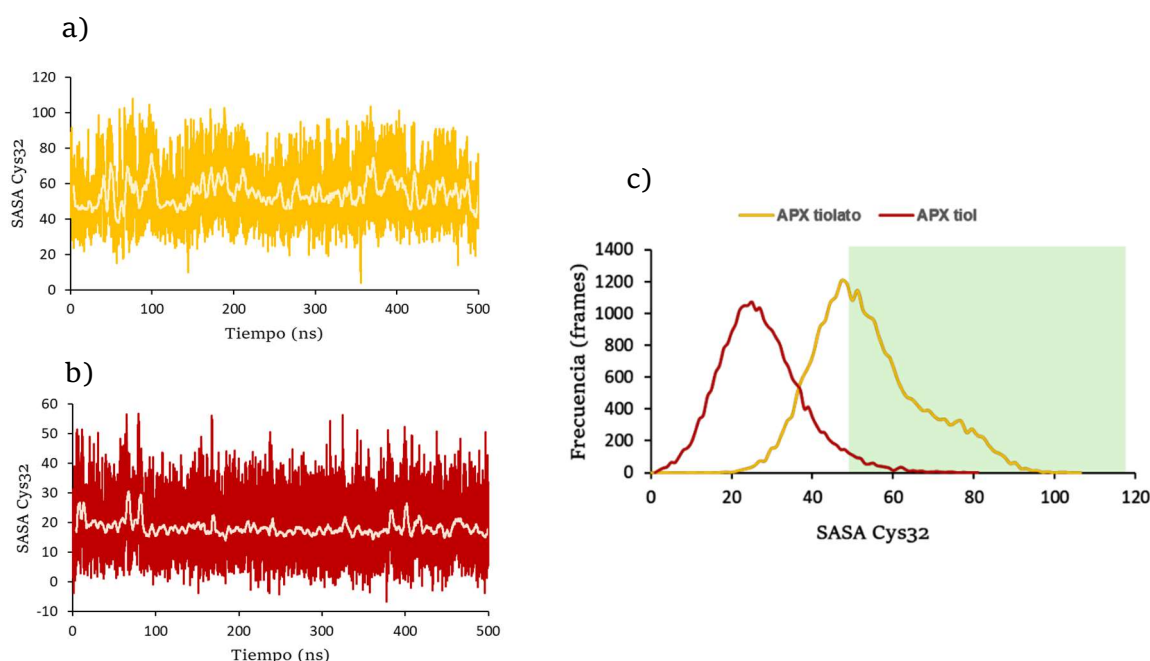


Figura 19- SASA de la Cys32 a lo largo de la dinámica para las formas a) Cys32S⁻ y b) Cys32SH. Se marcan las líneas de tendencia con media móvil, con período=20. c) Histograma de la exposición de la Cys32 para las formas tiolato (amarillo) y tiol (rojo). El área verde representa los valores en los que el residuo se considera expuesto.

Se observa que la exposición de la Cys32 es sensible al estado tiol/tiolato, encontrándose más expuesta en el primero. Esta exposición mayor de la cisteína haría más favorable su

reacción con el 16-NO₂-LN, que siendo voluminoso tendría dificultad para introducirse en la proteína (excepto que hubiera cambios conformacionales que lo permitiesen).

Tabla 7- Energías ONIOM para los orbitales de frontera KS y dureza para Cys32S⁻ Cys32SH.

Sistema	ϵ_{HOMO} (eV)	ϵ_{LUMO} (eV)	Dureza (eV)
APX Cys32S ⁻ c0	1.99	8.22	3.11
APX Cys32S ⁻ c1	3.15	9.53	3.19
APX Cys32S ⁻ c2	2.78	8.90	3.06
APX Cys32S ⁻ promedio*	2.31	8.55	3.12
APX Cys32SH c0	-4.82	5.55	5.18
APX Cys32SH c1	-3.49	6.73	5.11
APX Cys32SH promedio*	-4.41	5.92	5.16

*Los promedios son ponderados por el peso de cada *cluster*, considerando los de más de 10% de presencia para cada simulación.

Se comparó además la reactividad de la cisteína en sus 2 formas, utilizando ONIOM, cuyos resultados se reportan en la **Tabla 7**. Allí se aprecia que tanto observando el valor promedio para ambas simulaciones, como para todos los *clusters* individualmente se cumple que la Cys32S⁻ tiene una mayor energía de HOMO, por lo que es más nucleófila. Además, es más blanda que la forma Cys32SH, un comportamiento ya conocido para los tioles, que valida los resultados obtenidos en este cálculo. Teniendo en cuenta la mayor exposición y reactividad de la Cys32 en las estructuras con Cys32S⁻, es claro que la reacción de nitroalquilación se verá favorecida cuando se encuentra en esta forma.

Para las 3 simulaciones se estudiaron las redes de enlaces de hidrógeno alrededor de la Cys32 (o el aducto formado). Los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 8**.

Tabla 8- Red de EdH en el entorno de la Cys32 en todas sus formas estudiadas.*

APX	Residuo dador	Permanencia (%)
Cys32S ⁻	Met 36	18.9
	Leu 35	10
Cys32SH	Met 36	16.5
Cys aducto	Met 36	31.6
	Arg 31	69.5
	Ala 33	29.2
	Arg 172	80.6
	Arg 79	47.5

*Se reportan los EdH que tuvieron más de 10% de permanencia cada simulación.

Los enlaces de hidrógeno que se forman varían según la forma en la que se encuentra la cisteína, aunque era de esperar que el aducto formara una mayor cantidad de EdH dado su mayor tamaño y flexibilidad. En las 3 simulaciones se reportan únicamente EdH en los que la Cys32 actúa como aceptora, no encontrando EdH en los que fuera la dadora o puenteados por moléculas de agua en ninguno de los casos. Se observa que en las 3 simulaciones hay EdH con más de 10% de prevalencia con la Met36, siendo el único que sobrepasó este límite mínimo en el caso de la Cys32SH. En el caso de Cys32S⁻ solamente hay 1 EdH más que logró tener prevalencia, con la Leu35. Si bien estos residuos se encuentran cerca del sitio activo de la enzima, en principio no son residuos catalíticos ni se les destacó ninguna importancia particular. En cambio, cuando se forma el aducto se encuentran más EdH, con mucha mayor prevalencia, principalmente pero no únicamente con residuos de arginina. El residuo que destaca de esta lista es la Arg172, que es la que tiene una mayor prevalencia, llegando a aproximadamente 81%. Este residuo es interesante porque, como se ha destacado anteriormente, cumple funciones catalíticas, además de anclar al ascorbato para posicionarlo correctamente para que pueda reaccionar con el hemo. Justamente estas funciones las cumple mediante interacciones débiles, por lo que formando enlaces de hidrógeno con el aducto podría no llegar a cumplir sus funciones en la catálisis.

Al comparar las interacciones que se dan entre el ascorbato cuando este se une a la APX para reaccionar y las que forma el aducto, es preciso verificar que la estructura de la APX no cambia de forma significativa al unirse su sustrato. Para esto se superponen las estructuras hermanas de la APX de soja obtenidas a partir de Sharp *et al.*: una en complejo con el ascorbato (PDB ID 1OAF) y una sin él (PDB ID 1OAG) (97), lo que se reporta en la **Figura 20a**.

En la comparativa entre las estructuras cristalográficas, no se observan diferencias a nivel de estructura secundaria y terciaria, lo que nos permite sacar conclusiones sobre el posicionamiento del ascorbato, aunque no esté presente en las simulaciones. Dada esta similitud entre estructuras, se puede utilizar la estructura sin el ascorbato (1OAG) para considerar la inhibición causada por la nitroalquilación, sin perder de vista efectos que genere el ascorbato en la estructura proteica.

Habiendo considerado esto, se puede encontrar una similitud entre las interacciones que forma la enzima con uno de sus sustratos (el ascorbato) y con el aducto, cuando este último se pliega sobre sí mismo para interactuar con la Arg172. En la **Figura 20b** se comparan estas 2 interacciones.

Allí se observa la gran similitud entre el EdH generado entre el carboxilato del aducto y la Arg172, y entre el ascorbato y este mismo residuo. De esta forma, la formación del aducto en la APX no solamente desplaza un residuo clave para el anclaje del ascorbato (Lys30), sino que también ocupa el lugar que este tomaría dentro de la enzima, estableciendo EdH con el otro residuo de anclaje identificado en la APX.

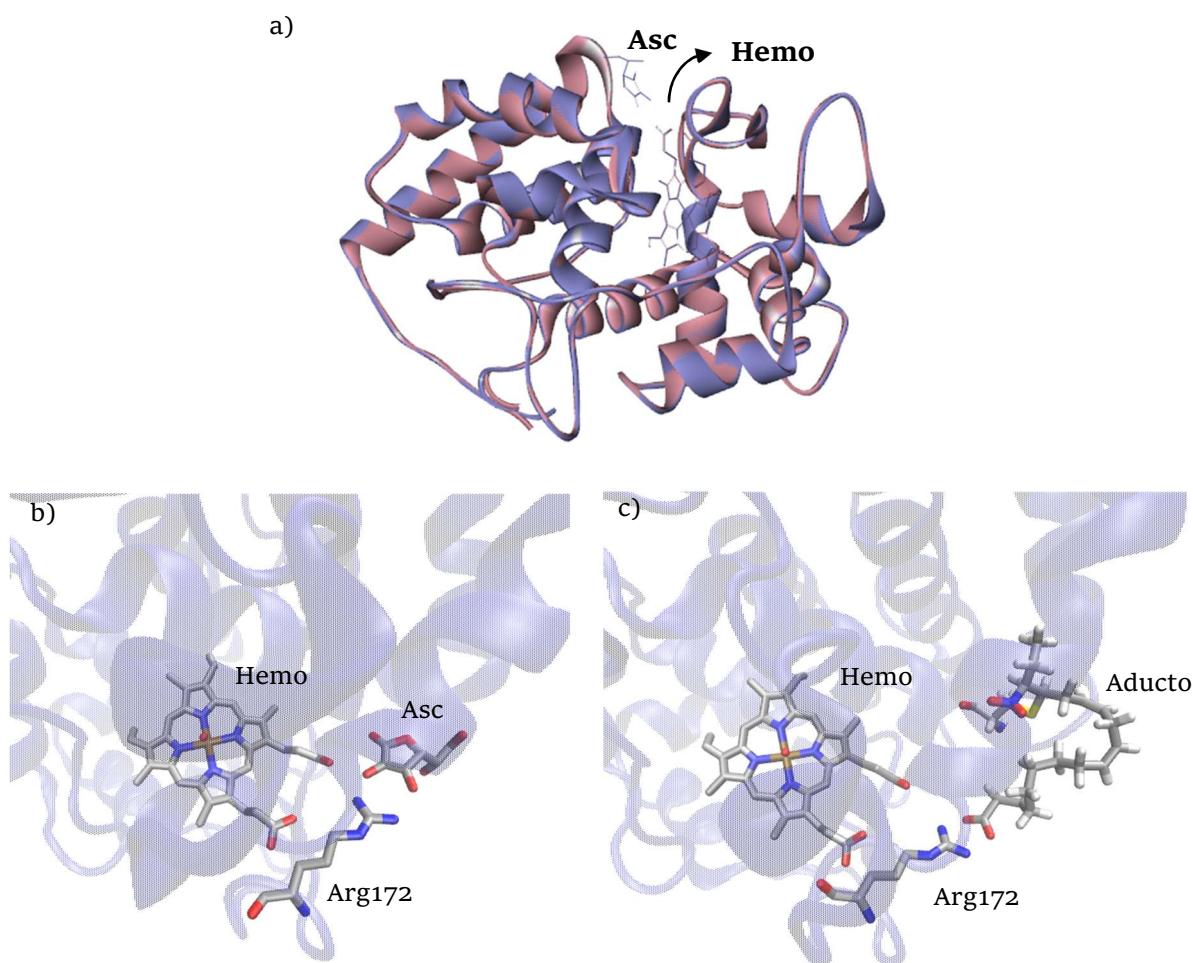


Figura 20- a) Superposición de estructura cristalográfica de APX con ascorbato (Asc) (PDB ID:1OAF), en violeta y sin él (PDB ID:1OAG), en rosado. Se representan en *sticks* el grupo hemo y el ascorbato. b) Interacción del ascorbato (Asc) con la Arg172, proveniente de la estructura cristalográfica depositada en el PDB ID 1OAF y c) Interacción del aducto de Cys32-16-NO₂-LN con el mismo residuo, proveniente de la estructura representativa del *cluster* más poblado de la simulación MD. Panel a) generado con DSV (34), paneles b) y c) con VMD (99).

Entonces, dado el gran tamaño del aducto, es posible que su mecanismo de inhibición de la actividad catalítica de la APX esté relacionado a ocupar el sitio por el que entra el ascorbato para reaccionar con el hemo (no solo gracias a sus interacciones con la Arg172, similares a las del ascorbato, sino también gracias al desplazamiento que genera de la Lys30), formando interacciones muy similares a la del ascorbato utilizando su grupo carboxilato y en ocasiones su grupo -NO₂. Que el aducto forme esta interacción, pero que también sea tan móvil y pueda interactuar con el solvente y con otros residuos más alejados del sitio activo, podría explicar por qué la formación de este aducto no inhibe totalmente la actividad de la enzima, sino que la disminuye. Esto también tiene sentido biológico, ya que al ser una de las principales enzimas de control del estrés oxidativo, no sería útil para la planta inhibirla totalmente, ya que, como se explicó anteriormente, constantemente se están generando especies reactivas del oxígeno por el mismo metabolismo de la planta, que deben ser correctamente eliminadas para mantener la homeostasis.

4. Conclusiones y perspectivas

Se logró determinar que las propiedades de los NO₂-FA no varían significativamente con el sitio de nitración dentro de una misma familia, y tampoco lo hacen entre las familias estudiadas (OA, LA, cLA y LN), por lo que no se encontró que alguno de los regioisómeros o alguna de las familias sea más propensa a sufrir la reacción de nitroalquilación. Los NO₂-FA son más electrofílicos y más blandos que sus variantes no nitradas, como se esperaba, considerando la incorporación del grupo -NO₂. Sin embargo, sí se detectó una disminución de la reactividad (evaluada mediante los descriptores de electrofilia global y electrofilia local del C_β) al disminuir la polaridad del medio, representada por solventes de menor constante dieléctrica. Esto es coherente con lo que se conoce sobre los NO₂-FA dentro del medio celular: se almacenan en las membranas celulares, en las que la constante dieléctrica es baja, de forma que allí no reaccionan; pero cuando se liberan de las membranas al citoplasma, de mayor constante dieléctrica, reaccionan y así realizan sus roles de señalización en las vías del estrés. Esta correcta representación del comportamiento conocido de estas especies valida los modelos utilizados para los NO₂-FA, lo que nos permitió avanzar hacia la caracterización del mecanismo de la reacción de la nitroalquilación con la familia seleccionada: NO₂-LN.

Dentro de esta familia se validaron los modelos reducidos que solamente incluyen las insaturaciones dentro de la cadena carbonada, eliminando el carboxilato y la cadena hidrocarbonada adyacente, que no participan en la reacción; ya que lograron replicar correctamente los descriptores de reactividad respecto a sus modelos completos, por lo que se los puede utilizar para describir la reacción de nitroalquilación. Sin embargo, habiendo evidenciado el posible rol del grupo carboxilato posteriormente, en las simulaciones de MD, podría ser de interés el modelado de la reacción utilizando los sistemas completos.

Respecto a la reacción de nitroalquilación, se lograron encontrar TS e IA para los 3 regioisómeros elegidos de NO₂-LN, en agua y octanol, aunque no se encontraron RC verdaderos, con menor energía potencial que la de los reactivos separados al infinito. A pesar de esto, trabajando con los sistemas encontrados de menor energía potencial como "RC", se lograron obtener caminos de reacción que conectaran estas especies para los 3 regioisómeros en ambos medios, entre los cuales no se encontraron diferencias mayores, aunque las reacciones son levemente más exergónicas en el octanol que en el agua.

Se identificó el ángulo Φ , formado entre el doble enlace C_α=C_β y el átomo de azufre, que resultó ser de vital importancia para lograr encontrar las estructuras de los TS, obtener los caminos de reacción IRC, y las estructuras de las especies estables identificadas como RC e IA. Esta información podría facilitar el estudio de la reacción de nitroalquilación con otros regioisómeros del NO₂-LN, e incluso con otros NO₂-FA.

Se determinó que la reacción es levemente asincrónica, con la ruptura del enlace C_α=C_β avanzando aproximadamente 5% más rápido que la formación del nuevo enlace C_β-S. Respecto a la energética de la reacción, se confirmó que las leves diferencias en electrofilia local del C_β de los NO₂-LN encontradas previamente sí culminaron con diferencias en las energías de reacción y activación, cumpliéndose que el regioisómero con el C_β menos electrofílico (el 13-NO₂-LN) también fue el de mayor energía de

activación y el que dio un producto menos estable. Considerando la energética de la reacción, y propiedades estéricas de los regioisómeros, se eligió el 16-NO₂-LN como el más adecuado para la formación del aducto con la APX, ya que, aunque su energía de activación fue similar a la del 9-NO₂-LN, y este último tiene un producto levemente más estable, la proximidad del grupo nitro a uno de los extremos de la cadena hidrocarbonada en el 16-NO₂-LN permitirían una acomodación más fácil sin tener que plegarse en forma de herradura para formar el aducto con la Cys32 de la APX, como sucedería con los otros 2 regioisómeros estudiados.

Respecto a las simulaciones moleculares, se lograron obtener dinámicas de 500 ns de la APX de soja con su Cys32 como Cys32S⁻ y como Cys32SH, incluyendo a su cofactor, aportando una primera visión acerca de su movimiento y cambios de conformación a lo largo del tiempo. Además, se obtuvo mediante MD la primera estructura del aducto entre la APX y el 16-NO₂-LN, generándose parámetros para describir al aducto 16-NO₂-LN-Cys32 correctamente. Las simulaciones permitieron evidenciar que la inhibición no se da mediante movimiento ni interacción con el cofactor, ni la His163 que se encuentra coordinada a él, ya que se observó que ambos tienen muy poca movilidad en todas las simulaciones, y que el aducto no interacciona directamente con ellos.

Sin embargo, la comparación estructural de la APX con su Cys32S⁻ y con el aducto permitió evidenciar el diferente posicionamiento de la Lys30 en ambas estructuras, un hecho de vital importancia, dado el rol de anclaje del ascorbato que tiene este residuo.

Además, la simulación de la APX con el aducto permite predecir un posible mecanismo de inhibición parcial de la enzima, en el que el carboxilato o el grupo nitro del ácido graso nitrado interacciona con la Arg172, mediante enlaces de hidrógeno con los mismos átomos con los que interacciona el ascorbato, el sustrato de la enzima, de esta forma impidiendo su unión y disminuyendo la catálisis. Además, la permanencia de los EdH entre el aducto y la Arg172 es de 80% a lo largo de la dinámica, lo que está en concordancia con la disminución de actividad de la APX en presencia de NO₂-LN evidenciada experimentalmente, que no fue del 100%, pero sí fue considerable. Esto también es coherente con el rol biológico de la enzima, que, dado su rol antioxidante, no debería inhibirse totalmente, ya que hay especies reactivas del oxígeno que se generan endógenamente de forma constante que requieren que la actividad de la enzima no sea cero.

Entonces, el desplazamiento de la Lys30 de su sitio en el que se encuentra naturalmente para anclar al ascorbato, sumado a la formación de EdH del aducto con la Arg172, de la misma forma en la que lo haría el ascorbato, podrían ser diferentes maneras en las que la formación de aductos de nitroalquilación afectaran la catálisis de la APX.

Es claro que el rol de los NO₂-FA en la señalización en las vías del estrés de las células vegetales es clave para mantener la homeostasis, y se requiere que se continúen estudiando su presencia en diferentes órganos y estadios de las plantas de especies de interés, y sus diferentes funciones en las vías de señalización. Particularmente respecto a la reacción de nitroalquilación, se podría continuar estudiando su rol en la regulación de otras proteínas de importancia para la célula vegetal, para poder entender si siempre siguen mecanismos similares o no, a futuro tal vez intentando disminuir cuánto sucede

la nitroalquilación de las enzimas antioxidantes, hacia la búsqueda de plantas más resistentes al estrés, al tener una APX (u otras enzimas) menos inhibidas por este medio.

Desde la química teórica, se podría aportar al estudio de la reacción hacia otros residuos que pueden ser blanco de esta reacción, como la lisina y arginina, ya que al disminuir la actividad de la APX en presencia de NO₂-LN, también se detectaron aductos en estos residuos, por lo que se debería estudiar su rol en la inhibición, en conjunto con el aducto ya estudiado para la Cys32. Además, para obtener valores más representativos del sistema biológico al estudiar el mecanismo de reacción, se podría caracterizar al mismo dentro del contexto de la proteína completa, utilizando modelos QM/MM, que permitirían no solo eliminar el uso de los modelos reducidos, sino además aportar el ambiente de la polaridad correcta y patrón de donantes/aceptores de enlaces de hidrógeno que podrían afectar la reacción *in vivo*. Además, se podría estudiar más a profundidad el efecto que tiene la formación del aducto hacia la catálisis de la enzima, estudiando cambios que pueda haber en la reactividad del grupo hemo, yendo más allá de la caracterización de cambios estructurales que se realizó en este trabajo.

5. Referencias bibliográficas

1. Horton RH, Moran LA, Gray Scrimgeour K, Perry MD, David Rawn J. Principios de Bioquímica. 4ta Edición. Fuerte Rivera R, editor. Vol. 1. México: Pearson Educación; 2008. 1-971.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. Molecular Biology of the Cell. 6th ed. New York, NY, USA: Garland Science; 2015.
3. Ibarguren M, López DJ, Escribá P V. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2014;1838(6):1518-28.
4. Trostchansky A, Rubbo H. Nitrated fatty acids: Mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(11):1887-96.
5. Schopfer FJ, Cipollina C, Freeman BA. Formation and Signaling Actions of Electrophilic Lipids. *Chem Rev*. 2011;111(10):5997-6021.
6. Baker PRS, Schopfer FJ, O'Donnell VB, Freeman BA. Convergence of nitric oxide and lipid signaling: Anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(8):989-1003.
7. O'Donnell VB, Eiserich JP, Chumley PH, Jablonsky MJ, Krishna NR, Kirk M, et al. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem Res Toxicol*. 1999;12(1):83-92.
8. Di Fino L, Arruebarrena Di Palma A, Perk EA, García-Mata C, Schopfer FJ, Laxalt AM. Nitro-fatty acids: electrophilic signaling molecules in plant physiology. *Planta*. 2021;254(6).
9. Dassault Systèmes. BIOVIA Draw, Version 24.1. San Diego; 2024.
10. Turell L, Vitturi DA, Coitiño EL, Lebrato L, Möller MN, Sagasti C, et al. The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(4):1145-59.
11. Bonacci G, Baker PRS, Salvatore SR, Shores D, Khoo NKH, Koenitzer JR, et al. Conjugated Linoleic Acid is a Preferential Substrate for Fatty Acid Nitration. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(53):44071-82.
12. Lima ÉS, Di Mascio P, Rubbo H, Abdalla DSP. Characterization of Linoleic Acid Nitration in Human Blood Plasma by Mass Spectrometry. *Biochemistry*. 2002;41(34):10717-22.
13. Baker PRS, Schopfer FJ, Sweeney S, Freeman BA. Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: Synthesis, clinical identification, and quantitation. *PNAS*. 2004;101(32):11577-82.
14. Delmastro-Greenwood M, Hughan KS, Vitturi DA, Salvatore SR, Grimes G, Potti G, et al. Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes. *Free Radic Biol Med*. 2015;89:333-41.

15. Fazzari M, Trostchansky A, Schopfer FJ, Salvatore SR, Sánchez-Calvo B, Vitturi D, et al. Olives and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes. *PLoS One*. 2014;9(1).
16. Mata-Pérez C, Sánchez-Calvo B, Padilla MN, Begara-Morales JC, Luque F, Melguizo M, et al. Nitro-fatty acids in plant signaling: Nitro-linolenic Acid Induces the Molecular Chaperone Network in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2016;170(2):686–701.
17. Mata-Pérez C, Sánchez-Calvo B, Padilla MN, Begara-Morales JC, Valderrama R, Corpas FJ, et al. Nitro-fatty acids in plant signaling: New key mediators of nitric oxide metabolism. *Redox Biol*. 2017;11:554–61.
18. Aranda-Caño L, Sánchez-Calvo B, Begara-Morales JC, Chaki M, Mata-Pérez C, Padilla MN, et al. Post-Translational Modification of Proteins Mediated by Nitro-Fatty Acids in Plants: Nitroalkylation. *Plants*. 2019;8.
19. Ohlrogge J, Browse J. Lipid Biosynthesis. *Plant Cell*. 1995;7:957–70.
20. Tjellström H, Yang Z, Allen DK, Ohlrogge JB. Rapid kinetic labeling of Arabidopsis cell suspension cultures: Implications for models of lipid export from plastids. *Plant Physiol*. 2012;158(2):601–11.
21. Meï C, Michaud M, Cussac M, Albrieux C, Gros V, Maréchal E, et al. Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures. *Sci Rep*. 2015;5.
22. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. International Union of Pure and Applied Chemistry; 2006 [citado 2024 Sep 19]. Radical (free radical). Disponible en: <https://doi.org/10.1351/goldbook.R05066>
23. Mizusawa N, Wada H. The role of lipids in photosystem II. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2012;1817(1):194–208.
24. Pearcy RW. Effect of Growth Temperature on the Fatty Acid Composition of the Leaf Lipids in *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats. *Plant Physiol*. 1978;61:484–6.
25. Grippo V, Mojovic M, Pavicevic A, Kabelac M, Hubatka F, Turanek J, et al. Electrophilic characteristics and aqueous behavior of fatty acid nitroalkenes. *Redox Biol*. 2021;38.
26. Schopfer FJ, Baker PRS, Giles G, Chumley P, Batthyany C, Crawford J, et al. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(19):19289–97.
27. Vollár M, Feigl G, Oláh D, Horváth A, Molnár Á, Kúsz N, et al. Nitro-Oleic Acid in Seeds and Differently Developed Seedlings of *Brassica napus* L. *Plants*. 2020;9(3).
28. Aranda-Caño L, Valderrama R, Chaki M, Begara-Morales JC, Melguizo M, Barroso JB. Nitrated Fatty-Acids Distribution in Storage Biomolecules during *Arabidopsis thaliana* Development. *Antioxidants*. 2022;11.
29. Turell L, Steglich M, Alvarez B. The chemical foundations of nitroalkene fatty acid signaling through addition reactions with thiols. *Nitric Oxide*. 2018;78:161–9.

30. Hu CH, Wang PQ, Zhang PP, Nie XM, Li B Bin, Tai L, et al. NADPH oxidases: The vital performers and center hubs during plant growth and signaling. *Cells*. 2020;9(2).
31. Arruebarrena Di Palma A, Di Fino LM, Salvatore SR, D'Ambrosio JM, García-Mata C, Schopfer FJ, et al. Nitro-oleic acid triggers ROS production via NADPH oxidase activation in plants: A pharmacological approach. *J Plant Physiol*. 2020;246–247.
32. Di Fino LM, Cerrudo I, Salvatore SR, Schopfer FJ, García-Mata C, Laxalt AM. Exogenous Nitro-Oleic Acid Treatment Inhibits Primary Root Growth by Reducing the Mitosis in the Meristem in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*. 2020;11.
33. Mata-Pérez C, Sánchez-Calvo B, Padilla MN, Begara-Morales JC, Luque F, Melguizo M, et al. Nitro-fatty acids in plant signaling: Nitro-Linolenic Acid Induces the Molecular Chaperone Network in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2016;170(2):686–701.
34. Discovery Studio Visualizer. San Diego: BIOVIA, Dassault Systèmes; 2021.
35. Batthyany C, Schopfer FJ, Baker PRS, Durán R, S Baker LM, Huang Y, et al. Reversible Post-translational Modification of Proteins by Nitrated Fatty Acids in Vivo. *J Biol Chem*. 2006;281(29):20450–63.
36. Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker PRS, et al. Nitrated Fatty Acids: Endogenous Anti-inflammatory Signaling Mediators. *J Biol Chem*. 2006;281(47):35686–98.
37. Geisler AC, Rudolph TK. Nitroalkylation - A redox sensitive signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(6):777–84.
38. Di Palma AA, Di Fino LM, Salvatore SR, D'Ambrosio JM, Grozeff GEG, García-Mata C, et al. Nitro-oleic acid induced reactive oxygen species formation and plant defense signaling in tomato cell suspensions. *BioRxiv*. 2018.
39. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med Res Rev*. 2012;32(4):687–726.
40. Joshi G, Johnson JA. The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2012;7(3):218–29.
41. Kansanen E, Bonacci G, Schopfer FJ, Kuosmanen SM, Tong KI, Leinonen H, et al. Electrophilic nitro-fatty acids activate Nrf2 by a Keap1 cysteine 151-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(16):14019–27.
42. De Oliveira MR. Chapter 24 - Sulforaphane and its modulation of brain redox status: The mitochondria as a target. In: Martin CR, Preedy VR, editors. *Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases*. Academic Press; 2020. p. 377–91.
43. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed. Oxford Academic; 2015.
44. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006;141(2):312–22.

45. Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, Li XP, Niyogi KK, Fleming GR. Carotenoid Cation Formation and the Regulation of Photosynthetic Light Harvesting. *Science* (1979). 2005;307(5708):433-6.
46. Fridovich I. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112.
47. Blough N V, Zepp RG. Reactive Oxygen Species in Natural Waters. In: Foote CS, Selverstone Valentine J, Greenberg A, Liebman JF, editors. *Active Oxygen in Chemistry*. 1st ed. New York, NY, USA: Springer Dordrecht; 1996. p. 280-333.
48. Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant.* 2007;129(1):185-95.
49. Del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol.* 2006;141(2):330-5.
50. Foyer CH, Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant.* 2003;119:355-64.
51. Montillet JL, Chamnongpol S, Rustérucci C, Dat J, Van De Cotte B, Agnel JP, et al. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 2005;138(3):1516-26.
52. Møller IM, Jensen PE, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2007;58:459-81.
53. Ghezzi P, Bonetto V. Redox proteomics: Identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics.* 2003;3(7):1145-53.
54. Job C, Rajjou L, Lovigny Y, Belghazi M, Job D. Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. *Plant Physiol.* 2005;138(2):790-802.
55. Tuteja N, Singh MB, Misra MK, Bhalla PL, Tuteja R. Molecular Mechanisms of DNA Damage and Repair: Progress in Plants. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2001;36(4):337-97.
56. Britt AB. Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in Plant Science Reviews.* 1999;4(1):1360-85.
57. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal.* 2003;17(10):1195-214.
58. Tuteja N, Ahmad P, Panda BB, Tuteja R. Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2009;681(2-3):134-49.
59. Smirnoff N. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: Smirnoff N, editor. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. 1st ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2005. p. 53-86.
60. Athar H ur R, Khan A, Ashraf M. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environ Exp Bot.* 2008;63(1-3):224-31.
61. Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol.* 2000;3:229-35.

62. Xiang C, Werner BL, Christensen EM, Oliver DJ. The Biological Functions of Glutathione Revisited in Arabidopsis Transgenic Plants with Altered Glutathione Levels. *Plant Physiol.* 2001;126:564-74.
63. Meyer AJ. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J Plant Physiol.* 2008;165(13):1390-403.
64. Mullineaux PM, Rausch T. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynth Res.* 2005;86(3):459-74.
65. Holländer-Czytko H, Grabowski J, Sandorf I, Weckermann K, Weiler EW. Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in Arabidopsis under stress conditions. *J Plant Physiol.* 2005;162(7):767-70.
66. Ghosh UK, Hossain S, Khan AR. Role of Tocopherol in Conferring Abiotic Stress Tolerance in Plants. In: Aftab T, Hakeem KR, editors. *Antioxidant Defense in Plants*. 1st ed. Springer Nature Singapore Pte Ltd; 2022. p. 215-33.
67. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *J Nat Med.* 2020;74(1):1-16.
68. Gould KS, Lister C. Flavonoid Functions in Plants. In: Andersen ØM, Markham KR, editors. *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*. 1st Edition. Boca Raton, FL: CRC Press; 2006. p. 397-441.
69. Smirnoff N, Cumbes QJ. HYDROXYL RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF COMPATIBLE SOLUTES. *Phytochemistry.* 1989;28(4):1057-60.
70. Ashraf M, Foolad MR. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot.* 2007;59(2):206-16.
71. Trovato M, Mattioli R, Costantino P. Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rendiconti Lincei.* 2008;19(4):325-46.
72. Signorelli S, Coitiño EL, Borsani O, Monza J. Molecular mechanisms for the reaction between •OH radicals and proline: Insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *Journal of Physical Chemistry B.* 2014;118(1):37-47.
73. Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.* 2002;53(372):1331-41.
74. Pilon M, Ravet K, Tapken W. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2011;1807(8):989-98.
75. Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Van Montagu M, Inzé D. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J.* 1997;16(16):4806-16.
76. Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(9):1527-47.
77. Park AK, Kim IS, Do H, Jeon BW, Lee CW, Roh SJ, et al. Structure and catalytic mechanism of monodehydroascorbate reductase, MDHAR, from *Oryza sativa* L. *japonica*. *Sci Rep.* 2016;6.

78. Hossain MA, Nakano Y, Asada K. Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide. *Plant & Cell Physiol.* 1984;25(3):385-95.
79. Asada K. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999;50:601-40.
80. Dixon DP, Skipsey M, Edwards R. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry.* 2010;71(4):338-50.
81. Cummins I, Cole DJ, Edwards R. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant Journal.* 1999;18(3):285-92.
82. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2010;48(12):909-30.
83. Welinder KG. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol.* 1992;2:388-93.
84. Raven EL. Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Ascorbate, Structural, Spectroscopic and Mechanistic Correlations in Ascorbate Peroxidase. In: *Subcellular Biochemistry.* 2000. p. 317-49.
85. Raven EL. Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases: What can we learn from ascorbate peroxidase? *Nat Prod Rep.* 2003;20(4):367-81.
86. Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF, Stoppani A o M. Deficient Metabolic Utilization of Hydrogen Peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 1980;188:643-8.
87. Wada N, Kinoshita S, Matsuo M, Amako K, Miyake C, Asada K. Purification and Molecular Properties of Ascorbate Peroxidase from Bovine Eye. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;242:256-61.
88. Ishikawa T, Takeda T, Kohno H, Shigeoka S. Molecular characterization of *Euglena* ascorbate peroxidase using monoclonal antibody. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1290:69-75.
89. Nito K, Yamaguchi K, Kondo M, Hayashi M, Nishimura M. Pumpkin Peroxisomal Ascorbate Peroxidase is Localized on Peroxisomal Membranes and Unknown Membranous Structures. *Plant Cell Physiol.* 2001;42(1):20-7.
90. Yamaguchi K, Mori H, Nishimura M. A Novel Isoenzyme of Ascorbate Peroxidase Localized on Glyoxysomal and Leaf Peroxisomal Membranes in Pumpkin. *Plant Cell Physiol.* 1995;36(6):1157-62.
91. Bunkelmann JR, Trelease RN. Ascorbate Peroxidase. A Prominent Membrane Protein in Oilseed Glyoxysomes. *Plant Physiol.* 1996;110(1):589-98.
92. Miyake C, Cao WH, Asada K. Purification and Molecular Properties of the Thylakoid-Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1993;34(6):881-9.

93. De Leonardis S, Dipierro N, Dipierro S. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiol Biochem.* 2000;38:773-9.
94. Jiménez A, Hernández JA, Rio LAD, Sevilla F. Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant Physiol.* 1997;114:275-84.
95. Sofo A, Scopa A, Nuzzaci M, Vitti A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *Int J Mol Sci.* 2015;16(6):13561-78.
96. Chen GX, Asada K. Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic and Molecular Properties. *Plant Cell Physiol.* 1989;30(7):987-98.
97. Sharp KH, Mewies M, Moody PCE, Raven EL. Crystal structure of the ascorbate peroxidase-ascorbate complex. *Nat Struct Biol.* 2003;10(4):303-7.
98. Kabsch W, Sander C. Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers.* 1983;22(12):2577-637.
99. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1):33-8.
100. Pratap A, Gupta SK, Kumar J, Solanki RK. Soybean. En: *Technological Innovations in Major World Oil Crops.* Springer New York; 2012. p. 293-321.
101. Singh G, Shivakumar B. The Role of Soybean in Agriculture. En: Singh G, editor. *The Soybean: Botany, Production and Uses.* CAB International; 2011. p. 24-47.
102. Singh G. *The Soybean: Botany, Production and Uses.* 2011. 1-47 p.
103. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Oilseeds Market Summary. 2011. Disponible en: <http://www.fao.org/economic/est/>
104. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production quantities of Soya beans by country. 2023. *Crops And Livestock Products.*
105. Couto P, Arenare L, Fontan Vi, Fossati S, Gonzalez J, Lavista N, et al. Encuesta Agrícola Invierno 2023-Estadísticas Agropecuarias (DIEA). 2023.
106. Ceretta S, Silva J. CULTIVO DE SOJA- INIA lanza el Proyecto Nacional de Mejoramiento Genético. *Revista INIA N°30.* 2012;32-5.
107. Zhan X, Lu Y, Zhu JK, Botella JR. Genome editing for plant research and crop improvement. *J Integr Plant Biol.* 2021;63(1):3-33.
108. Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology.* 2005;32(6):481-94.
109. Tuteja N. Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. In: *Methods in Enzymology.* Academic Press Inc.; 2007. p. 419-38.
110. Waltz E. Beating the heat. *Nat Biotechnol.* 2014;32(7):610-3.

111. Gill SS, Khan NA, Anjum NA, Tuteja N. Amelioration of Cadmium Stress in Crop Plants by Nutrient Management: Morphological, Physiological and Biochemical Aspects. *Plant Stress*. 2011;5(Special Issue 1):1-23.
112. Tuteja N. Cold, Salinity, and Drought Stress. In: *Plant stress biology : from genomics to systems biology*. Wiley-Blackwell; 2009. p. 137-59.
113. Chai J Da, Head-Gordon M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2008;10(44):6615-20.
114. Ditchfield R, Hehre WJ, Pople JA. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *Journal of Chemical Physics*. 1971;54(2):720-3.
115. Smith JM, Jami Alahmadi Y, Rowley CN. Range-separated DFT functionals are necessary to model thio-Michael additions. *J Chem Theory Comput*. 2013;9(11):4860-5.
116. Tomasi J. Selected features of the polarizable continuum model for the representation of solvation. *WIREs Computational Molecular Science*. 2011;1(5):855-67.
117. Bondi A. van der Waals Volumes and Radii. *Journal of Physical Chemistry*. 1964;68(3):441-51.
118. Floris F, Tomasi J. Evaluation of the Dispersion Contribution to the Solvation Energy. A Simple Computational Model in the Continuum Approximation. *J Comput Chem*. 1989;10(5):616-27.
119. Floris FM, Tommasi J, Ahuir JLP. Dispersion and Repulsion Contributions to the Solvation Energy: Refinements to a Simple Computational Model in the Continuum Approximation. *J Comput Chem*. 1991;12(7):784-91.
120. Pierotti RA. A Scaled Particle Theory of Aqueous and Nonaqueous Solutions. *Chem Rev*. 1976;76(6):717-26.
121. Gaussian 16, Revision C.01, Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Petersson GA, Nakatsuji H, Li X, Caricato M, Marenich AV, Bloino J, Janesko BG, Gomperts R, Mennucci B, Hratchian HP, Ortiz JV, Izmaylov AF, Sonnenberg JL, Williams-Young D, Ding F, Lipparini F, Egidi F, Goings J, Peng B, Petrone A, Henderson T, Ranasinghe D, Zakrzewski VG, Gao J, Rega N, Zheng G, Liang W, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Throssell K, Montgomery JA Jr, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark MJ, Heyd JJ, Brothers EN, Kudin KN, Staroverov VN, Keith TA, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell AP, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Millam JM, Klene M, Adamo C, Cammi R, Ochterski J. W, Martin RL, Morokuma K, Farkas O, Foresman JB, Fox D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
122. Tian P. Computational protein design, from single domain soluble proteins to membrane proteins. *Chem Soc Rev*. 2010;39(6):2071-82.
123. Geerlings P, De Proft F, Langenaeker W. Conceptual Density Functional Theory. *Chem Rev*. 2003;103(5):1793-873.

124. Reed AE, Weinstock RB, Weinhold F. Natural population analysis. *J Chem Phys.* 1985;83(2):735-46.
125. Reed AE, Weinhold F. Natural bond orbital analysis of near-Hartree-Fock water dimer. *J Chem Phys.* 1983;78(6):4066-73.
126. Wiberg KB. APPLICATION OF THE POPLE-SANTRY-SEGAL CNDO METHOD TO THE CYCLOPROPYLCARBINYL AND CYCLOBUTYL CATION AND TO BICYCLOBUTANE. *Tetrahedron.* 1968;24:1083-96.
127. Parr RG, Yang W. Density Functional Approach to the Frontier-Electron Theory of Chemical Reactivity. *J Am Chem Soc.* 1984;106(14):4049-50.
128. Cantou Guillenea, A. NO₂CLA como blanco de adición tipo Michael por tioles: estudio *in silico* de la modulación según la naturaleza del biotiol en solución y en LBD de PPAR γ [en línea]. Tesis de grado. Montevideo:Udelar. FC. 2018.
129. Fukui K. The Path of Chemical Reactions - The IRC Approach. *Acc Chem Res.* 1981;14(12):363-8.
130. Hratchian HP, Schlegel HB. Accurate reaction paths using a Hessian based predictor-corrector integrator. *Journal of Chemical Physics.* 2004;120(21):9918-24.
131. Gordon JC, Myers JB, Foltz T, Shoja V, Heath LS, Onufriev A. H++: A server for estimating pK_as and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:W368-71.
132. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys.* 1983;79(2):926-35.
133. Case DA, Aktulga HM, Belfon K, Ben-Shalom IY, Berryman JT, Brozell SR, Cerutti DS, Cheatham III TE, Cisneros GA, Cruzeiro VWD, Darden TA, Duke RE, Giambasu G, Gilson MK, Gohlke H, Goetz AW, Harris R, Izadi S, Izmailov SA, Kasavajhala K, Kaymak MC, King E, Kovalenko A, Kurtzman T, Lee TS, LeGrand S, Li P, Lin C, Liu J, Luchko T, Luo R, Machado M, Man V, Manathunga M, Merz KM, Miao Y, Mikhailovskii O, Monard G, Nguyen H, O'Hearn KA, Onufriev A, Pan F, Pantano S, Qi R, Rahnamoun A, Roe DR, Roitberg A, Sagui C, Schott-Verdugo S, Shajan A, Shen J, Simmerling CL, Skrynnikov NR, Smith J, Swails J, Walker RC, Wang J, Wang J, Wei H, Wolf RM, Wu X, Xiong Y, Xue Y, York DM, Zhao S, Kollman PA. Amber 2022. San Francisco: University of California.
134. Tian C, Kasavajhala K, Belfon KAA, Raguette L, Huang H, Miguels AN, et al. Ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. *J Chem Theory Comput.* 2020;16(1):528-52.
135. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J Comput Chem.* 2004;25:1157-74.
136. Córdova JA, Palermo JC, Estrin DA, Bari SE, Capece L. Binding mechanism of disulfide species to ferric hemeproteins: The case of metmyoglobin. *J Inorg Biochem.* 2023;247.
137. Boubeta FM, Bieza SA, Bringas M, Estrin DA, Boechi L, Bari SE. Mechanism of Sulfide Binding by Ferric Hemeproteins. *Inorg Chem.* 2018;57(13):7591-600.

138. Basma M, Sundara S, Çalgan D, Vernali T, Woods RJ. Solvated Ensemble Averaging in the Calculation of Partial Atomic Charges. *J Comput Chem.* 2001;22(11):1125–37.
139. Wang J, Cieplak P, Kollman PA. How Well Does a Restrained Electrostatic Potential (RESP) Model Perform in Calculating Conformational Energies of Organic and Biological Molecules? *J Comput Chem.* 2000;21(12):1049–74.
140. Loncharich RJ, Brooks BR, Pastor RW. Langevin Dynamics of Peptides: The Frictional Dependence of Isomerization Rates of N-Acetylalanyl-WMethylamide. *Biopolymers.* 1992;32:523–35.
141. Åqvist J, Wennerström P, Nervall M, Bjelic S, Brandsdal BO. Molecular dynamics simulations of water and biomolecules with a Monte Carlo constant pressure algorithm. *Chem Phys Lett.* 2004;384(4–6):288–94.
142. Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen HJC. Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J Comput Phys.* 1977;23:321–41.
143. Chung LW, Sameera WMC, Ramozzi R, Page AJ, Hatanaka M, Petrova GP, et al. The ONIOM Method and Its Applications. *Chem Rev.* 2015;115(12):5678–796.
144. Hiram Gilbert BF. Molecular and Cellular Aspects of Thiol-Disulfide Exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1963;63:69–172.
145. Tsai HH, Schmidt W. The enigma of environmental pH sensing in plants. *Nat Plants.* 2021;7(2):106–15.

6.Anexo

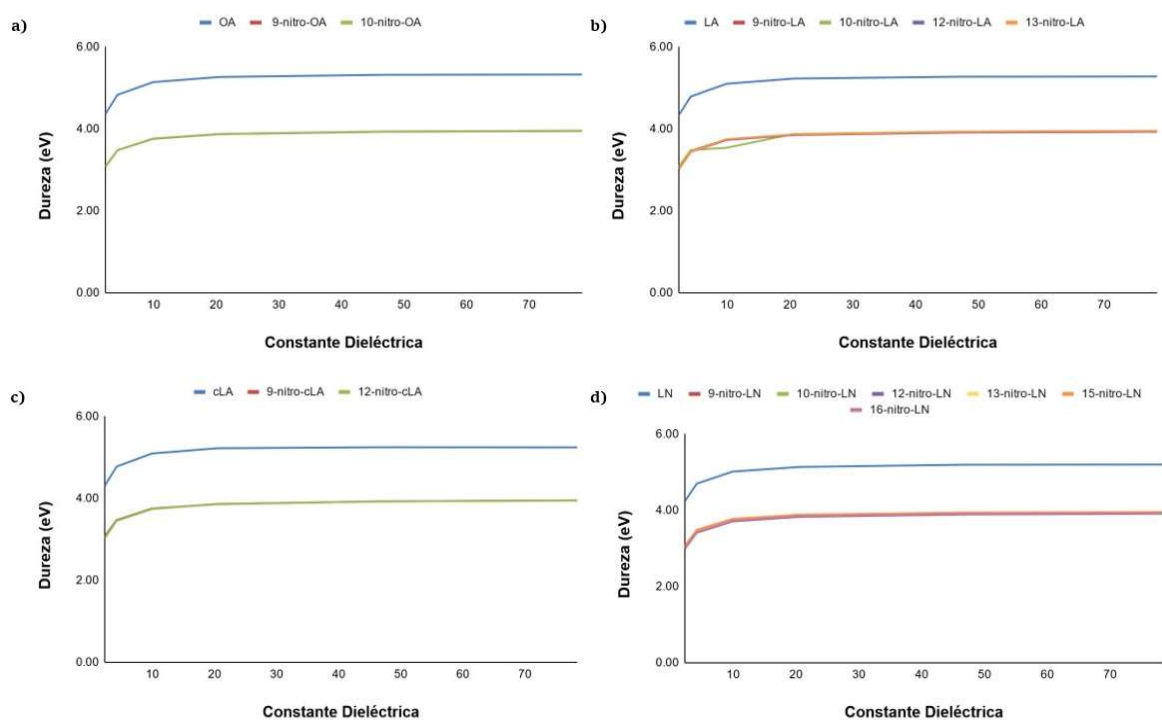


Figura A1-Dureza de NO₂-FA y FA vs la constante dieléctrica del solvente, para las 4 familias de FA estudiadas: a) ácido oleico, con sus variantes 9- y 10-NO₂ b) ácido linoleico, con sus variantes 9-, 10-, 12- y 13-NO₂ c) ácido linoleico conjugado, con sus variantes 9- y 12-NO₂ d) ácido linolénico, con sus variantes 9-, 10-, 12-, 13-, 15- y 16-NO₂.

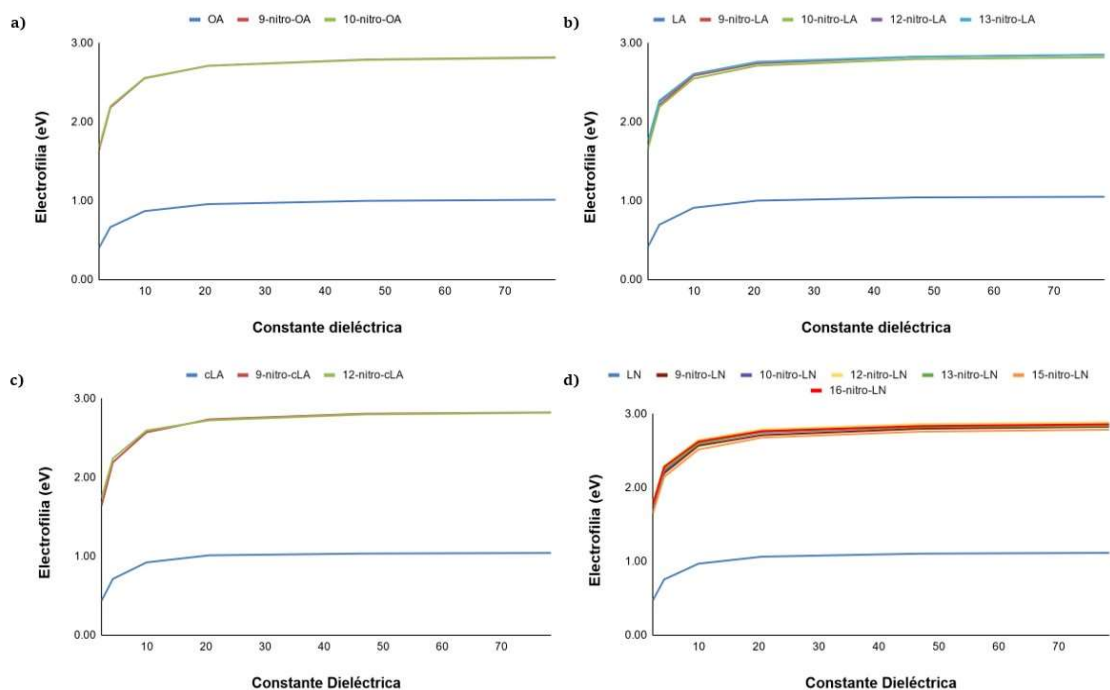


Figura A2- Electrofilia de NO₂-FA y FA vs la constante dieléctrica del solvente, para las 4 familias de FA estudiadas: a) ácido oleico, con sus variantes 9- y 10-NO₂ b) ácido linoleico, con sus variantes 9-, 10-, 12- y 13-NO₂ c) ácido linoleico conjugado, con sus variantes 9- y 12-NO₂ d) ácido linolénico, con sus variantes 9-, 10-, 12-, 13-, 15- y 16-NO₂.

Tabla A1- Energías en agua utilizadas para los cálculos presentados en la **Tabla 6**, presentadas en a.u.

NO ₂ -LN	Especie	E _{elec}	E _{elec} + ZPVE	Entalpía	E _{libre de Gibbs}
9LN	Reactivos Separados	-1072.47797	-1072.17124	-1072.15125	-1072.23863
	RC	-1072.47680	-1072.16753	-1072.14718	-1072.21799
	TS	-1072.47177	-1072.16352	-1072.14423	-1072.21171
	IA	-1072.50579	-1072.19611	-1072.17696	-1072.24295
13LN	Reactivos Separados	-1072.47687	-1072.17033	-1072.15043	-1072.23685
	RC	-1072.47456	-1072.16585	-1072.14544	-1072.21532
	TS	-1072.46801	-1072.15982	-1072.14079	-1072.20577
	IA	-1072.49662	-1072.18772	-1072.16870	-1072.23361
16LN	Reactivos Separados	-1072.47582	-1072.16906	-1072.14903	-1072.16906
	RC	-1072.47521	-1072.16638	-1072.14596	-1072.16638
	TS	-1072.47215	-1072.16315	-1072.14414	-1072.16315
	IA	-1072.50337	-1072.19296	-1072.17401	-1072.19296

Tabla A2- Energías en octanol utilizadas para los cálculos presentados en la **Tabla 6**, presentadas en a.u.

NO ₂ -LN	Especie	E _{elec}	E _{elec} + ZPVE	Entalpía	E _{libre de Gibbs}
9LN	Reactivos Separados	-1072.45185	-1072.14471	-1072.12487	-1072.21140
	RC	-1072.45129	-1072.14073	-1072.12174	-1072.18779
	TS	-1072.44891	-1072.14081	-1072.12142	-1072.18860
	IA	-1072.48144	-1072.17113	-1072.15222	-1072.21728
13LN	Reactivos Separados	-1072.45096	-1072.14283	-1072.12329	-1072.20837
	RC	-1072.44932	-1072.14019	-1072.11981	-1072.19101
	TS	-1072.44486	-1072.13552	-1072.11684	-1072.18070
	IA	-1072.47205	-1072.16102	-1072.14249	-1072.20588
16LN	Reactivos Separados	-1072.44986	-1072.14299	-1072.12290	-1072.21095
	RC	-1072.44912	-1072.13965	-1072.11961	-1072.18834
	TS	-1072.44858	-1072.13924	-1072.12011	-1072.18639
	IA	-1072.47799	-1072.16799	-1072.14891	-1072.21449

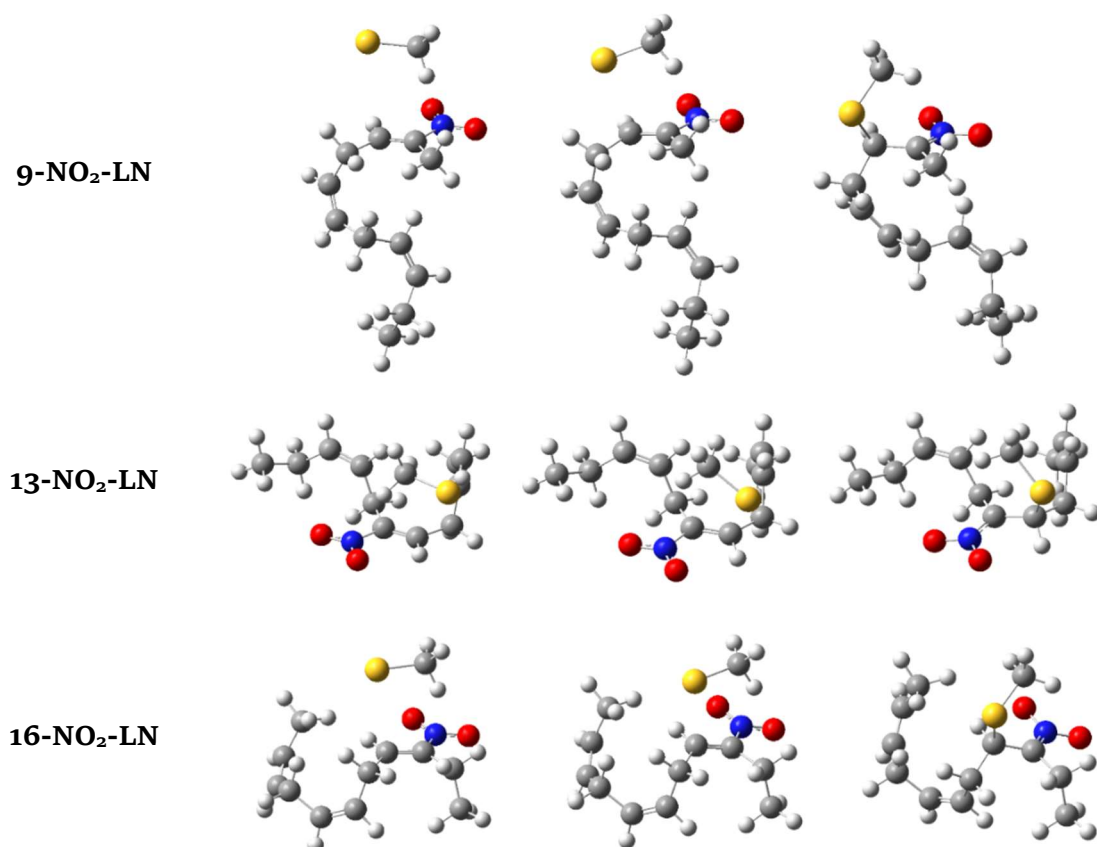


Figura A3- Estructuras de RC, TS) e IA de la reacción de tiol-Michael de los regioisómeros 9-, 13- y 16-NO₂-LN en octanol.

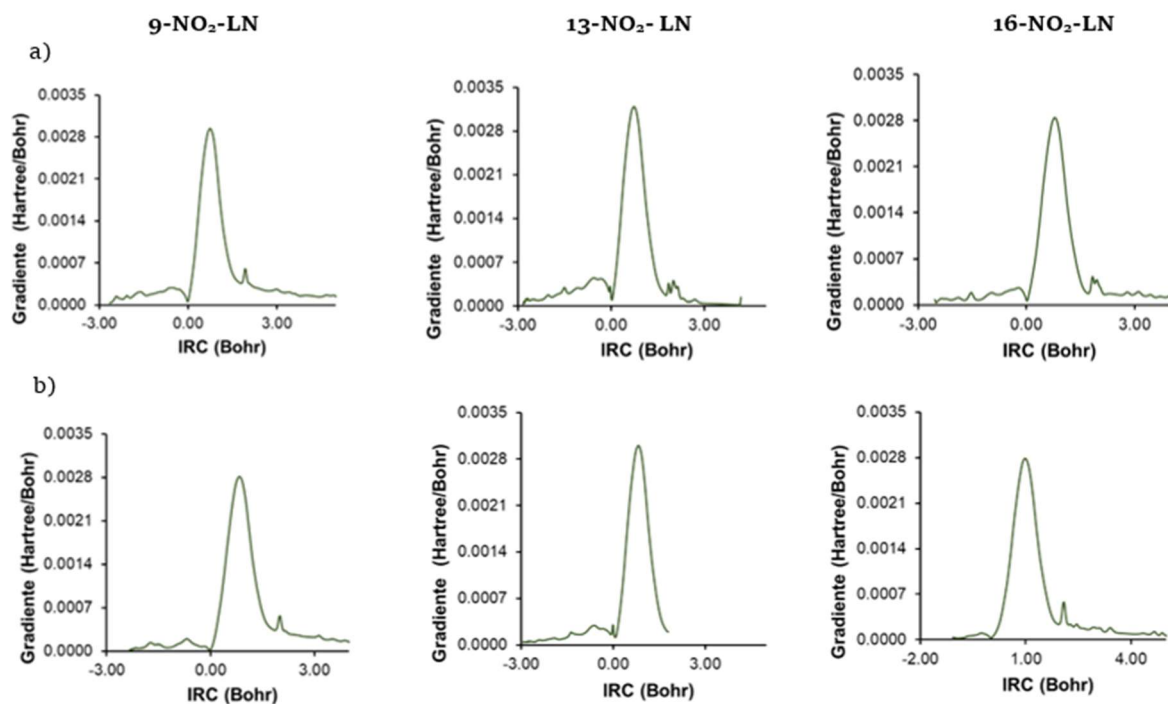


Figura A4- Gradientes obtenidos para los caminos de reacción para los 3 regioisómeros estudiados, en a) agua y b) octanol.

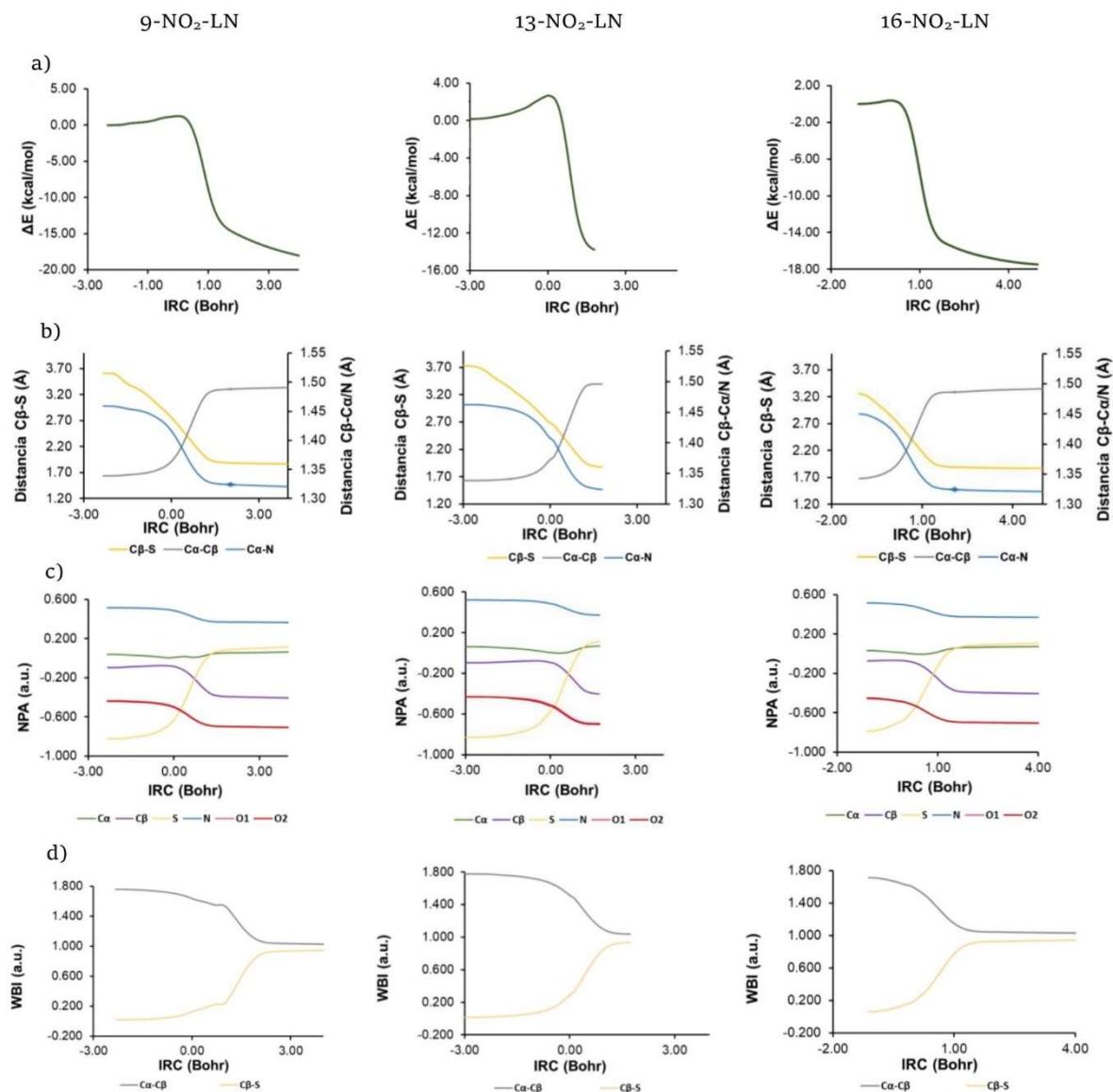


Figura A5- Para los regioisómeros 9-, 13- y 16-NO₂-LN con el octanol como solvente se muestran a) Los caminos de reacción obtenidos para cada uno, b) Las distancias de los enlaces relevantes para la reacción, c) las cargas NPA para átomos relevantes, y d) WBI del enlace en formación (C β -S) y del enlace que se debilita (C α =C β).

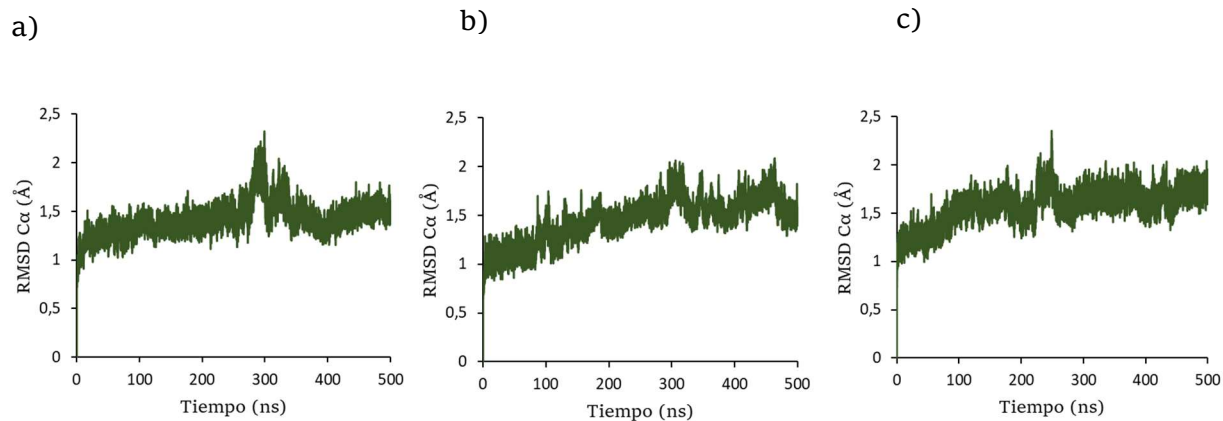


Figura A6- RMSD de los C α de los residuos de APX a) con Cys32 como tiolato, b) con Cys32 como tiol, y c) con Cys32-16-NO₂-LN.

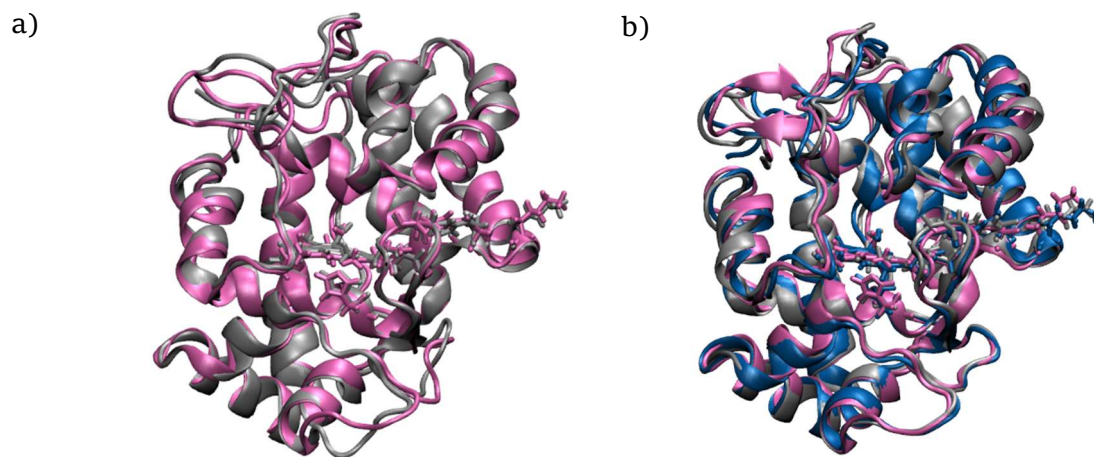


Figura A7- Superposición de clusters con más de 10% de permanencia en las simulaciones de APX con a) Cys32SH y b) Cys32S⁻. En orden descendente de permanencia se colorea: plateado, rosado y azul.