

# **Nitración de tirosina en medios hidrofóbicos: Estudios con péptidos transmembrana modelo en liposomas**

Facultad de Ciencias – Universidad de la República

Licenciatura en Bioquímica

Tesina de finalización de grado



Daniel Herrera Esposito

Orientador: Dra. Silvina Bartesaghi

Centro de Investigaciones Biomédicas – Facultad de Medicina –  
Universidad de la República

Febrero 2015 – Montevideo, Uruguay



## Índice general:

<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>3</b>
2.1. Estrés oxidativo	3
a) Reseña histórica y generalidades	3
b) Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	4
i. Oxígeno	5
ii. Radical superóxido	5
iii. Óxido nítrico	6
iv. Peroxinitrito	8
v. Dióxido de nitrógeno	11
vi. Radical hidroxilo	12
vii. Radical anión carbonato	13
c) Antioxidantes	14
i. Ácido ascórbico	14
ii. Glutación	15
iii. Tocoferoles y tocotrienoles	16
2.2. Nitración de tirosina	19
a) Propiedades de la tirosina y la nitrotirosina	19
b) Vías de nitración de la tirosina	23
i. Vía de las peroxidasas	24
ii. Vía del peroxinitrito	27
2.3. Lipoperoxidación	31
a) Mecanismos químicos y productos de la lipoperoxidación	31
i. Iniciación	32
ii. Propagación	34
iii. Terminación	37
b) Métodos de cuantificación de la lipoperoxidación	37
i. Yodimetría	38
ii. Método FOX	38
iii. Método TBARS	39
<b>3. Objetivos</b>	<b>42</b>
<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>43</b>

4.1. Materiales	43
4.2. Métodos	43
a) Síntesis del peroxinitrito	43
b) Formación de liposomas	43
c) Procesamiento de las muestras y análisis de nitración por HPLC	44
d) Ensayo TBARS	45
e) Cámara hipóxica	46
f) Software matemático	46
g) Simulaciones de dinámica molecular	46
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>47</b>
5.1. Espectros UV-Visible de los péptidos	48
5.2. Nitración en función de peroxinitrito en bolo	51
5.3. Comparación entre agregado en bolo y agregado en infusión	57
5.4. Efecto del alfa tocoferol	62
5.5. Prueba del efecto de la concentración de oxígeno en el medio	65
<b>6. Conclusiones</b>	<b>68</b>
<b>7. Referencias</b>	<b>70</b>
<b>8. Anexo</b>	<b>81</b>

## Índice de figuras y tablas:

<b>Figura 2.1</b>	Reducción secuencial de oxígeno a agua, y especies intermediarias_____	5
<b>Figura 2.2</b>	Esquema de las principales reacciones que involucran al peroxinitrito_____	9
<b>Tabla 2.I</b>	Constantes de reacción para el dióxido de nitrógeno con distintas biomoléculas_____	11
<b>Figura 2.3</b>	Reacciones entre el radical hidroxilo y la tirosina_____	13
<b>Figura 2.4</b>	Estructura de la vitamina C_____	15
<b>Tabla 2.II</b>	Constantes de velocidad para la reacción del GSH con algunos radicales libres_____	16
<b>Figura 2.5</b>	Estructura del $\alpha$ -tocoferol_____	17
<b>Figura 2.6</b>	Efecto antioxidante del $\alpha$ -tocoferol_____	18
<b>Figura 2.7</b>	Vías de reacción del radical tocoferoxilo_____	19
<b>Figura 2.8</b>	Crecimiento en la producción de artículos científicos con la palabra “nitrotyrosine”_____	20
<b>Figura 2.9</b>	Ciclo termodinámico de la tirosina en medio acuoso_____	21
<b>Figura 2.10</b>	Espectro de la tirosina y de la nitrotirosina a pH ácido y pH básico_____	22
<b>Figura 2.11</b>	Formación del radical tirosilo y sus potenciales vías de reacción_____	23
<b>Tabla 2.III</b>	Constantes de velocidad relevantes a la vía de las peroxidasas_____	25
<b>Figura 2.12</b>	Co-localización de MPO y nitrotirosina <i>in vivo</i> _____	26
<b>Figura 2.13</b>	Efecto de un atrapador de peroxinitrito sobre el daño por reperfusión isquémica_____	28
<b>Figura 2.14</b>	Velocidad de reacción del peroxinitrito con diferentes blancos_____	30
<b>Figura 2.15</b>	Camino de reacción del ácido linoleico, con constantes de reacción incluidas_____	32
<b>Tabla 2.IV</b>	Constantes de reacción de algunos radicales libres con ácidos grasos relevantes y con alfa tocoferol_____	33
<b>Figura 2.16</b>	Fundamento químico del radical clock aplicado a la reacción entre $LOO^{\cdot}$ y tocoferol_____	35
<b>Figura 2.17</b>	Efecto de los antioxidantes sobre la distribución de productos de lipoperoxidación_____	35

<b>Figura 2.18</b>	Radicales primarios y principales hidroperóxidos formados a partir del ácido oleico y del colesterol_____	36
<b>Tabla 2.V</b>	Valores de $k_p$ para lípidos en solución o en bicapa_____	37
<b>Figura 2.19</b>	Generación de malondialdehído a partir de la oxidación lipídica_	39
<b>Figura 2.20</b>	Formas químicas que adopta el malondialdehído_____	40
<b>Figura 2.21</b>	Reacción entre el ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído en el ensayo TBARS_____	41
<b>Tabla 5.I</b>	Secuencia, peso molecular y pureza (reportada por el proveedor) de los péptidos utilizados en el trabajo_____	47
<b>Figura 5.1</b>	Estructura química del BTBE_____	47
<b>Tabla 5.II</b>	Perfil de ácidos grasos del EYPC_____	48
<b>Figura 5.2</b>	Espectros de los péptidos utilizados en el trabajo, disueltos en metanol/TFA (2,5%)_____	48
<b>Figura 5.3</b>	Espectroscopia de los péptidos disueltos en etanol/TFE_____	50
<b>Tabla 5.III</b>	Valores de absortividad molar calculados a partir de las figuras 5.2 y 5.3B_____	51
<b>Figura 5.4</b>	Cromatogramas de los péptidos_____	52
<b>Figura 5.5</b>	Comparación entre experimentos con datos absolutos y normalizados para Y12_____	53
<b>Figura 5.6</b>	Porcentaje de nitración en función de la concentración de peroxinitrito agregada en bolo_____	54
<b>Tabla 5.IV</b>	Velocidad de reacción de los radicales derivados del peroxinitrito con las especies presentes en los liposomas de EYPC con péptido_____	55
<b>Tabla 5.V</b>	Velocidad de reacción de los radicales derivados del peroxinitrito con las especies presentes en los liposomas de DLPC con péptido_____	55
<b>Tabla 5.VI</b>	Nitración de tirosina en presencia de liposomas sin péptido como competidor_____	56
<b>Figura 5.7</b>	Comparación de porcentajes de nitración tras agregado de peroxinitrito en bolo y en infusión_____	57
<b>Figura 5.8</b>	Oxidación de tirosina por el radical lipoperoxilo_____	59
<b>Figura 5.9</b>	Distribución espacial en la bicapa de grupos químicos de interés_____	60
<b>Figura 5.10</b>	Comparación de agregado de peroxinitrito en bolo y en infusión lenta para tirosina, BTBE y Y8_____	62
<b>Figura 5.11</b>	Efecto del tocoferol en oxidación por agregado de peroxinitrito	63

<b>Figura 5.12</b>	Efecto del alfa tocoferol en la nitración de Y8 por peroxinitrito agregado en infusión lenta_____	64
<b>Tabla 5.VII</b>	Concentraciones estimadas de oxígeno en agua, y en liposomas de EYPC en las condiciones utilizadas_____	65
<b>Figura 5.13</b>	Efecto del oxígeno en la nitración de los residuos de tirosina de péptidos transmembrana_____	66
<b>Figura 5.14</b>	Efecto del oxígeno en la nitración de tirosina en solución acuosa_____	67
<b>Figura S.1</b>	Comparación del procesamiento por agregado de etanol/TFE/TFA y el procesamiento por centrifugación_____	81
<b>Tabla S.I</b>	Días entre el experimento y el análisis para las diferentes muestras__	82
<b>Tabla S.II</b>	Recuperaciones normalizadas respecto a la mayor recuperación del mismo par lípido-péptido_____	82
<b>Figura S.2</b>	Dependencia de la recuperación de péptido con la concentración de oxígeno_____	83

## Abreviaturas:

<u>Abreviación</u>	<u>Nombre completo</u>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BTBE	N-t-BOC-L-tirosine tert-butyl ester
Ca	Calcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO <sub>3</sub> <sup>•-</sup>	Radical anión carbonato
DHA	Ácido deshidroascórbico
DLPC	di-laureoil fosfatidilcolina
DTPA	Ácido etilendiaminotetraacético
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPO	Eosinófilo peroxidasa
EYPC	Fosfatidilcolina de yema de huevo
Fe	Hierro
FOX	Ensayo "Ferrous-oxidation Xylenol-orange"
Gly	Glicina
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GS <sup>•</sup>	Radical glutationilo
GSH	Glutación
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Ácido carbónico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Radical hidroperoxilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
KALP	Serie de péptidos transmembrana con alternación Ala-Leu
L <sup>•</sup>	Radical lipídicos
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LOO <sup>•</sup>	Radical lipoperoxilo
LOOH	Lipoperóxidos
MDA	Malondialdehído
Met	Metanol
Mn	Manganeso
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
MPO	Mieloperoxidasa
N <sub>2</sub>	Nitrógeno molecular
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido de dinitrógeno
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Tetraóxido de dinitrógeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico



NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>2</sub> -Tyr	Nitrotirosina
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	NADPH oxidasa
O <sub>2</sub>	Óxígeno molecular
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	Radical superóxido
OH	Radical hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
ONOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrosoperoxocarboxilato
ONOOH	Ácido peroxinitroso
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas contra el TBA
TFA	2,2,2-trifluoroacetato
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TOH	Tocoferol
Tyr	Tirosina
TyrNO	Nitroso tirosina
TyrO <sup>•</sup>	Radical tirosilo
XO	Xantina oxidasa
Y12	Péptido KALP con tirosina en la posición 12
Y4	Péptido KALP con tirosina en la posición 4
Y8	Péptido KALP con tirosina en la posición 8

## **1) Resumen:**

El estrés oxidativo, que puede ser definido como un desbalance entre los oxidantes y las defensas antioxidantes de los organismos, ha sido estudiado durante varias décadas como posible causante de patologías. Este rol se atribuye principalmente a la modificación de biomoléculas por especies oxidantes, siendo una de estas modificaciones la nitración de los residuos de tirosina en proteínas para formar nitrotirosina, que ha sido detectada *in vivo*, y cuyos niveles se han visto aumentados en numerosas patologías, especialmente aquellas que involucran estados de inflamación (aterosclerosis, reperfusión isquémica, enfermedades neurodegenerativas, entre otras). Esta modificación es selectiva para residuos específicos dentro de algunas proteínas, y esta selectividad dependerá de numerosos factores fisicoquímicos y bioquímicos que aún hoy no se encuentran completamente caracterizados. Conocer estos factores es de una gran relevancia para el estudio del rol de la nitración de tirosina en la patología, dado que caracterizar la química de esta modificación y conocer las bases moleculares de su selectividad puede permitir el desarrollo de herramientas para predecir qué residuos de tirosina se pueden encontrar nitrados y qué escenarios bioquímicos favorecen la nitración, para definir mejor el rol de esta modificación en la patología, y luego racionalizar el diseño de posibles fármacos anti-nitración.

La mayor parte de la caracterización química y bioquímica de esta modificación se ha llevado a cabo para residuos de tirosina en solución, aunque una parte de los residuos de tirosina modificados hallados *in vivo* se encuentran en membranas u otros ambientes hidrofóbicos, en que los factores de relevancia fisicoquímica se ven alterados. En este trabajo se utilizaron liposomas, a los que se incorporaron péptidos transmembrana conteniendo un residuo de tirosina, como sistema modelo para caracterizar el efecto de algunos parámetros fisicoquímicos sobre la nitración de tirosinas en ambientes hidrofóbicos. Se utilizó peroxinitrito como agente nitrante, uno de los principales responsables de la nitración de tirosina *in vivo*.

En este trabajo se observó que el peroxinitrito es capaz de nitrar tirosinas presentes en el interior de membranas lipídicas, y que la posición de la tirosina en la bicapa y el tipo de lípido utilizado no tienen un efecto notorio sobre la nitración cuando el peroxinitrito es agregado en bolo, pero que sí tienen notorios efectos cuando el peroxinitrito es agregado en infusión lenta para crear un escenario más similar al biológico. Estas diferencias se pudieron racionalizar químicamente y atribuirles a la oxidación de la tirosina por parte de los  $LOO^{\cdot}$  y la reparación del radical tirosilo al oxidar lípidos poliinsaturados. Esta racionalización se correspondió con lo predecible a partir de datos de dinámica molecular obtenidos en colaboración con un grupo especializado de la Universidad de Buenos Aires, y otros presentados recientemente en la literatura. Además se observó que en el rango de concentraciones biológicamente relevantes de  $\alpha$ -tocoferol (1 molécula

cada 100-1000 de lípidos) este puede inhibir de forma importante o no inhibir la nitración de tirosina (a la mayor y menor concentraciones respectivamente), por lo que *in vivo* su efecto sobre esta modificación dependerá de su concentración local. Además cabe resaltar que se observó, al igual que en un trabajo previo de nuestro grupo, un efecto importante de la concentración de O<sub>2</sub> en el medio sobre la nitración de tirosinas de membrana, factor que debe ser considerado en estudios biológicos dada la diferente concentración de oxígeno presente en diferentes tejidos o al efecto que pueda tener en estudios con cultivos celulares.

Finalmente se puede concluir que, dado que este modelo (refiriéndonos al experimental en conjunto con el computacional) fue empleado exitosamente en la determinación de algunos factores fisicoquímicos de relevancia para la nitración de tirosina, también puede servir en un futuro para continuar explorando nuevos factores fisicoquímicos o bioquímicos que puedan tener relevancia biológica.

## **2) Introducción:**

### **2.1) Estrés oxidativo:**

#### **a) Reseña histórica y generalidades:**

En el año 1954 la investigadora argentina Rebeca Gerschman publicó en la revista Science un artículo titulado “Oxygen Poisoning and X-Irradiation: A Mechanism in Common”, en el que postula que la formación de radicales libres oxidantes es un mecanismo que la toxicidad producida por altas presiones de oxígeno y la producida por irradiación por rayos-X tienen en común. En este artículo demostró que diferentes sustancias que protegen contra el daño por rayos-X también resultaron aumentar el tiempo de vida de ratones expuestos a altas tensiones de oxígeno<sup>1</sup>.

Luego, en 1956, Denham Harman publicó un artículo titulado “Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry”, proponiendo una relación entre el fenómeno del envejecimiento y la producción de radicales libres en los procesos metabólicos. Sus argumentos se basaban en la observación de que la aparición de mutaciones, cáncer y envejecimiento se da de forma natural y espontánea en los seres vivos, pero que también se da de una forma similar como consecuencia de la irradiación, a través de la producción de especies radicales como el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). Ya entonces existía evidencia apoyando que esas especies reactivas pueden producirse de forma natural en los procesos metabólicos, y la universalidad del proceso de envejecimiento y de la generación de radicales libres también fue un argumento a favor de la vinculación de ambos procesos. En ese mismo artículo discute la posibilidad del uso de mecanismos químicos para la prolongación de la vida, poniendo como ejemplo la suplementación alimentaria de sustancias fácilmente oxidables que protegen contra la radiación<sup>2</sup>.

Posteriormente Joe McCord e Irwin Fridovich hicieron una contribución trascendental en el área de la biología de los radicales libres al publicar el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en 1969, y luego en 1971 publicaron una teoría explicando la anaerobiosis obligada en base a la actividad de esta enzima. En este artículo observaron, analizando una serie de microorganismos, que la SOD se encontraba ausente en todos las especies anaeróbicas obligadas, y presente en las anaeróbicas facultativas (con la excepción de una especie anaeróbica facultativa en la que no se detectó SOD pero coincidentemente, tampoco se pudo medir un consumo de oxígeno en el metabolismo), a diferencia de la enzima catalasa, mejor caracterizada en ese entonces, que se encontraba ausente en ambos grupos. La enzima SOD cataliza la dismutación del radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), un radical libre generado a partir de la

reducción por un electrón del oxígeno molecular ( $O_2$ ), y su descubrimiento fue la primera evidencia contundente de que los radicales libres cumplen un rol biológico importante. Este descubrimiento también apoyó la teoría previa de Harman sobre el posible efecto tóxico de las especies reactivas derivadas del oxígeno y del superóxido<sup>3,4</sup>.

Estos descubrimientos y teorías fueron el comienzo de la investigación de los radicales libres en la biología y la medicina. Actualmente se sabe que el rol de las especies oxidantes y los radicales libres es mucho más complejo que el de simples mediadores en el daño a moléculas y tejidos. Un ejemplo conocido es el óxido nítrico ( $\cdot NO$ ), un radical libre que actúa como señalizador en el endotelio y en el músculo, como neurotransmisor en el sistema nervioso y forma parte de los mecanismos antimicrobianos del sistema inmune, pero también en determinadas circunstancias puede dar lugar a especies reactivas con capacidad de dañar tejidos<sup>5</sup>. Además, el balance redox de la célula es regulado por varios mecanismos que contrarrestan a las especies oxidantes pero al mismo tiempo mantienen el potencial redox dentro de cierto rango. Varias moléculas dentro de la célula se pueden encontrar en más de un estado de oxidación, cuya relación de masas cambia con el potencial redox, por ejemplo el glutatión, un tiol de bajo peso molecular, puede encontrarse con su grupo tiol libre (GSH) o formando enlace disulfuro con otra molécula de glutatión (GSSG), y de esa forma se encuentra en equilibrio como el par GSSG/2GSH, al igual que varias proteínas que contienen tioles. Por ese efecto, entre otros, el balance redox juega un rol fisiológico muy importante, particularmente en la señalización intracelular (de la que algunas especies oxidantes participan), y su perturbación tanto a favor del estado oxidado por especies oxidantes, como a favor del estado reducido por antioxidantes, puede producir efectos fisiológicos negativos<sup>6,7</sup>.

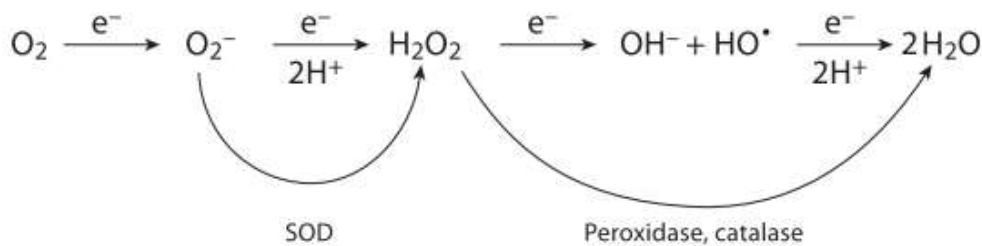
Las terapias antioxidantes que se comenzaron a pensar como continuación natural de los primeros descubrimientos aún no han tenido aplicaciones concretas, a pesar de sí haber contado con una amplia difusión y comercialización en el público general. Esto se debe en parte a la complejidad de las interacciones de las especies reactivas en las células, sus roles en la señalización y la complejidad de los mecanismos adaptativos de las células a la presencia de oxidantes o antioxidantes, entre otras razones. Incluso existe evidencia de que el estrés oxidativo puede en determinadas condiciones aumentar la longevidad<sup>7,8</sup>.

#### **b) Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno:**

Los términos especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (ROS y RNS respectivamente por sus siglas en inglés) se refieren a un grupo de moléculas derivadas del  $O_2$  y del  $\cdot NO$ , incluyendo radicales libres, y que en su mayoría actúan como oxidantes en el ambiente biológico<sup>9</sup>. Los radicales libres son moléculas que cuentan con electrones desapareados en sus orbitales moleculares<sup>6</sup>.

### i) Oxígeno:

En su estado energético basal, el  $O_2$  cuenta con dos electrones desapareados y de spin paralelo. Algunas de las características que le confiere esta estructura electrónica son el paramagnetismo (momento magnético permanente), una barrera energética para reaccionar con moléculas no paramagnéticas (restricción de spin), y una predisposición a reducirse por un camino univalente, aceptando electrones de a uno a la vez (**figura 2.1**), debido a que los primeros dos electrones que acepta deben tener el mismo momento de spin. De esa forma se generan especies reactivas como intermediarios de la reducción del oxígeno molecular a agua<sup>10</sup>. En la fosforilación oxidativa celular se reduce el  $O_2$  a agua, mediante una cadena de transporte de electrones que lo reduce por un electrón a la vez. En este proceso se generan los intermediarios reactivos de la reducción univalente del oxígeno, pero estos son retenidos fuertemente para evitar su liberación al entorno<sup>11</sup>. Sin embargo, un bajo porcentaje del  $O_2$  consumido por la célula (aproximadamente 0,1%) se reduce a  $O_2^{\cdot-}$  que luego es liberado y puede reaccionar de varias formas<sup>10</sup>.



**Figura 2.1. Reducción secuencial de oxígeno a agua, y especies intermediarias. Modificado de <sup>10</sup>.**

### ii) Radical Superóxido:

En condiciones normales el  $O_2^{\cdot-}$  es generado principalmente en la cadena respiratoria, a partir de la reducción por un electrón del  $O_2$ , aunque también puede ser generado por otros medios, como por las enzimas NADPH oxidasa (NOX) y xantina oxidasa (XO)<sup>12</sup>. Esta molécula resulta inestable en solventes próticos y puede sufrir dismutación espontánea, aunque esta se ve desfavorecida a pH neutro ya que tiene un pKa de 4,8 y las moléculas de  $O_2^{\cdot-}$  se repelen electrostáticamente entre ellas, a diferencia de su ácido conjugado, el radical hidroperoxilo ( $HO_2^\cdot$ )<sup>10</sup>. Químicamente puede actuar como oxidante o como reductor, como indican sus potenciales redox de un electrón  $E'_0(O_2/O_2^{\cdot-}) = -0,33V$  y  $E'_0(O_2^{\cdot-}/H_2O_2) = 0,94V$ , y su capacidad de reducir al citocromo c, aunque en el ambiente celular reducido su rol oxidante es más significativo<sup>10,13,14</sup>.

Biológicamente es importante señalar que, al igual que para otros aniones, las bicapas lipídicas tienen una baja permeabilidad para el  $O_2^{\cdot-}$ , en cuanto que para su ácido conjugado,  $HO_2^\cdot$ , tienen una permeabilidad similar a la del agua, y

aparentemente la mayor parte del transporte a través de la bicapa se da en la forma neutra<sup>15</sup>. Sin embargo, también se ha demostrado que puede atravesar membranas biológicas a través de canales aniónicos, como los que están presentes en abundancia en la membrana plasmática de los eritrocitos<sup>16</sup>.

Dentro de la célula el principal destino del  $O_2^{\cdot-}$  es su dismutación catalizada por las SOD, que tienen constantes de velocidad mayores a  $10^9 M^{-1}s^{-1}$  (de las más altas conocidas para una reacción enzimática) y se encuentran en concentraciones intracelulares relativamente altas, superiores a  $10 \mu M$ , por lo que cualquier otra reacción relevante debe ser suficientemente rápida para poder competir con esta vía. Una de esas es la reacción con el radical  $\cdot NO$  (que se analizará más adelante en detalle) con una constante de velocidad en el entorno de  $4-16 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ , para dar peroxinitrito ( $ONOO^-/ONOOH$ )<sup>17</sup>. Otro blanco biológico del  $O_2^{\cdot-}$  es el grupo prostético  $[4Fe-4S]^{2+}$  presente en algunas deshidratasas, con quien puede reaccionar con constantes de velocidad en el orden de  $10^7 M^{-1}s^{-1}$ , y con posterior pérdida de  $Fe^{2+}$  del cluster. Dentro de estas enzimas un blanco biológico relevante es la enzima aconitasa, que cataliza la conversión de citrato a isocitrato en el ciclo del ácido cítrico, y en células eucariotas se encuentra en la mitocondria, próxima al sitio de generación de  $O_2^{\cdot-}$ <sup>18,19</sup>.

### **iii) Óxido Nítrico:**

El  $\cdot NO$  es un radical libre, gaseoso en estado puro, con un electrón desapareado en un orbital  $\pi^*$  (pi antienlazante), lo que le confiere un orden de enlace de 2,5 entre los átomos de nitrógeno y oxígeno. Este electrón se encuentra deslocalizado entre los dos átomos, lo que le confiere a esta molécula una reactividad general relativamente baja. Al igual que muchos otros gases tiene carácter hidrofóbico, que a nivel biológico le significa poder atravesar fácilmente las membranas. Su pequeño tamaño le confiere una alta velocidad de difusión, que acompañada con su capacidad de cruzar membranas y su vida media relativamente alta, hacen que tenga la capacidad de difundir a distancias considerables de su sitio de generación ( $100-200 \mu m$ )<sup>20</sup>.

En los sistemas biológicos la mayor parte del  $\cdot NO$  es producido a partir del aminoácido L-arginina por las óxido nítrico sintasas (NOS por sus siglas en inglés), en una reacción que emplea 5 electrones provenientes de NADPH, varios cofactores,  $O_2$ , y tiene también a la citrulina como producto. Se conocen tres isoenzimas en la familia de las NOS, la endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS) que son constitutivas y reguladas por la presencia de  $Ca^{2+}$ , y la inducible (iNOS) que está relacionada al sistema inmune y es inducida por diversos estímulos, produciendo altas cantidades de  $\cdot NO$ <sup>20</sup>.

La reactividad del  $\cdot NO$  es específica hacia otras especies paramagnéticas, como otros radicales libres y los centros metálicos en proteínas, y suele estar mediada por la formación de enlaces covalentes<sup>21,22</sup>. Sus potenciales de reducción para las

reacciones  $\cdot\text{NO}, \text{H}^+/\text{NOH}$  y  $\cdot\text{NO}/\text{}^3\text{NO}^-$  son  $-0,55\text{V}$  (vs ENH, pH 7) y  $-0,8$  (vs ENH) respectivamente, lo que hace a la reducción del  $\cdot\text{NO}$  (y por ende su rol como oxidante) una reacción poco probable en el contexto biológico<sup>23</sup>. A su vez, los efectos bioquímicos del  $\cdot\text{NO}$  se pueden clasificar como directos (cuando reacciona directamente con un blanco biológico) o indirectos (mediados por las especies reactivas que se generan de sus reacciones con  $\text{O}_2$  o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), siendo los primeros predominantes cuando se encuentra en concentraciones bajas, y los segundos cuando se produce en cantidades altas<sup>22</sup>.

Dentro de sus efectos directos biológicamente relevantes, se encuentran sus reacciones con centros metálicos como el de la guanilato ciclasa, con el que forma un complejo Fe-nitrosilo que activa a la enzima, para lo que se requieren concentraciones bajas de  $\cdot\text{NO}$  ( $\text{EC}_{50}=100$  nm). Esta enzima es mediadora de la mayoría de los efectos fisiológicos del  $\cdot\text{NO}$ , incluyendo la agregación plaquetaria, la relajación vascular y la neurotransmisión<sup>24</sup>. Esta reacción también es la base de un mecanismo de feedback negativo en las NOS, mediante el cual la unión del  $\cdot\text{NO}$  presente en el medio a un grupo hemo de la enzima genera una pérdida de actividad, con valores  $\text{IC}_{50}$  del donador de  $\cdot\text{NO}$ , S-nitroso-N-penicilamina, calculados en  $1800$   $\mu\text{M}$  para iNOS,  $200$   $\mu\text{M}$  para eNOS y  $51$   $\mu\text{M}$  para nNOS, consistentes con las funciones fisiológicas de cada isoforma<sup>25</sup>. El  $\cdot\text{NO}$  también puede reaccionar con complejos oxo-metálicos, siendo una de las más importantes su reacción con la oxihemoglobina para dar metahemoglobina y nitrato, que debido a la velocidad de la reacción y la abundancia de oxihemoglobina en la sangre, es uno de sus principales destinos metabólicos. Además tiene la capacidad de reaccionar con complejos metálicos de alta valencia (generados por oxidantes como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y reducirlos, ejerciendo un efecto protector al evitar que estos oxiden a otras moléculas biológicas<sup>24</sup>. La capacidad del  $\cdot\text{NO}$  de unir tanto centros reducidos como oxidados se debe a que es lo que se considera un ligando anfotérico, pudiendo comportarse como  $\text{NO}^+$  o como  $\text{NO}^-$  cuando es ligando de un centro metálico<sup>23</sup>.

Sus reacciones con otros radicales libres son de alta velocidad. Puede reaccionar con radicales centrados en átomos de carbono para dar derivados C-nitroso (ej. con radical tirosilo para dar nitroso-tirosina (Tyr-NO)), centrados en átomos de sulfuro para dar derivados S-nitroso (ej. con radical glutatiónilo para dar GSNO), y con radicales centrados en átomos de oxígeno (ej. con radical lipoperoxilo para dar LOONO). Algunas de estas reacciones parecen ser relevantes como mecanismos de señalización (la formación de nitrosotioles), y otras como mecanismos antioxidantes (la interrupción de la cadena de lipoperoxidación), por lo que la bioquímica del  $\cdot\text{NO}$  también está mediada por este tipo de reacciones. Otra reacción radicalaria en la que puede participar es la ya mencionada combinación con  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para dar  $\text{ONOO}^-$ , que puede luego dar lugar a varios radicales libres, como  $\cdot\text{OH}$ , dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ), y radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ )<sup>24,26,27</sup>. Otro grupo de reacciones de las que participa el  $\cdot\text{NO}$  y que dan lugar a especies reactivas son



algunas reacciones con oxígeno, que generan especies reactivas como el  $\cdot\text{NO}_2$ , trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) y tetraóxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_4$ )<sup>20,24</sup>.

#### iv) Peroxinitrito:

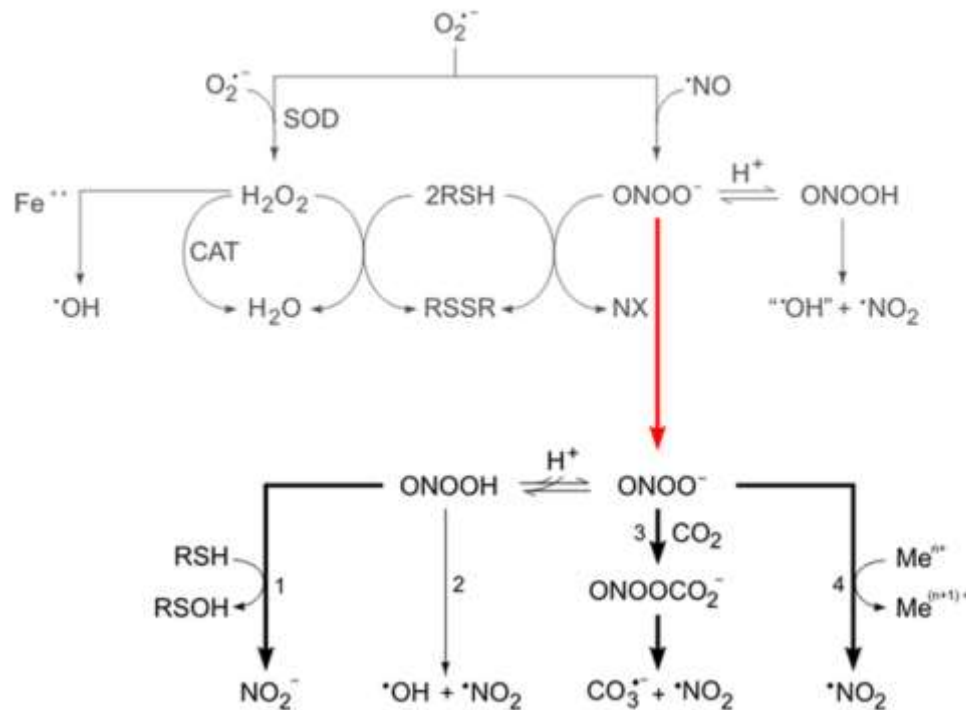
El  $\text{ONOO}^-$  es, como se mencionó previamente, el producto de la reacción entre  $\cdot\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (**figura 2.2**). Químicamente también puede producirse mediante la reacción entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en medio ácido, y efectivamente esta molécula ha sido sintetizada y estudiada décadas antes de que se postule su formación en medios biológicos, incluso proponiéndose en 1952 su descomposición por homólisis a  $\cdot\text{OH}$  y  $\cdot\text{NO}_2$  (que sería tema de controversia varias décadas después), y existiendo posteriormente estudios de su fisicoquímica y cinética que pudieron ser utilizados en los primeros estudios de su rol biológico<sup>28,29</sup>.

En 1990 Joseph Beckman publicó un artículo proponiendo al  $\text{ONOO}^-$  como una especie mediadora de la citotoxicidad del  $\cdot\text{NO}$  y el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , y cuya formación explicaría el aumento en la vida media del  $\cdot\text{NO}$  en presencia de SOD, y parte de la citotoxicidad observada para esos dos radicales libres de reactividad relativamente baja<sup>30</sup>. Luego se continuó con estudios sobre las modificaciones oxidativas que esta especie es capaz de generar sobre las biomoléculas, entre las que se encontraron la lipoperoxidación, la oxidación de tioles biológicos y la nitración de residuos de tirosina, modificaciones que también se hallan presentes *in vivo*<sup>31-33</sup>. Sin embargo, dado su carácter de especie transitoria, no ha sido posible medir de forma inequívoca la formación de  $\text{ONOO}^-$  en sistemas biológicos, y aunque la evidencia de su formación *in vivo* y su posible rol en diversas patologías es extensa, es también indirecta, lo que ha concitado algunas dudas sobre su rol como agente patológico<sup>17</sup>.

Dado que el  $\cdot\text{NO}$  tiene una gran capacidad para difundir en el contexto biológico, y que por el contrario  $\text{O}_2^{\cdot-}$  tiene una capacidad limitada de difundir por la alta velocidad de sus reacciones con la SOD y la dificultad que tiene para cruzar membranas, se suele asumir que los sitios donde se genera  $\text{ONOO}^-$  son los que se encuentran cercanos a las fuentes de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , y también en el mismo compartimento que estas<sup>34</sup>.

Como se observa en la **figura 2.2**, el  $\text{ONOO}^-$  es la base conjugada del ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), con quien coexiste en solución. El  $\text{ONOOH}$  tiene un pKa de 6,8 que indica que a pH fisiológico de 7,4 (y en el pH ácido de los fagosomas) ambas especies se encuentran presentes. Esto es relevante debido a que las dos especies tienen reactividades y propiedades fisicoquímicas diferentes, y ambas deben ser consideradas en el contexto biológico<sup>35</sup>. Su capacidad de dar lugar a modificaciones oxidativas puede darse por dos vías; mediante la generación de radicales libres secundarios (por la homólisis del  $\text{ONOOH}$  o del aducto que se forma entre el  $\text{ONOO}^-$  y el  $\text{CO}_2$ ), o mediante reacción directa<sup>36</sup>. Los potenciales de reducción de uno y dos electrones del peroxinitrito son  $E'_0(\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+ /$

$NO_2^{\cdot}, H_2O) = 1,6-1,7V$  y  $E'_0(ONOO^{\cdot}, 2H^+/NO_2^{\cdot}, H_2O) = 1,3-1,37V$ , lo que lo hace un buen oxidante biológico<sup>37</sup>.



**Figura 2.2. Esquema de las principales reacciones que involucran al peroxinitrito. Extraído de <sup>35</sup>.**

El ONOOH es inestable en solución, debido a que se degrada espontáneamente a nitrato ( $NO_3^-$ ) y a los radicales  $^{\cdot}OH$  y  $^{\cdot}NO_2$ , con un rendimiento de producción de radicales de  $\sim 30\%$ . Ambas vías de descomposición comparten un paso en común, la formación de un a caja de solvente conteniendo un par de radicales que pueden recombinarse para dar  $NO_3^-$  o separarse para quedar libres en solución<sup>28,38,39</sup>. El decaimiento del ONOOH hacia esas vías tiene una constante de velocidad de  $1,25\text{ s}^{-1}$  a  $25\text{ }^{\circ}C$  y de  $4,5\text{ s}^{-1}$  a  $37\text{ }^{\circ}C$ , por lo que a  $pH=7,4$  en que sólo  $20\%$  del peroxinitrito se encuentra en su forma protonada, la constante de decaimiento aparente es de  $0,26\text{ s}^{-1}$  a  $25\text{ }^{\circ}C$  y de  $0,9\text{ s}^{-1}$  a  $37\text{ }^{\circ}C$  (por lo que la vida media del peroxinitrito en solución acuosa de  $pH\ 7,4$  y  $37\text{ }^{\circ}C$  es de  $0,8\text{ s}$ ) <sup>35,36,40</sup>. Esto convierte a la vía de la homólisis del ONOOH en un camino poco probable en el contexto biológico, donde la reacción del  $ONOO^{\cdot}$  con diversas especies se da a mayor velocidad (por ejemplo, con el  $CO_2$ ), aunque se ha propuesto la posibilidad de que esta reacción puede ser relevante en compartimentos específicos, como en el ambiente hidrofóbico de las membranas biológicas o en ambientes ácidos<sup>17,41</sup>.

El  $ONOO^{\cdot}$  reacciona directamente con varias moléculas abundantes en el medio biológico, a velocidades altas que generan un consumo muy veloz del  $ONOO^{\cdot}$  por estas vías. Una de las más relevantes es su reacción con el  $CO_2$  disuelto en equilibrio con  $H_2CO_3$  (**figura 2.2**), debido a que se encuentra en concentraciones altas en los sistemas biológicos ( $[CO_2] \sim 1,3\text{ mM}$  en el medio extracelular). La

reacción de adición nucleofílica del anión  $\text{ONOO}^-$  al  $\text{CO}_2$  tiene una constante de velocidad de segundo orden independiente del pH de  $(5,8 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ , y una constante aparente de  $4,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{pH}=7^{36,42,43}$ . El producto de esta reacción es el aducto  $\text{ONOOC(O)O}^-$  que, de forma similar al  $\text{ONOOH}$ , genera el par radical  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  y  $\cdot\text{NO}_2$  en una caja de solvente, a partir de la cual pueden separarse para generar los radicales libres oxidantes, o recombinarse en un intermediario que luego se descompone a  $\text{CO}_2$  y  $\text{NO}_3^-$ , con rendimientos de  $\sim 33\%$  para la primera vía y  $\sim 66\%$  para la segunda<sup>44</sup>. Esta vía de consumo de  $\text{ONOO}^-$  no disminuye su efecto oxidante global, ya que produce especies altamente reactivas con capacidad de reaccionar con otras moléculas, por lo que se puede decir que su efecto es el de redireccionar la química del  $\text{ONOO}^-$  a favor de una mediada por los radicales en desfavor de sus reacciones directas y de la homólisis del  $\text{ONOOH}$ . Un ejemplo es el efecto del  $\text{CO}_2$  en las modificaciones producidas por peroxinitrito sobre la Glutamina Sintetasa de *Escherichia coli*, que consiste en favorecer la oxidación por un electrón de la tirosina, aumentando su nitración, a la vez que disminuye la oxidación de dos electrones de la metionina por reacción directa con peroxinitrito<sup>45</sup>.

Otro grupo químico que reacciona de forma directa con el peroxinitrito son los tioles (-SH), tanto de bajo peso molecular como los de algunas proteínas. Estos reaccionan con el  $\text{ONOOH}$  mediante un ataque nucleofílico del tiolato a uno de los oxígenos del enlace O-O, siendo oxidados por dos electrones para dar el ácido sulfénico (-SOH) correspondiente, que puede reaccionar con otro tiol para dar un enlace disulfuro, y generando además  $\text{NO}_2^-$  por la reducción del  $\text{ONOOH}$ <sup>17,32,36,46</sup>. Las constantes de reacción aparentes a  $\text{pH}=7,4$  y  $37^\circ\text{C}$  del peroxinitrito con cisteína y el tiol de la BSA (seroalbúmina bovina) son superiores a  $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , tres órdenes de magnitud más rápidas que las oxidaciones de los mismos tioles por  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>32,35</sup>. Un grupo de enzimas, las peroxirredoxinas, contienen tioles que reaccionan particularmente rápido con peroxinitrito y parecen ser uno de los principales destinos biológicos de éste. Al igual que para los otros tioles, la reacción es un ataque nucleofílico del tiolato al  $\text{ONOOH}$ , pero estas reacciones cuentan con constantes de velocidad muy altas, y esta es una vía de eliminación del peroxinitrito, ya que estas enzimas pueden volver a su estado original (ej. la peroxirredoxina 5 reacciona con una constante de velocidad aparente de  $7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $\text{pH}=7,4$  y  $37^\circ\text{C}$ )<sup>17,47</sup>.

Otro grupo de reacciones directas relevantes del peroxinitrito son las reacciones con metales de transición acomplejados, que pueden ser de gran velocidad. Estas reacciones son variadas debido a las diferencias químicas entre los distintos grupos metálicos. Por ejemplo, distintas hemoproteínas pueden tener distintas reacciones con el peroxinitrito, pudiendo oxidarse por dos electrones para dar como productos nitrito y el compuesto I de la hemoproteína (ej. peroxidasa de rábano), oxidarse por un electrón para dar el compuesto II de la hemoproteína y  $\cdot\text{NO}_2$  (ej. mieloperoxidasa), catalizar la isomerización del peroxinitrito a  $\text{NO}_3^-$  (ej.

oxihemoglobina y metahemoglobina), o no presentar ninguna reacción detectable (ej. catalasa)<sup>17</sup>.

#### v) **Dióxido de nitrógeno:**

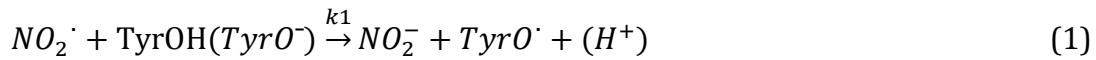
El  $\cdot\text{NO}_2$  es un gas poco soluble en agua, con un potencial de reducción por un electrón relativamente alto, de  $E'_0(\text{NO}_2/\text{NO}_2^-) = 0,99\text{V}$  que lo convierte en una molécula fuertemente oxidante pero con cierta selectividad. En solución puede reaccionar con otra molécula idéntica con una constante de reacción alta de  $4,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para dar el dímero  $\text{N}_2\text{O}_4$  que es más soluble, y que reacciona con agua para descomponerse en  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ . Sin embargo a las concentraciones biológicamente relevantes de  $\cdot\text{NO}_2$  la dimerización no se considera una ruta relevante por la concentración mucho mayor de otros blancos. Los tipos de reacciones de las que participa son de recombinación con otros radicales, adición a dobles enlaces, transferencia de electrones y abstracción de un átomo de hidrógeno de diferentes blancos<sup>48</sup>.

**Tabla 2.I. Constantes de reacción para el dióxido de nitrógeno con distintas biomoléculas. Extraído de <sup>49</sup>.**

Reacción	pH	k ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
$\text{NO}_2\cdot + \text{Gly-TyrOH} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{Gly-TyrO}\cdot + (\text{H}^+)$	7,5	$3,5 \times 10^5$
$\text{NO}_2\cdot + \text{Gly-TyrOH} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{Gly-TyrO}\cdot + (\text{H}^+)$	11,3	$2,7 \times 10^7$
$\text{NO}_2\cdot + \text{CysSH} \rightarrow \text{CysS}\cdot + \text{NO}_2^-$	9,2	$2,4 \times 10^8$
$\text{NO}_2\cdot + \text{Gly-Trp} \rightarrow \text{Gly-Trp}\cdot + \text{NO}_2^-$	6,5	$\sim 10^6$
$\text{NO}_2\cdot + \text{Gly-Met} \rightarrow \text{No se detectó}$	6,2	No detectado
$\text{NO}_2\cdot + \text{Ácido Linoleico(en solución)}$ $\rightarrow (\text{Adición al doble enlace ó abstracción de H})$	9,5	$\sim 2 \times 10^5$
$\text{NO}_2\cdot + \text{Ácido Araquidónico(en solución)}$ $\rightarrow (\text{Adición al doble enlace ó abstracción de H})$	9,0	$\sim 10^6$

La capacidad del  $\cdot\text{NO}_2$  de oxidar a la tirosina ya había sido estudiada por Walter Prütz a mediados de los 80, en el marco de la investigación del posible efecto biológico de este contaminante ambiental. En sus experimentos, Prütz observó que la generación de radicales  $\cdot\text{NO}_2$  en presencia de tirosina da lugar a los productos di-tirosina y orto-nitrotirosina con un alto rendimiento, y proponiendo desde entonces el mecanismo dado por las reacciones (1) y (2)<sup>50</sup>. Luego caracterizó cinéticamente estas reacciones, observando que la velocidad de la reacción (1) a 20 °C para el dipéptido Gly-Tyr es dependiente del pH, con  $k_1 = 2,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH=11,3 y  $k_1 = 3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH=7,5, y estimó que  $k_2 \sim 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  en esas

condiciones. Además pudo estudiar las reacciones entre el  $\cdot\text{NO}_2$  y otras moléculas biológicas, como se muestra en la **tabla 2.I**<sup>49</sup>.



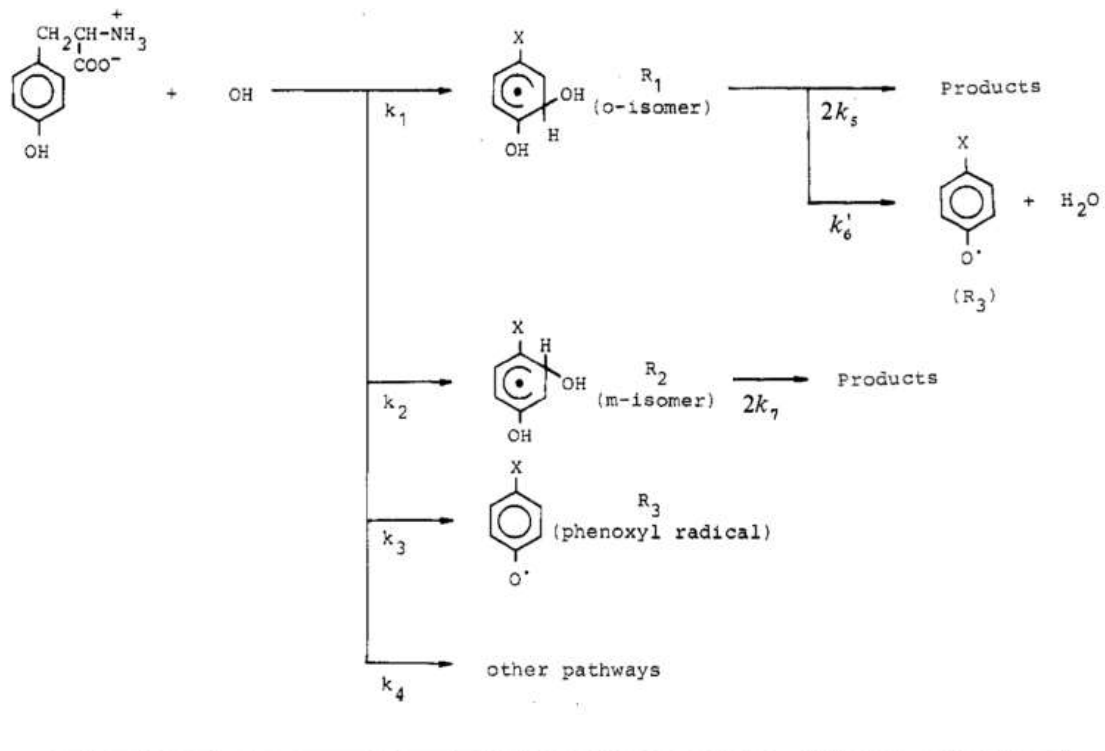
Las posibles fuentes biológicas de  $\cdot\text{NO}_2$  son la auto-oxidación del  $\cdot\text{NO}$  (que es acelerada por la presencia de membranas lipídicas en las que se concentran el óxido nítrico y el oxígeno), la descomposición del ONOOH y del aducto ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>, y la oxidación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por grupos hemo como el presente en la enzima mieloperoxidasa (MPO) o la hemoglobina<sup>20,51,52</sup>.

#### vi) **Radical hidroxilo:**

El radical hidroxilo es un fuerte oxidante, reaccionando con constantes de velocidad del orden de  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  con varias biomoléculas, aunque esta gran reactividad también le confiere una baja selectividad en sus reacciones en el medio biológico<sup>12</sup>. Su reactividad con la tirosina se observa en la **figura 2.3**, y puede involucrar la abstracción de un átomo de hidrógeno para dar radical tirosilo, o su ataque sobre el anillo aromático para formar aductos en posición meta u orto, de los que el segundo puede decaer a radical tirosilo mediante pérdida de agua, o estabilizarse mediante la pérdida de un electrón para dar 3-hidroxitirosina, entre otras reacciones. La reacción directa de abstracción de un átomo de hidrógeno tiene una  $k=(6\pm 1)\times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , aproximadamente un 5% de la sumatoria de las constantes de velocidad del radical hidroxilo con tirosina. Sin embargo, el producto mayoritario de la reacción de las dos especies en solución, el aducto en posición orto, decae a radical tirosilo con una constante de velocidad de  $1,8\times 10^4 \text{ s}^{-1}$  que en ausencia de vías para la estabilización, es una vía significativa<sup>52,53</sup>.

Este radical puede generarse mediante la homólisis del peroxinitrito como se mencionó previamente, o mediante la reacción de Fenton, en la que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es reducido por ion ferroso (Fe<sup>2+</sup>) para dar OH<sup>-</sup>, OH<sup>·</sup> y ion férrico (Fe<sup>3+</sup>) (reacción 3). El Fe<sup>2+</sup> se puede regenerar a partir de la reducción del Fe<sup>3+</sup>, que puede ser mediado por ejemplo por O<sub>2</sub><sup>-·</sup> (reacción a la que se atribuyó inicialmente gran parte de su toxicidad) y ácido ascórbico. La mayor parte del hierro está unido a proteínas, por lo que la cantidad de hierro libre capaz de catalizar esta reacción *in vivo* es muy baja, sin embargo otros metales como el cobre también pueden catalizar la reacción, y en situaciones de estrés se pueden liberar átomos de hierro, como por ejemplo el liberado de los centros [4Fe-4S]<sup>2+</sup> por acción del radical superóxido, aunque en condiciones fisiológicas normales no está clara la relevancia de la producción de OH<sup>·</sup> por la reacción de Fenton<sup>6,54</sup>.





$k, \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$		
transients	formation	decay
$R_1$	$k_1 = (7.0 \pm 0.5) \times 10^9$	$2k_5 = (3.0 \pm 1.0) \times 10^8$ $k'_6 = (1.8 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ }^a$
$R_2$	$k_2 = (5.0 \pm 0.4) \times 10^9$	$2k_7 = (2.0 \pm 0.5) \times 10^9$
$R_3$	$k_3 = (6.0 \pm 1.0) \times 10^8$ $k'_6 = (1.8 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ }^a$	

<sup>a</sup>  $k'$  is given in  $\text{s}^{-1}$ .

Figura 2.3. Reacciones entre el radical hidroxilo y la tirosina. Modificado de <sup>53</sup>.

**vii) Radical anión carbonato:**

El radical  $\text{CO}_3^{\cdot -}$  es un oxidante fuerte, con un potencial de reducción a  $\text{pH}=7$  y  $25^\circ\text{C}$  estimado en  $E'_0(\text{CO}_3^{\cdot -}, \text{H}^+/\text{HCO}_3^-) = 1,78\text{V}$ . Este radical, al igual que los vistos previamente, puede reaccionar mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno o transferencia de un electrón, aunque a diferencia de los otros, no produce aductos estables por su adición a otras moléculas. Su reacción con los tioles puede darse por ambos mecanismos, estando la preferencia probablemente determinada por el  $\text{pH}$ . Su reacción con la tirosina probablemente se dé mediante la abstracción de un átomo de H, aunque también puede reaccionar con los fenolatos por lo que parece ser la formación de un aducto como intermediario. Además puede reaccionar con diferentes centros metálicos. Al tratarse de un ácido fuerte se encuentra cargado a cualquier  $\text{pH}>0$ , por lo que probablemente no sea un oxidante de lípidos en membranas. Su principal fuente biológica es la descomposición del aducto formado entre el  $\text{ONOO}^-$  y el  $\text{CO}_2$ <sup>48</sup>. Puede reaccionar con la tirosina para generar radical tirosilo ( $\text{TyrO}^\cdot$ ) con una constante de velocidad de  $4,5 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .<sup>55</sup>

### c) Antioxidantes:

Los antioxidantes se pueden definir como un grupo de moléculas con la capacidad de disminuir, retrasar, o evitar la oxidación de otras moléculas. La clasificación de moléculas como antioxidantes y su comparación no es del todo simple, por ejemplo, los ensayos para medir poder antioxidante suelen ser ensayos *in vitro*, que en su globalidad son químicamente muy diferentes al ambiente redox *in vivo*. Además, la multiplicidad de interacciones dificulta esta clasificación, como es el ejemplo de la vitamina C, que actúa como reductor y por lo tanto se puede pensar a priori que es un antioxidante, pero también puede reducir al  $\text{Fe}^{3+}$  y hacer posible la producción de radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton<sup>56</sup>. A grandes rasgos las moléculas antioxidantes se pueden clasificar como de alto peso molecular (enzimas) y de bajo peso molecular, con alta y baja especificidad respectivamente<sup>6</sup>. A continuación se describen algunas moléculas con poder antioxidante, profundizando en la vitamina E que es relevante en membranas.

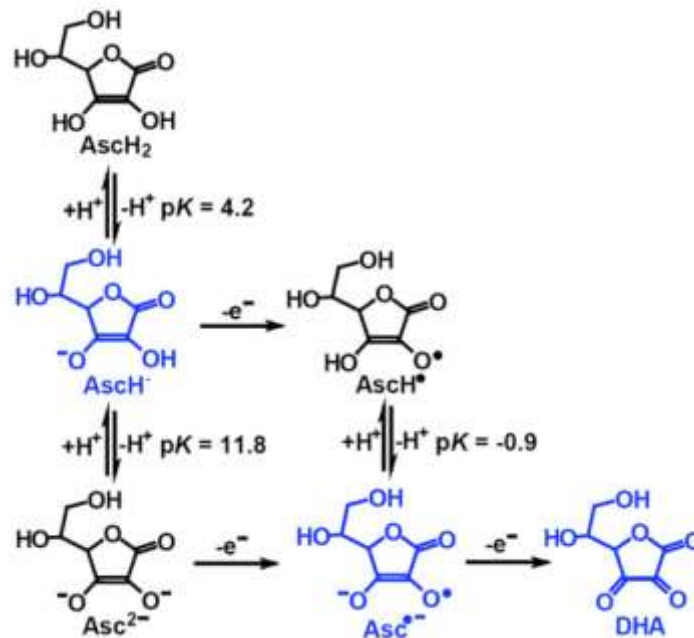
#### i) Ácido ascórbico:

El ácido ascórbico, o vitamina C, es una cetolactona soluble en agua, con dos grupos hidroxilo ionizables, con un  $\text{pK}_{a1}=4,2$  y un  $\text{pK}_{a2}=11,6$ , por lo que a pH fisiológico se encuentra principalmente en su forma monoaniónica. Puede sufrir dos oxidaciones consecutivas de un electrón, dando primero el radical ascorbato y luego ácido deshidroascórbico (DHA), como se observa en la **figura 2.4**. El radical ascorbato es estable debido a la deslocalización por resonancia de su electrón  $\pi$  desapareado, lo que explica su baja reactividad. Este radical puede sufrir dismutación espontánea a pH=7 con una  $k_{\text{obs}}=2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (una reacción relativamente lenta si se toma en cuenta que depende del cuadrado de la concentración del radical). Vale la pena mencionar que los humanos no tienen capacidad de sintetizar ácido ascórbico, y que en estudios de cultivos de células humanas, si este no es agregado al medio no estará presente en las células<sup>57</sup>.

El reciclaje del radical y del DHA a ascorbato se puede dar por varias vías, habiendo varias enzimas capaces de reducir el radical ascorbato por un electrón para dar ascorbato nuevamente (ej. NADH-citocromo  $b_5$  reductasa, radical ascorbato reductasa de la membrana plasmática, y tioredoxinas), y otro tanto capaces de reducir al DHA (inestable a pH fisiológico y 37 °C) nuevamente a ascorbato, además de la reacción directa de dos electrones entre el GSH y el DHA<sup>57</sup>.

Su concentración en tejidos es variable, con niveles en plasma de 40-80  $\mu\text{M}$  y cercanos o superiores a 1 mM en algunos tipos celulares (ej. glía y algunas neuronas). Termodinámicamente puede donar electrones fácilmente a especies potencialmente dañinas como  $\cdot\text{OH}$  ( $k=3,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ),  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  ( $k=1,1 \times 10^9$  a pH=11),  $\cdot\text{NO}_2$  ( $k=3,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ),  $\text{GS}^{\cdot}$  ( $k=6,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) entre otras. Además se piensa que actúa reciclando a la vitamina E, al reducir al radical tocoferoxilo formado luego de la oxidación por un electrón del tocoferol, formando de esta forma una dupla

sinérgica con este antioxidante presente en membranas y en la lipoproteína de baja densidad (LDL)<sup>57</sup>. Además es capaz de reducir al radical tirosilo, formado por las especies reactivas, para generar tirosina nuevamente, con una constante de velocidad de  $4,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , y en una mezcla de GSH y ascorbato en concentraciones biológicamente relevantes se vió que el ácido ascórbico es el reparador preferente del radical tirosilo<sup>58,59</sup>.



**Figura 2.4. Estructura de la vitamina C.** En azul se muestran las principales especies del medio biológico: Ascorbato (AscH<sup>-</sup>), radical ascorbato (Asc<sup>•</sup>), ácido deshidroascórbico (DHA). Modificado <sup>57</sup>.

## ii) Glutación:

El tripéptido  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, o GSH, es un péptido no proteico, debido a que el enlace entre el residuo de glutamato y el de la cisteína no es un enlace peptídico, propiedad que le confiere estabilidad y resistencia a la degradación. Su concentración en la matriz extracelular es baja, al contrario de su concentración intracelular, que varía en el entorno de 0,5-12 mM, encontrándose presente en el citosol, el retículo endoplásmico, el núcleo y en la mitocondria<sup>60</sup>.

El poder reductor del glutatión se debe al grupo tiol de su residuo de cisteína, y en condiciones fisiológicas la forma reducida es predominante sobre las oxidadas por un factor de entre 10 y 100 veces. Su principal efecto antioxidante directo *in vivo* se puede dar por la reacción directa con especies oxidantes, o actuando como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa (GPx). Ambas vías resultan en la producción de la forma oxidada GSSG (o del aducto formado entre el glutatión y otro tiol reactivo, GSSR), que es reducido nuevamente a GSH por la enzima glutatión reductasa (GR), utilizando electrones provenientes de NADPH<sup>61</sup>.

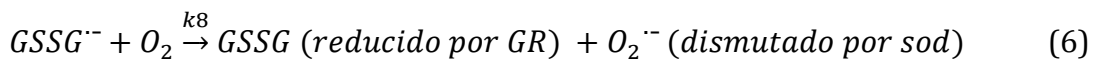


Su reacción directa de dos electrones con peroxinitrito tiene una constante de velocidad mucho menor que la de esa especie con la GPx ( $1,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH=7,4 y 37 °C, y  $8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH=7,4 y 25 °C respectivamente), sin embargo dada su alta concentración, hay casos en que la reacción directa con el GSH será preferente cinéticamente a la reacción con la enzima (por ejemplo en el interior del eritrocito), aunque la relevancia biológica de cualquiera de las dos vías aún no es clara<sup>17</sup>.

Su reacción con radicales libres oxidantes produce el radical inestable GS<sup>•</sup> (algunas constantes de velocidad para esta reacción se pueden ver en la **tabla 2.II**), que reacciona rápidamente con una molécula de GSH para dar la especie radical GSSG<sup>••</sup> ( $k_5=1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), que a su vez puede reaccionar con O<sub>2</sub> para producir GSSG y O<sub>2</sub><sup>••</sup> ( $k_6=1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), que puede ser dismutado por la SOD<sup>36,61,62</sup>. Este conjunto de reacciones fue propuesta como una importante vía de desintoxicación de radicales por Winterbourn en 1993 (denominada “radical sink hypothesis”), aunque consideraciones cinéticas que incluyen la reacción preferencial de los radicales con otras especies, y la presencia de ascorbato en sistemas biológicos reales, generan dudas sobre la relevancia de esta vía *in vivo*<sup>59,62</sup>.

**Tabla 1.II. Constantes de velocidad para la reacción del GSH con algunos radicales libres. Extraídas de** <sup>59,63</sup>.

Especie reactiva	$k_4 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$
$\cdot\text{NO}_2$	$2 \times 10^7$
OH <sup>•</sup>	$2,3 \times 10^{10}$
CO <sub>3</sub> <sup>••</sup>	$5,3 \times 10^6$
TyrO <sup>•</sup>	$\sim 2 \times 10^6$



### **iii) Tocoferoles y tocotrienoles:**

La denominada vitamina E no es una molécula, sino un grupo de 8 moléculas relacionadas llamadas tocoferoles y tocotrienoles, aunque dietéticamente las mayoritarias son el  $\alpha$ -tocoferol y el  $\gamma$ -tocoferol, y solo la primera es captada por el cuerpo humano<sup>64</sup>.

La química del  $\alpha$ -tocoferol ha sido ampliamente estudiada, no solamente debido al interés médico que genera, sino que también al interés industrial en su uso como molécula antioxidante en diversos productos. Su estructura, que se observa en la **figura 2.5**, consta de un anillo cromanol con un grupo hidroxilo que puede donar

su átomo de hidrógeno (el determinante de la actividad antioxidante de esta molécula), y una cola hidrocarbonada saturada. La estructura del anillo cromanol le confiere características químicas que lo convierten en un excelente donante de su átomo de hidrógeno, al estabilizar por efecto estereoelectrónico al radical tocoferoxilo generado por su oxidación. Los sustituyentes metilo en el anillo aromático estabilizan al radical por su efecto inductivo dador de electrones (el  $\alpha$ -tocoferol es el más sustituido y el más reactivo de los tocoferoles), y el oxígeno en posición *para* estabiliza por efecto resonante dador de electrones. El efecto del oxígeno en posición *para* es maximizado por la restricción conformacional que le significa ser parte de un heterociclo, debido a que los orbitales de sus electrones no enlazantes se encuentran con una orientación espacial óptima para la estabilización del radical, lo que explica la excepcional reactividad de este grupo fenólico<sup>65</sup>.

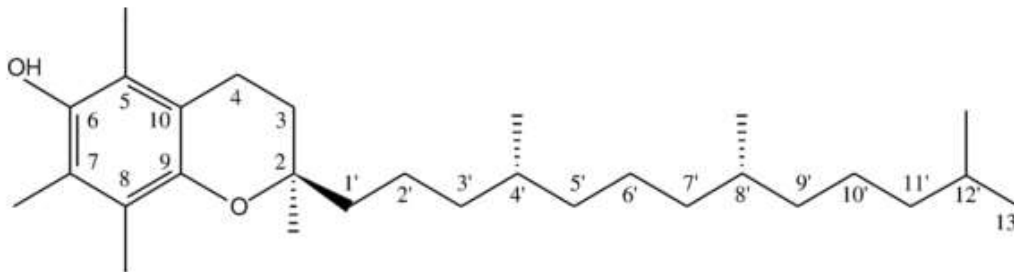
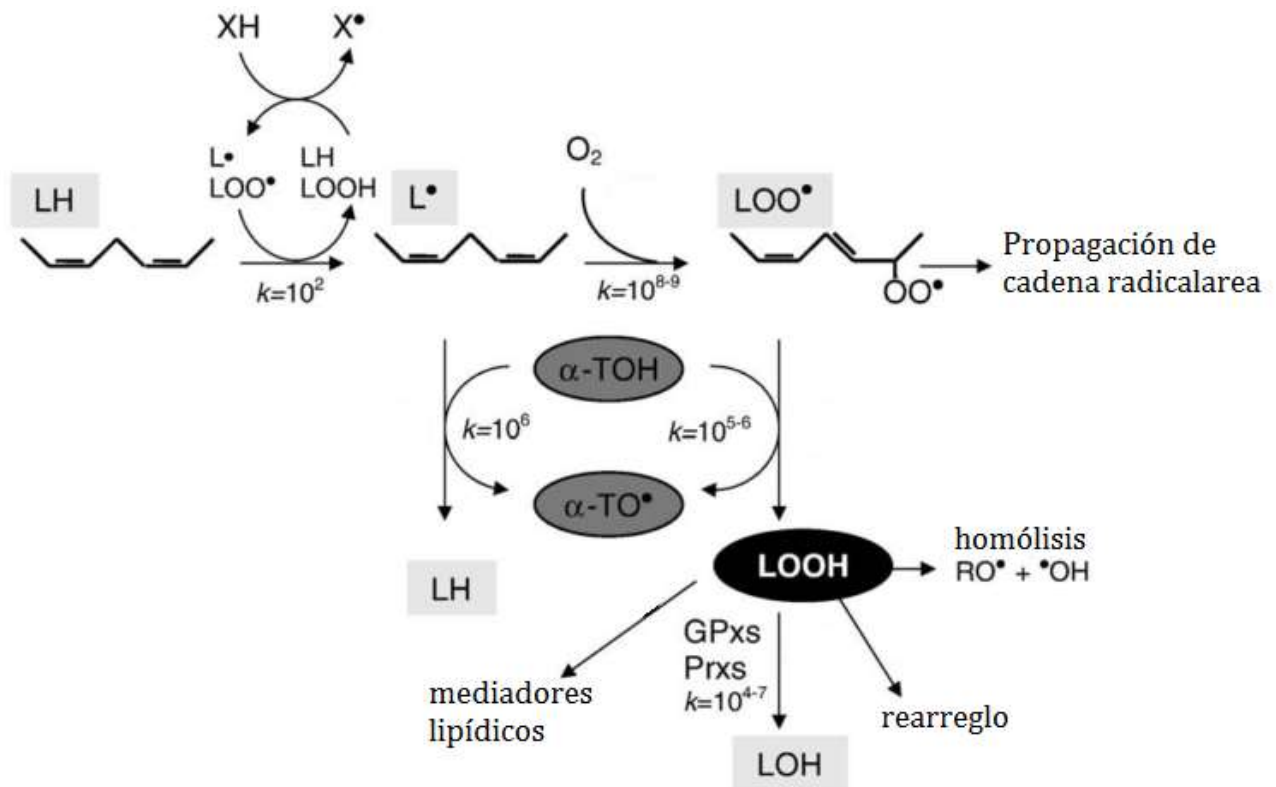


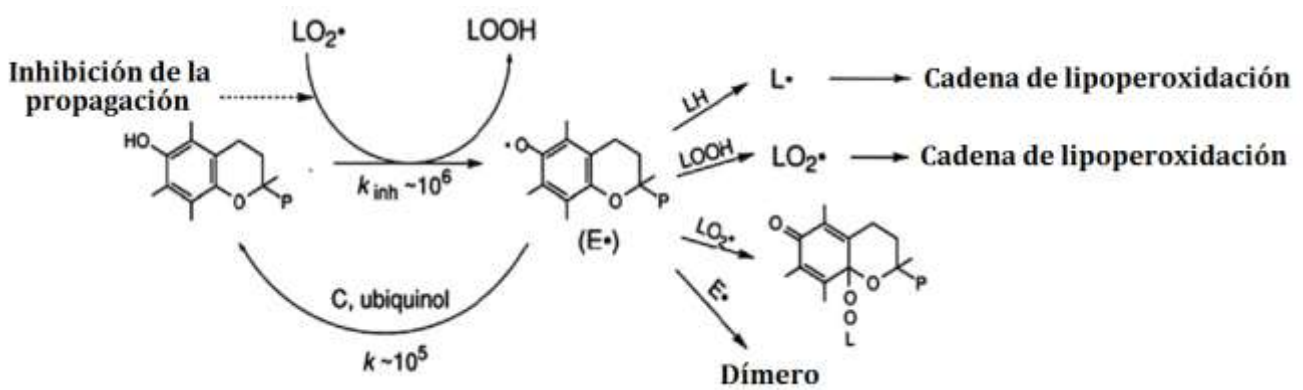
Figura 2.5. Estructura del  $\alpha$ -tocoferol. Extraído de <sup>66</sup>.

La visión clásica del rol biológico del  $\alpha$ -tocoferol es la de evitar la oxidación de membranas interrumpiendo la cadena de propagación radicalar de la lipoperoxidación (proceso que se discutirá en detalle más adelante). Su acción antioxidante por reacción directa con los iniciadores de la oxidación lipídica (ej.  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ) es poco probable dada su baja cantidad en la célula (una molécula de  $\alpha$ -tocoferol cada 100-1000 de fosfolípidos) y la abundancia de otros blancos con similar reactividad para esos radicales (incluyendo los lípidos en las membranas). Sin embargo, los radicales lipídicos ( $\text{L}\cdot$ ) y lipoperoxilos ( $\text{LOO}\cdot$ ), formados en membranas y lipoproteínas, reaccionan con una constante de velocidad mucho mayor con el  $\alpha$ -tocoferol que con otros lípidos, como se observa en la **figura 2.6** (aunque para el radical  $\text{L}\cdot$  la reacción con  $\text{O}_2$  es mucho más veloz y probablemente sea la preferencial). Los lipoperóxidos ( $\text{LOOH}$ ) formados en esta reacción pueden seguir distintas vías en el medio biológico, continuando con la producción de especies oxidantes por homólisis, dando lugar a mediadores lipídicos con acción biológica, reordenándose, o siendo eliminados por peroxidasas<sup>67</sup>.



**Figura 2.6. Efecto antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol.** Las constantes de velocidad en unidades de  $M^{-1}s^{-1}$ , y pueden variar de forma importante según el medio en que sean medidas, ej. solución, micelas, bicapas. Modificado de <sup>67</sup>.

El radical tocoferoxilo formado por reacción con  $L^\bullet$ ,  $LOO^\bullet$  o por otros medios, puede seguir varios caminos como se observa en la **figura 2.7**; reparación por vitamina C o ubiquinol, abstracción de un átomo de hidrógeno de lípidos o lipoperóxidos (actuando como prooxidante y promoviendo la lipoperoxidación), o reacción con otros radicales para generar dímeros o aductos<sup>67,68</sup>. A pesar de la estabilidad de este radical, cuando este no es eliminado por otros medios (reducción o combinación con otro radical) puede abstraer un átomo de hidrógeno de lípidos insaturados promoviendo la lipoperoxidación, como se ha observado en la LDL, en la que bajo ciertas condiciones el tocoferol puede actuar como prooxidante<sup>68-70</sup>. *In vitro* se ha observado que el ascorbato es un excelente reductor del radical tocoferoxilo en diversos medios (solución, micelas, liposomas, LDL y células en cultivo entre otros), y que vitamina E y vitamina C actúan de forma sinérgica para evitar la lipoperoxidación, relación que se ha observado también entre la vitamina E y otros antioxidantes (ej. el ubiquinol como se menciona en la **figura 2.4**, que es abundante en la mitocondria). Sin embargo, a pesar de la relevancia *in vivo* de esas reacciones aún es discutible<sup>67,68</sup>.



**Figura 2.7. Vías de reacción del radical tocoferoxilo.** Adaptado de <sup>68</sup>.

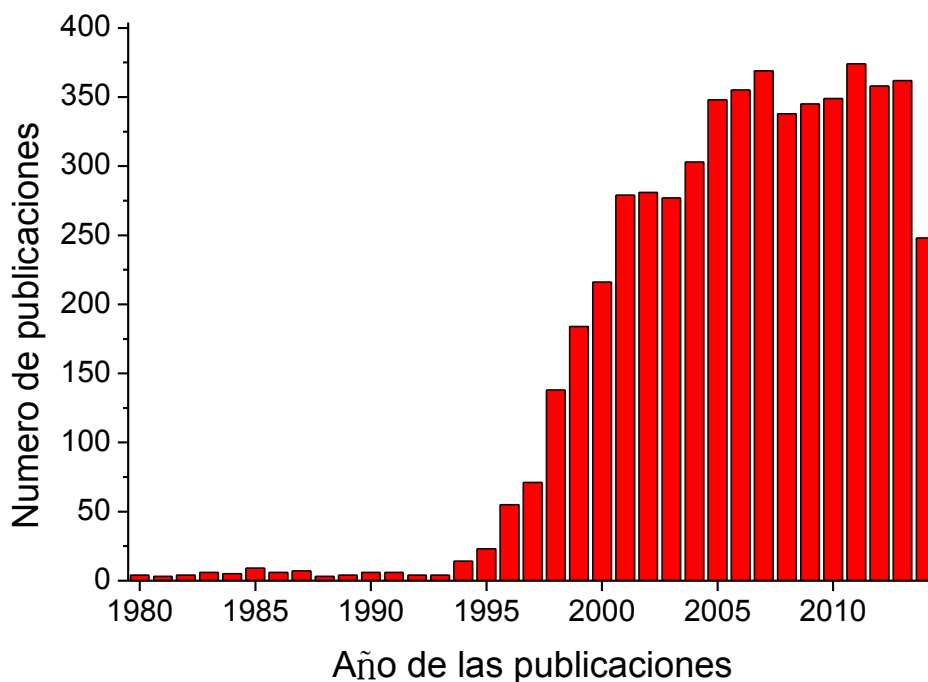
A pesar de que la capacidad antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol es conocida desde hace décadas, su rol fisiológico aún es tema de controversia, siendo muy cuestionable que su principal función sea la de evitar la oxidación de membranas a través del mecanismo esquematizado en la **figura 2.6**, y existiendo evidencia a favor de roles como sensor redox, como señalizador y en la regulación génica<sup>64,66,67,71-73</sup>. El comportamiento físico del tocoferol en las membranas es un componente sumamente relevante en la dilucidación de su rol fisiológico, y es uno de los enfoques por los que actualmente se intenta determinar la viabilidad de su rol como antioxidante, ya que su capacidad de interactuar con los radicales lipídicos es determinante para esta función. Un ejemplo es la hipótesis de que el  $\alpha$ -tocoferol se encontraría concentrado en dominios de membrana ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), aumentando su concentración local en los ambientes más susceptibles a la lipoperoxidación, y así explicando cómo podría tener ese rol fisiológico con su baja concentración<sup>74</sup>.

## 2.2) Nitración de Tirosina:

### a) Propiedades de la tirosina y la nitrotirosina:

A partir del surgimiento del peroxinitrito como potencial mediador del estrés oxidativo, y de la identificación por Harry Ischiropoulos en 1992 de su capacidad de nitrar residuos de tirosina en proteínas, esta modificación postraduccional generó interés como posible proceso relevante en la patología, como se puede apreciar en la **figura 2.8**. Está demostrado que la nitrotirosina se forma en condiciones fisiológicas normales en el organismo, y que su formación se puede incrementar en situaciones en que la producción de especies oxidantes se ve aumentada<sup>52</sup>. Aunque se ha asociado el aumento de los niveles de nitrotirosina a diversas patologías, y es un marcador aceptado del estrés nitrooxidativo, aún está pendiente establecerlo sin ambigüedades como un factor causal relevante en el desarrollo de las patologías a las que se la asocia, y como modificación postraduccional con efectos relevantes *in vivo*<sup>52,75</sup>. Existen ejemplos concretos de proteínas que se encuentran nitradas en diversas patologías y cuyas funciones se

saben afectadas por la nitración en ciertas condiciones, como proteínas del citoesqueleto (la  $\alpha$ -sinucleína, que se localiza junto al marcado histoquímico de nitrotirosina y se asocia a patologías como Alzheimer y Parkinson, con un amplio estudio estructural del efecto de su modificación en su agregación), de las defensas antioxidantes (la MnSOD, con una disminución de función bien caracterizada estructuralmente, además vinculada a patologías como la esclerosis lateral amiotrófica) y de la cadena respiratoria (el citocromo c, con variantes nitradas que están asociadas a otros eventos de oxidación molecular, como la oxidación de cardiolipina y otros lípidos, y un rol muy estudiado en la señalización celular, tanto para la proteína misma como para sus variantes nitradas y algunas moléculas que estas producen)<sup>52,76-78</sup>.

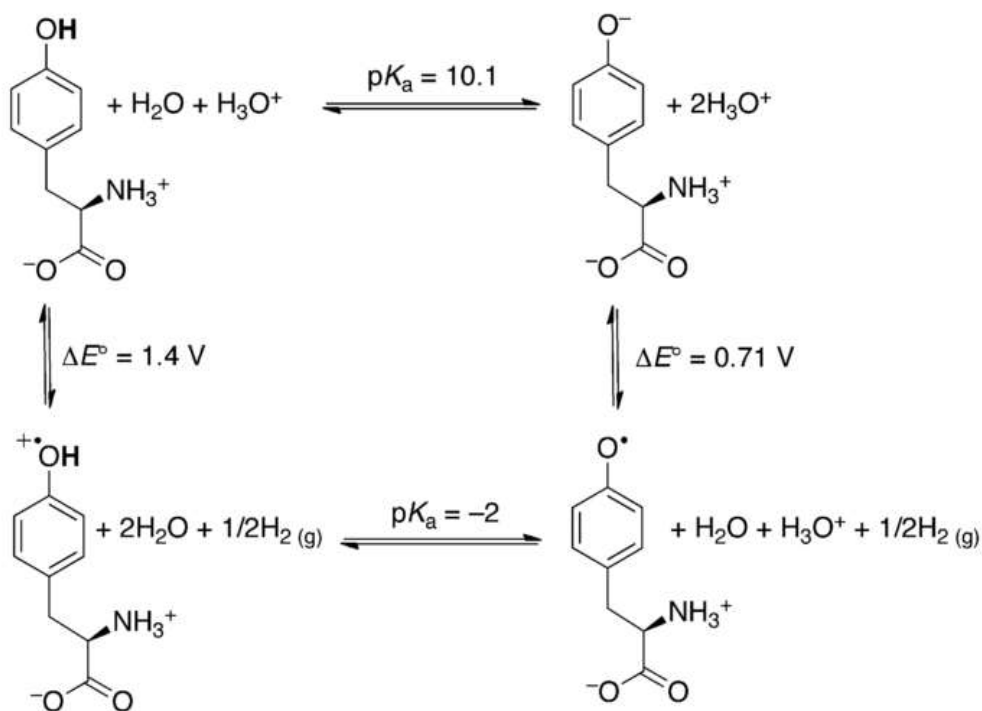


**Figura 2.8. Crecimiento en la producción de artículos científicos con la palabra “nitrotyrosine”.** Obtenido de [pubmed.gov](http://pubmed.gov)

La tirosina es uno de los 20 aminoácidos estándar, con una ocurrencia de alrededor del 3% en proteínas. Puede encontrarse en su conformación D o L, pero solo la conformación L está presente en los seres vivos. Al igual que el resto de los aminoácidos, a pH fisiológico se encuentra en su forma zwitteriónica, con su grupo carboxilo cargado negativamente ( $pK_a=2,20$ ) y su grupo amino cargado positivamente ( $pK_a=9,21$ ), y además cuenta con una cadena lateral ionizable, con un  $pK_a=10,46$  para el OH de su anillo fenólico. Su grupo lateral se puede clasificar como aromático y polar, y es uno de los responsables de la absorción de las proteínas en la zona UV con un pico de absorbancia a 280 nm como se observa en la **figura 2.10**. El grupo hidroxilo de la tirosina puede formar enlaces de hidrógeno, y es parte funcional de algunas enzimas<sup>11,79</sup>. También participa de muchas vías de

señalización que dependen de la fosforilación de tirosina en su grupo OH, y puede participar de procesos redox enzimáticos mediante la formación del radical tirosilo como intermediario, como en algunas ribonucleótido reductasas<sup>52,80</sup>.

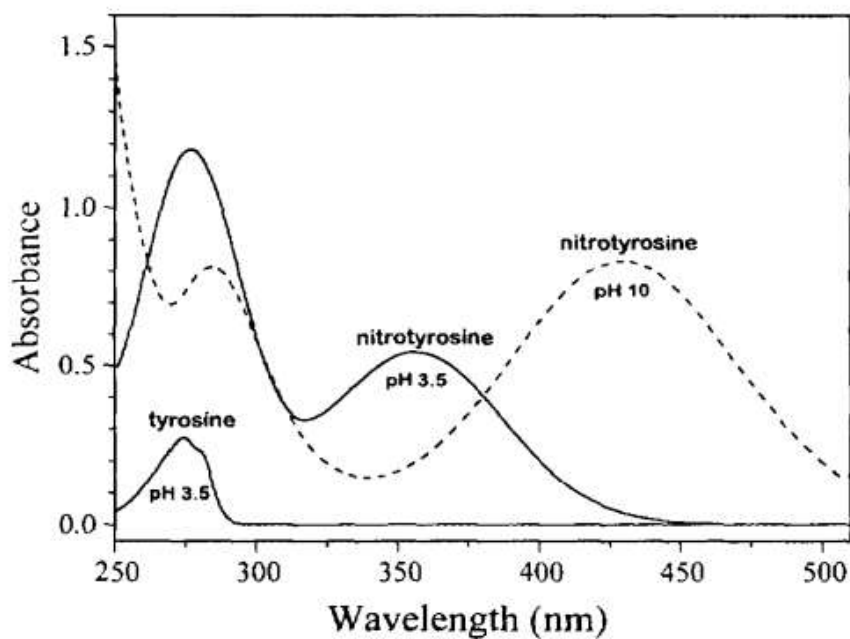
La oxidación de la tirosina puede darse por tres vías teóricas (dos de las cuales se presentan en la **figura 2.9**) según el orden de transferencia del protón y del electrón; (1) primero el electrón para formar el intermediario TyrOH<sup>•+</sup> y luego el protón, (2) primero el protón para formar el fenolato, que luego cede un electrón, o (3) ambas transferencias se dan de forma concertada (lo que no significa que deban transferirse a un mismo aceptor). La vía (1) es muy poco probable y no ha sido observada en estudios de oxidación de tirosina, mientras que las vías (2) y (3) dependerán del entorno en que se encuentre la tirosina, siendo la vía (3) la principal a pH fisiológicos y en medios con baja constante dieléctrica, por la dificultad de generar al anión fenolato en esas condiciones. Las propiedades redox de la tirosina serán dependientes de su entorno, por lo que diferentes tirosinas en diferentes proteínas se comportarán de forma distinta dependiendo de varios factores<sup>81</sup>.



**Figura 2.9. Ciclo termodinámico de la tirosina en medio acuoso.** Extraído de <sup>81</sup>.

La 3-nitrotirosina, formada por oxidación de la tirosina, altera las propiedades de este aminoácido, lo que también se puede traducir en alteraciones en las proteínas de las que forma parte. El efecto más evidente es un aumento en su tamaño, que pasa de 205 Å<sup>3</sup> a 235 Å<sup>3</sup>. Además el grupo nitro actúa como grupo aceptor de electrones en el anillo fenólico y afecta sus propiedades electrónicas (aunque el efecto en proteínas dependerá del microambiente que rodee al residuo),

disminuyendo su pKa a valores  $\sim 6,8-7,4$  y aumentando su potencial de reducción en 200-300 mV con respecto a la tirosina, haciendo menos favorable su donación de electrones. A pH fisiológico la tirosina se encuentra casi totalmente protonada, mientras que la nitrotirosina se encontrará en equilibrio entre sus formas protonada y aniónica. La forma protonada de la nitrotirosina es más hidrofóbica que la tirosina. Cuando se nitrán tirosinas proteicas estos efectos sobre la estructura del residuo pueden afectar la estructura global y local en la proteína, impedir la fosforilación y afectar los procesos en que la tirosina actúa como mediador redox<sup>52,82</sup>. Además, de relevancia para la cuantificación de nitrotirosina, la nitración de la tirosina altera sus propiedades espectrales, que además serán dependientes del pH. Como se observa en la **figura 2.10**, al igual que la tirosina, la nitrotirosina tiene un pico de absorción a 280nm, pero además tiene un pico adicional, ubicado a  $\sim 360$  nm en su estado protonado, y a  $\sim 430$  nm en su estado desprotonado (que le da el característico color amarillo a sus soluciones en pH básico)<sup>83</sup>.



**Figura 2.10. Espectro de la tirosina y de la nitrotirosina a pH ácido y pH básico.** Extraído de <sup>83</sup>.

Los efectos de la nitración de tirosina sobre la función de las proteínas son variados, existiendo ejemplos en que hay pérdida de funciones, otros en que hay ganancia, y otros en que esta no se ve afectada. Sin embargo, es difícil definir qué alteraciones funcionales observadas en proteínas nitradas tienen relevancia biológica, debido a algunos obstáculos que presenta su estudio. Para explicar esto es importante señalar que la nitración de tirosinas es una modificación selectiva, que se da solamente en algunos residuos de tirosina en algunas proteínas, y que esta selectividad es además alterada por varios factores, como el medio de reacción, el microambiente de la tirosina en la proteína y el agente nitrante. Eso

implica que los ensayos de exposición de proteínas a agentes nitrantes *in vitro* no necesariamente genera las mismas modificaciones que se dan *in vivo*, por lo que un punto que se debe evaluar para dar relevancia biológica a un ensayo de nitración sobre una proteína es la correspondencia entre los residuos nitrados *in vivo* e *in vitro*<sup>52,82,84,85</sup>. Otro factor relevante es la capacidad de los sistemas nitrantes de modificar otros residuos aminoacídicos, lo que dificulta la tarea de adscribirle a la nitración de determinados residuos de tirosina los efectos funcionales provocados por esos sistemas nitrantes<sup>84,86,87</sup>. A pesar de estas y otras dificultades, los efectos funcionales de la nitración de tirosinas ha sido bien caracterizada para algunas proteínas, como para la MnSOD, que se sabe es inactivada por la nitración de su Tyr34, selectiva para el peroxinitrito, y que esa modificación es suficiente para inactivar a la enzima por razones estructurales conocidas, además de haberse relacionado con escenarios patológicos *in vivo*<sup>52,84,87</sup>.

**b) Vías de nitración de tirosina:**

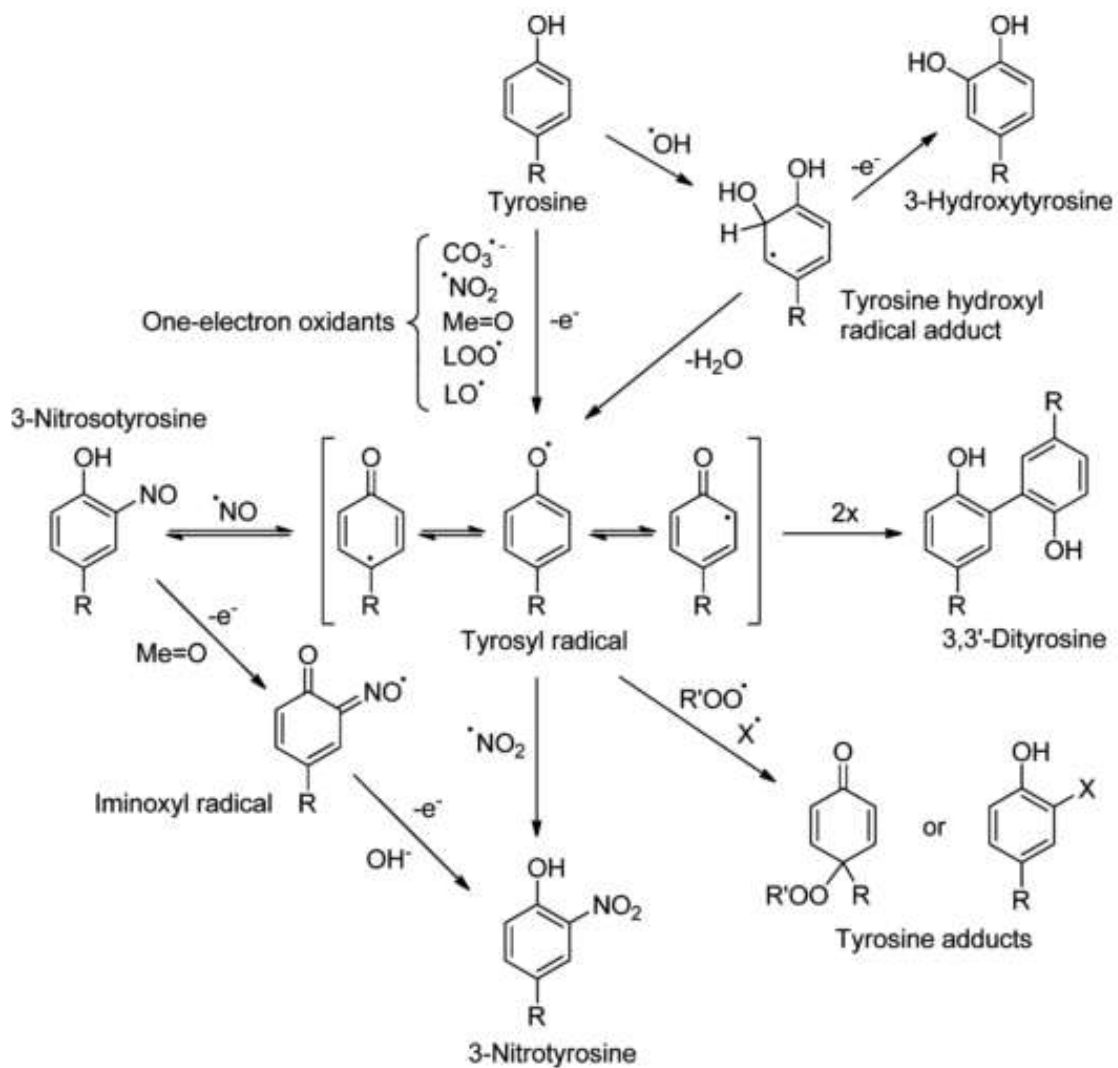


Figura 2.11. Formación del radical tirosilo y sus potenciales vías de reacción.<sup>52</sup>

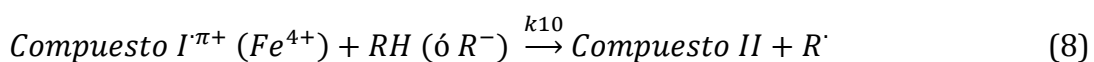


La nitración de tirosina en el medio biológico está mediada por mecanismos radicalares, con el radical tirosilo como intermediario. La formación de nitrotirosina es una de las vías de reacción que puede seguir el radical tirosilo, que se esquematizan en la **figura 2.11** junto con los oxidantes que lo pueden producir. Como se observa en la **figura 2.11**, la formación de nitrotirosina puede darse por combinación de radical tirosilo con  $\cdot\text{NO}_2$ , o por combinación con  $\cdot\text{NO}$  para dar 3-nitrosotirosina y su posterior oxidación secuencial por dos electrones<sup>52,85</sup>.

Entonces la generación de nitrotirosina suele requerir la presencia simultánea de especies oxidantes capaces de oxidar a la tirosina por un electrón, y  $\cdot\text{NO}_2$  capaz de combinarse con el radical tirosilo (que también puede cumplir el primer requisito por sí solo). El  $\cdot\text{NO}_2$  puede ser generado por diferentes vías como se mencionó previamente en la sección dedicada a esta especie. También se discutió previamente la química de algunos de los oxidantes capaces de generar radical tirosilo ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ). Otra especie que se observa en la **figura 2.11** capaz de generar radical tirosilo es el radical lipoperoxilo, que puede ser generado por varias de las especies oxidantes involucradas en el estrés oxidativo, y cuya química se discutirá más adelante<sup>88</sup>. Una de las vías capaces de cumplir ambos requisitos es la dependiente del peroxinitrito, que por homólisis o por reacción con  $\text{CO}_2$  y posterior homólisis puede generar radicales capaces de oxidar a la tirosina, y también el  $\cdot\text{NO}_2$  necesario para nitrarla. Otra vía biológicamente relevante es la dependiente del sistema peroxidasa/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$ <sup>52</sup>.

### i) Vía de las peroxidasas:

Las peroxidasas son enzimas que pueden ser oxidadas por  $\text{H}_2\text{O}_2$  para dar  $\text{H}_2\text{O}$  y formas oxidadas de su grupo hemo catalizador, llamadas compuesto I (forma oxidada por dos electrones) y compuesto II (forma oxidada por un electrón), como se muestra en la reacción 7. Estas formas oxidadas pueden luego oxidar diversas moléculas por un electrón para volver a formar a la peroxidasa reducida, como se muestra en las reacciones 10 y 11. Estos potenciales blancos incluyen a la tirosina para dar radical tirosilo y al  $\text{NO}_2^-$  para dar  $\cdot\text{NO}_2$ . Algunas constantes de velocidad se muestran en la **tabla 2.II**. Las enzimas peroxidasas más relevantes biológicamente a la nitración de tirosina son la mieloperoxidasa (MPO, encargada de oxidar al ión cloruro a ácido hipocloroso) y la eosinófilo peroxidasa (EPO), con niveles incrementados en el estado inflamatorio, que mediante ese ciclo catalítico producen las especies necesarias para nitrar a la tirosina<sup>85,89,90</sup>.



**Tabla 2.III. Constantes de velocidad relevantes a la vía de las peroxidasas.**

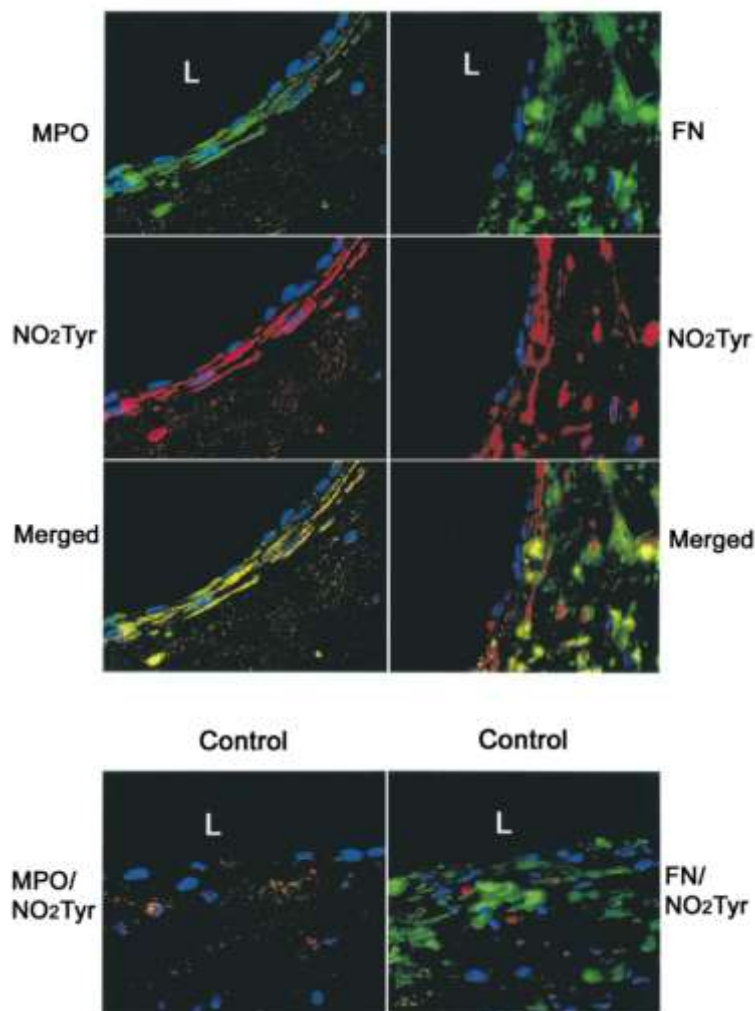
Reacción	Especies	k (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Ref.
7	MPO de granulocito humano	(2,3±0,1)×10 <sup>7</sup> (pH=7)	91
8	MPO-I + Tyr	2,93×10 <sup>5</sup> (pH=7,4)	89
8	MPO-I + Glu-Tyr	7,63×10 <sup>3</sup> (pH=7,4)	89
8	MPO-I + Val-Tyr	8,01×10 <sup>4</sup> (pH=7,4)	89
8	MPO-I + Val-Tyr-Val	1,39×10 <sup>4</sup> (pH=7,4)	89
8	MPO-I + Lys-Tyr-Lys	6,92×10 <sup>3</sup> (pH=7,4)	89
8	MPO-I + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	2,0×10 <sup>6</sup> (pH=7;15°C)	92
9	MPO-II + Tyr	2,46×10 <sup>4</sup> (pH=7,4)	89
9	MPO-II + Glu-Tyr	7,41×10 <sup>2</sup> (pH=7,4)	89
9	MPO-II+ Val-Tyr	1,05×10 <sup>4</sup> (pH=7,4)	89
9	MPO-II + Val-Tyr-Val	1,13×10 <sup>3</sup> (pH=7,4)	89
9	MPO-II + Lys-Tyr-Lys	6,23×10 <sup>2</sup> (pH=7,4)	89
9	MPO-II + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5,5 ×10 <sup>2</sup> (pH=7;15°C)	92

Al tratarse de reacciones enzimáticas, que además involucran porfirinas, la química de estas reacciones no será fácilmente predecible. Por ejemplo, la reacción 7 es dependiente del pH, estando involucrado un residuo de histidina distal con pKa=4,30 en la MPO de granulocito humano, que en su estado protonado previene la reacción 7, pero que por otro lado en ese estado favorece la oxidación de aniones como el nitrito y el cloruro por el complejo I<sup>91,92</sup>.

A pH neutro la oxidación del nitrito por la MPO-II es relativamente lenta, por lo que a ese pH el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por sí solo no es un buen generador de ·NO<sub>2</sub>, dado que esa reacción pasa a ser limitante en el reciclaje de la enzima a su estado original. Sin embargo, la presencia de una especie que pueda reducir al complejo II con facilidad, como la tirosina, aumenta la eficiencia del sistema y su capacidad nitrante<sup>92</sup>. Además, como se observa en la **tabla 2.II**, las diferentes estructuras de las que esté formando parte un residuo de tirosina afectarán su reactividad con la MPO, siendo tamaño y carga dos factores importantes, debido al sitio activo relativamente poco accesible de esta enzima<sup>89</sup>. Sin embargo, a pesar de que los residuos de tirosina en proteínas se encuentran poco accesibles a la MPO, su oxidación puede verse favorecida por la presencia de tirosina libre en el medio, debido a que esta puede ser oxidada tanto por el complejo I como por el complejo II, y el radical tirosilo formado puede a su vez oxidar a residuos de tirosina en péptidos que no son directamente oxidados por la MPO, aumentando la complejidad de la vía en el medio biológico<sup>93</sup>

A diferencia del peroxinitrito, la MPO tiene las ventajas experimentales de que puede ser localizada en muestras y tejidos, debido a que no es una especie transitoria, y que su presencia en organismos puede ser modulada con técnicas de

biología molecular. Por ejemplo, con manipulación genética, se ha observado que ratones en que se inactiva el gen para la MPO la cantidad de nitrotirosina hepática después de un estímulo inflamatorio es menor que la de un ratón salvaje, evidencia a favor de su rol en la formación de nitrotirosina. Y también con el uso de anticuerpos se ha podido estudiar su localización en casos clínicos de pacientes para asociar esta vía a patologías. En la **figura 2.12** se observan arterias coronarias sanas y ateroscleróticas, y se muestra cómo en las arterias ateroscleróticas hay una presencia mucho mayor de NO<sub>2</sub>-Tyr y de MPO que en las sanas, estando ambas señales superpuestas en su ubicación, vinculando de esta forma la vía de la MPO a la formación *in vivo* de nitrotirosina. Además en la misma imagen se muestra cómo esta herramienta permitió señalar a la fibronectina como posible blanco de la nitración mediada por MPO<sup>77</sup>.



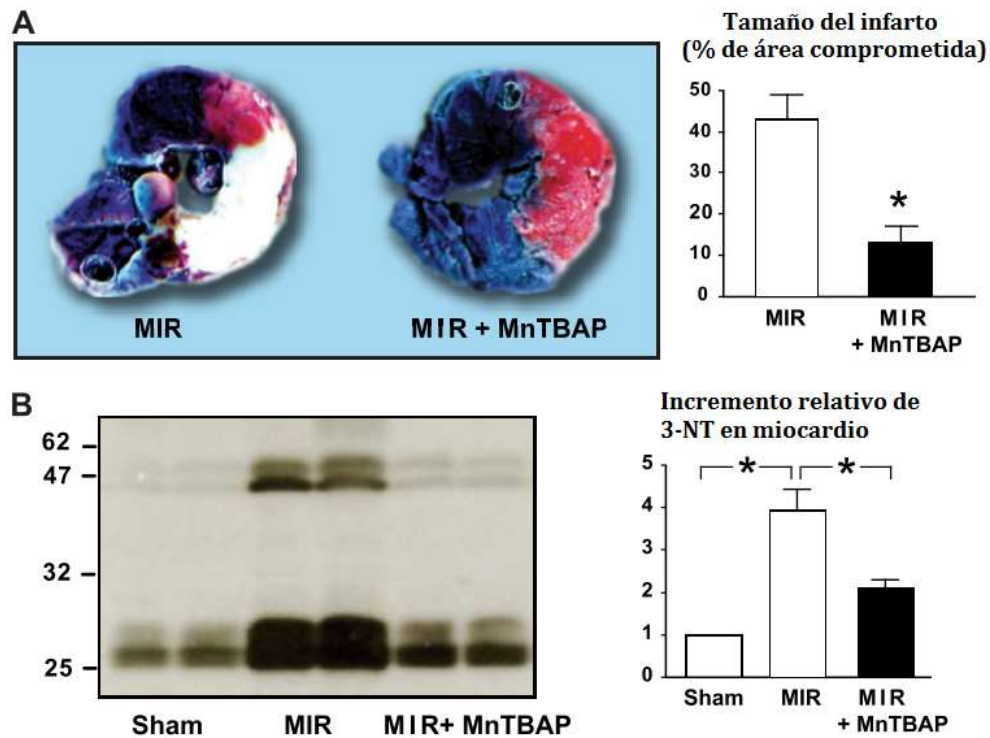
**Figura 2.12. Co-localización de MPO y nitrotirosina *in vivo*.** Arterias carótidas ateroscleróticas arriba y normales abajo. Mapeo espacial de MPO (en verde) y NO<sub>2</sub>-Tyr (en rojo) a la izquierda, y de fibronectina (en verde) y NO<sub>2</sub>-Tyr (en rojo) a la derecha. Los núcleos están marcados en azul. Extraído de <sup>77</sup>.

## ii) **Vía del peroxinitrito:**

La vía del peroxinitrito requiere la formación simultánea de  $O_2^{\cdot-}$  y  $\cdot NO$  en flujos suficientes para que su reacción supere las otras reacciones de alta velocidad de las que pueden participar estos radicales. En condiciones fisiológicas normales las principales vías que siguen estos radicales son, respectivamente, la dismutación por SOD y la reacción con hemoglobina para dar nitrato. Sin embargo, dada la alta velocidad de la reacción entre estos radicales, en condiciones en que su producción se vea aumentada, y exista solapamiento espacial entre las dos, la formación de peroxinitrito se verá aumentada de forma importante, e incluso flujos moderados de peroxinitrito, si están extendidos en el tiempo, pueden generar daño oxidativo substancial<sup>94</sup>. La velocidad de formación intramitocondrial de  $O_2^{\cdot-}$  en células de aorta bovina normoglicémicas se ha estimado (asumiendo ciertos parámetros) en  $0,7 \mu Ms^{-1}$ , generando una concentración de estado estacionario de  $28 \times 10^{-12} M$  si se toma en consideración a la MnSOD como blanco principal. En condiciones hiperglicémicas esta concentración podría aumentarse  $\sim 9$  veces. En el fagosoma las estimaciones llegan a velocidades de formación de  $2,5 mMs^{-1}$  y concentraciones estacionarias de  $10^{-4}$ - $10^{-5} M$ . Los valores de concentración estacionaria del  $\cdot NO$  en el espacio perivascular se han medido en el entorno de 200-1000 nm. Usando ambos estados estacionarios se puede estimar la velocidad máxima de formación de peroxinitrito en una velocidad de  $0,3 \mu Ms^{-1}$  en las mitocondrias de células endoteliales en cultivo sin condiciones de estrés, y una concentración estacionaria de  $\sim 1 nM$ . Se puede estimar, a partir de los flujos medidos de  $O_2^{\cdot-}$ , que la formación de peroxinitrito intrafagosomal puede ser 2 o 3 órdenes de magnitud mayor que en las mitocondrias de células en cultivo en estado basal<sup>17,36</sup>.

En macrófagos y neutrófilos activados existe un aumento significativo en la producción de ambos radicales, a partir de la iNOS y la NADPH oxidasa, que son inducidas en el fagosoma. Además la descomposición del peroxinitrito genera nitrito que puede ser utilizado por la MPO para generar más especies reactivas en ese compartimento. También, por ejemplo, el  $\cdot NO$  puede regular la cadena de transporte de electrones uniendo a la citocromo c oxidasa (complejo IV) reversiblemente, interrumpiendo la cadena. En condiciones de alta producción de  $\cdot NO$  (ej. estímulos inflamatorios, reperfusión isquémica, hiperactivación neuronal), la inhibición del complejo IV puede ser significativa, aumentando el escape de electrones de la cadena para producir  $O_2^{\cdot-}$ , que a su vez puede reaccionar con el  $\cdot NO$  que está siendo producido. Además la inhibición de la MnSOD por peroxinitrito puede reducir la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$  y continuar promoviendo su generación. Estas y otras condiciones, en que teóricamente se puede ver aumentada la producción de peroxinitrito, generalmente están asociadas a un aumento en los niveles de nitrotirosina, como por ejemplo en el miocardio luego de ser sometido a reperfusión isquémica. Además, como se muestra en la **figura 2.13**, los niveles de nitrotirosina pueden ser reducidos, y la función contráctil post-isquémica mejorada por administración de moléculas que en teoría reducirían la

concentración de peroxinitrito, como inhibidores de la NOS, SOD, miméticos de SOD, urato o glutatión, sugiriendo un rol del peroxinitrito como mediador del daño en condiciones patológicas<sup>94</sup>.



**Figura 2.13. Efecto de un atrapador de peroxinitrito sobre el daño por reperusión isquémica.** Efecto del MnTBAP, una porfirina atrapadora de peroxinitrito, en el daño al miocardio y los niveles de 3-Nitrotirosina en miocardio luego de que este es sometido a reperusión isquémica *in vivo* (MIR). Modificado de <sup>94</sup>.

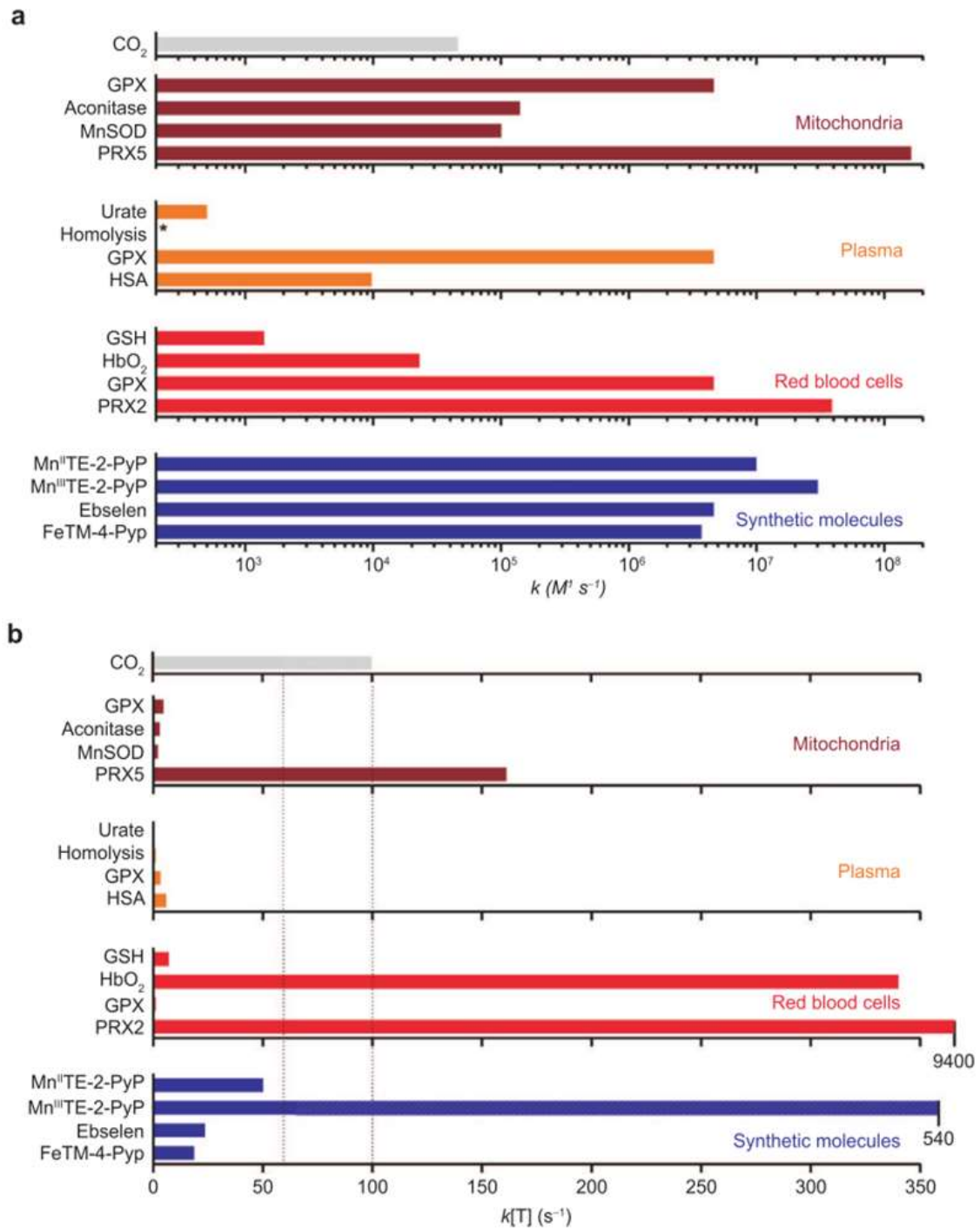
La química de las reacciones que puede seguir el peroxinitrito, los radicales que lo forman, y sus radicales derivados es muy compleja, y hace que el estudio de su actividad *in vivo* no sea una tarea fácil. Por ejemplo, las reacciones 10, 11 y 12 muestran cómo el  $O_2^{\cdot -}$  y el  $\cdot NO$  también pueden reaccionar con los radicales derivados del peroxinitrito, lo que explica cómo variaciones en la relación de sus flujos de formación *in vitro* afectan la eficiencia de la nitración de tirosina<sup>92</sup>. Por ejemplo, *in vitro* la relación de flujos de  $O_2^{\cdot -}$  y  $\cdot NO$  2:1 tiene una eficiencia de la nitración mucho menor que para un flujo 1:1, debido a que el  $O_2^{\cdot -}$  reacciona con  $\cdot NO_2$  con una  $k_{10}=4,5 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$  y actúa eliminando a esta especie necesaria para la nitración de tirosina<sup>55,96</sup>. Teóricamente la nitración máxima se da a flujos iguales de ambas moléculas, obteniéndose una curva con forma de campana, pero factores biológicamente relevantes como la dismutación del superóxido y la difusión del óxido nítrico afectan esta relación entre flujos y eficiencia de nitración. En situaciones más similares al contexto biológico se dan aumentos en la nitración de tirosina por el incremento en cualquiera de los dos radicales precursores (observación que durante un tiempo generó controversia, al verse que la nitración

de tirosina aumentaba con el aumento de cualquiera de los dos radicales *in vivo*, a diferencia de lo observado en el sistema más simple)<sup>17,55</sup>. Además, la distribución de productos en experimentos de nitración de tirosina por peroxinitrito *in vitro* también se ve afectada por factores como la forma de agregado del peroxinitrito. El agregado en bolo genera una alta concentración de TyrO<sup>•</sup> y <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> que favorecen la nitración de tirosina con respecto a flujos bajos, en que la concentración estacionaria de estas dos especies es menor y se favorece la formación de di-tirosina<sup>55</sup>. También, por ejemplo, se han reportado diferencias en los rendimientos de nitración para diferentes sistemas de formación continua O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y <sup>•</sup>NO<sup>96</sup>. Estos son algunos de los factores que afectan el rendimiento de la nitración de tirosina, tanto *in vivo* como *in vitro*, y que ilustran las dificultades de recrear escenarios biológicamente relevantes en el laboratorio.



Además el rol biológico del peroxinitrito es afectado por los mecanismos antioxidantes que pueden disminuir su daño a otras moléculas, ya sea reaccionando con él o con sus radicales secundarios. Por eso las vías de reacción perjudiciales del peroxinitrito y sus radicales derivados se encontrarán compitiendo cinéticamente con moléculas antioxidantes atrapan al peroxinitrito. Vale señalar que el factor que determina la relevancia química de una determinada vía de reacción del peroxinitrito no será el valor de la constante de velocidad, sino el producto  $k[S]$ , con unidades  $s^{-1}$ , que indica de forma lineal la preferencia del peroxinitrito por cada vía, siendo  $[S]$  la concentración del otro reactivo de la reacción y  $k$  la constante de velocidad. Así la distribución final de productos en un sistema biológico, o en un sistema modelo de cierta complejidad, dependerá de muchos factores, siendo uno de ellos la concentración local de las diferentes moléculas que pueden reaccionar con el peroxinitrito<sup>17,36</sup>.

Un ejemplo relevante de estas especies que compiten cinéticamente por el peroxinitrito y que se observa en la **figura 2.14** es el CO<sub>2</sub>, que a pesar de no contar con una velocidad de reacción muy alta con el peroxinitrito ( $k_{app}=4,6 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$  a 37 °C y pH=7) se encuentra en concentraciones altas en el medio biológico *in vivo* (~1,5 mM), por lo que el producto  $k[S]$  para esta reacción es 60  $s^{-1}$ . Eso significa, por ejemplo, que la homólisis del peroxinitrito, que tiene una  $k=0,9 s^{-1}$  será una vía minoritaria en presencia de esa concentración de CO<sub>2</sub>. Para que una reacción sea cinéticamente relevante debe tener un valor de  $k[S]$  en ese entorno, y en algunos compartimentos hay moléculas con valores  $k[S]$  muy altos que, mientras su concentración no se agote, son las rutas preferenciales del peroxinitrito. Otro ejemplo relevante que se observa en la **figura 2.14** son las peroxirredoxinas, una



**Figura 2.14. Velocidad de reacción del peroxinitrito con diferentes blancos.** En la gráfica a se muestran comparativamente diferentes constantes de velocidad  $k$  para las reacciones bimoleculares del peroxinitrito con las moléculas que se mencionan, y en que medios se encuentran. En la gráfica b se muestra el producto  $k[S]$  en diferentes compartimentos. Extraído de <sup>17</sup>.

familia de enzimas peroxidáticas que reaccionan con gran velocidad con el peroxinitrito. La peroxirredoxina 2 tiene una constante de velocidad con el peroxinitrito de  $1,7 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ , y en algunos tipos celulares, como el eritrocito, tiene una concentración en el entorno de  $240 \mu M$  que genera un valor  $k[S] > 4000 s^{-1}$ . Esto genera una concentración estacionaria baja de peroxinitrito, en el entorno

de 36 pM. Otras moléculas como el GSH, el ascorbato y el ácido úrico reaccionan lentamente con el peroxinitrito, pero su alta concentración los hace blancos preferenciales de los radicales derivados de este, que tienen una reactividad menos específica. La cantidad de reacciones es alta, lo que hace a la completitud de las vías un sistema muy complejo que puede cambiar sustancialmente en diferentes entornos biológicos en que esos valores varíen, lo que además es un obstáculo para entender completamente el efecto que puede tener una molécula administrada exógenamente<sup>17,36</sup>. En la **figura 2.14** se observan comparativamente diferentes  $k$  y  $k[S]$  de algunas moléculas relevantes biológicamente o sintéticas.

Dada la complejidad de todas estas vías, la alta concentración de moléculas capaces de atrapar al peroxinitrito, y la gran dificultad de poder detectarlo en contextos biológicos reales, la determinación sin ambigüedades del peroxinitrito como causal de patologías aún no ha sido posible, aunque está claro que puede tener efectos detrimentales.

### **2.3) Lipoperoxidación:**

La lipoperoxidación fue uno de los primeros fenómenos oxidativos biológicamente relevantes en ser identificados, y fue también de los primeros en vincularse a procesos patológicos. Además este proceso tiene relevancia industrial, porque la oxidación lipídica es uno de los factores que lleva al deterioro de los alimentos, lo que desde épocas tempranas la convirtió en un área de intensa investigación<sup>97,98</sup>.

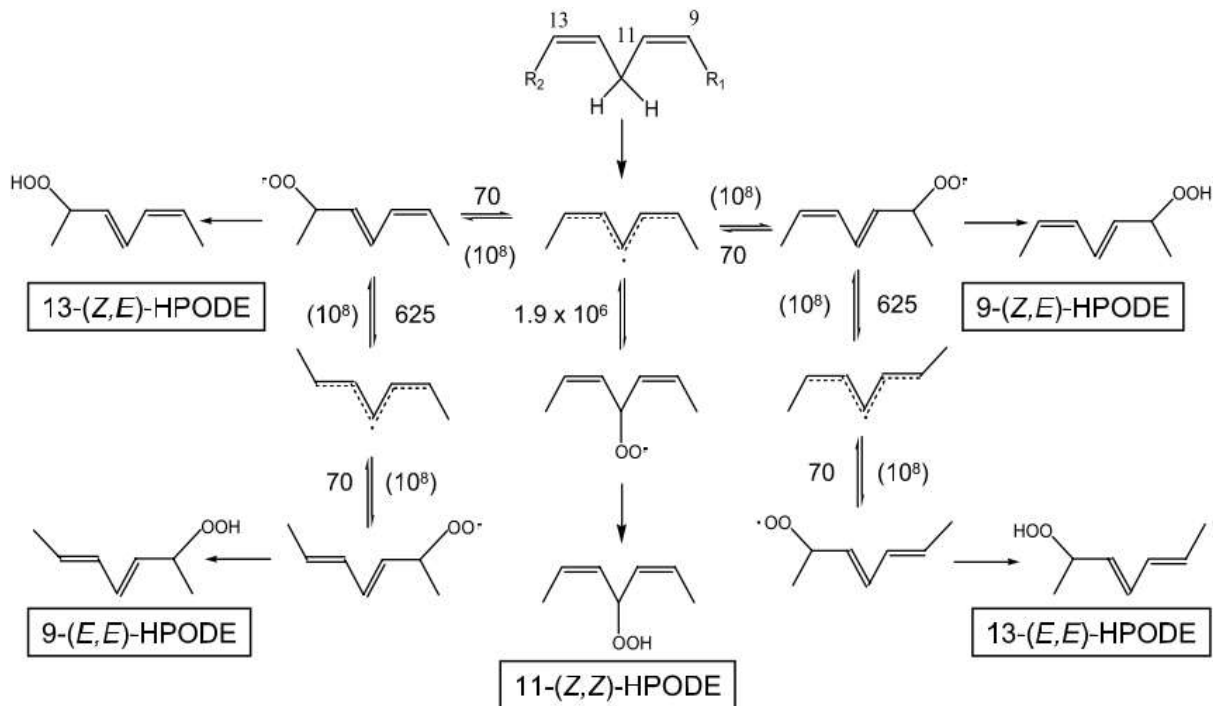
#### **a) Mecanismos químicos y productos de la lipoperoxidación:**

La peroxidación lipídica puede darse por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros, en los que no se profundizará, suelen generar productos enantio- estereo- y regioespecíficos, sintetizados para cumplir funciones biológicas determinadas, por ejemplo los productos generados por las lipoxigenasas. El segundo tipo de mecanismo se da de forma inespecífica, mediada por la química de los radicales libres, con la generación de una gran variedad de productos como se observa en la **figura 2.15** para el simple caso de los hidroperóxidos derivados del ácido linoleico. Además este segundo mecanismo cuenta con la característica de ser un fenómeno de autopropagación, en que la oxidación inicial de un lípido puede llevar a la oxidación de muchos otros. El estrés oxidativo como mediador de la patología a través del daño a las biomoléculas está asociado al segundo tipo de mecanismo<sup>97,98</sup>.

Al igual que para los otros tipos de oxidación discutidos anteriormente, en la lipoperoxidación coexistirán numerosas reacciones compitiendo cinéticamente entre ellas. La eficiencia con la que compitan las diferentes vías de reacción determinarán las características del proceso oxidativo en un determinado sistema. A su vez estas eficiencias son afectadas en gran medida por las características físicas y químicas del sistema, que además están relacionadas entre sí y pueden



alterarse en el curso de la lipoperoxidación, añadiendo a la gran complejidad de este proceso. Por esa razón los fenómenos observados para un determinado sistema modelo pueden ser diferentes que los observados para un sistema ligeramente distinto (tanto en el sistema oxidante como en el sistema oxidable), y las comparaciones para determinar los factores que afectan a estos procesos se deben realizar entre sistemas idénticos excepto por el factor en estudio, y se debe tener cuidado en no arribar apresuradamente a generalizaciones cuando se observa un fenómeno para un solo modelo. La lipoperoxidación radicalar puede dividirse en 3 etapas para su análisis; iniciación, propagación y terminación<sup>99-101</sup>.



**Figura 2.15. Rutas de reacción del ácido linoleico, con constantes de reacción incluidas.<sup>98</sup>**

**i) Iniciación:**

La iniciación de la lipoperoxidación puede darse por mecanismos químicos o físicos (luz UV, radiación ionizante, autooxidación por calentamiento) y es el proceso mediante el que se forma un radical lipídico que podrá dar comienzo a la cadena de lipoperoxidación. Las especies iniciadoras pueden ser varias, tanto de relevancia biológica como de uso en los modelos experimentales de laboratorio. En cuanto a la iniciación química, ésta se puede dar por abstracción de un átomo de hidrógeno de un carbono -CH<sub>2</sub>- o por adición de un radical libre a un doble enlace de un lípido insaturado (como puede ser el caso del <sup>•</sup>NO<sub>2</sub>)<sup>48,100,101</sup>. Los ácidos grasos saturados son muy poco susceptibles a la lipoperoxidación, y se suelen denominar lípidos no oxidables, aunque por ejemplo el radical hidroxilo puede

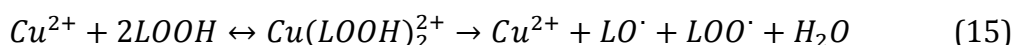
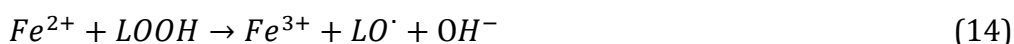
convertirlos en radicales libres con capacidad de generar lipoperóxidos<sup>99</sup>. Los ácidos grasos insaturados tienen una susceptibilidad mucho mayor a la oxidación, especialmente los poliinsaturados, con una susceptibilidad que aumenta con el grado de insaturación, y estos son denominados lípidos peroxidables. Esto se debe a que los lípidos poliinsaturados poseen carbonos -CH<sub>2</sub>- bis-alílicos, lo que significa que se encuentran adyacentes a dos dobles enlaces que pueden estabilizar por resonancia el radical formado por la abstracción de un hidrógeno de ese carbono, como se observa en la **figura 2.15**. Los enlaces C-H de esos carbonos tienen una energía de disociación mucho menor que la de los carbonos cuyos radicales no pueden ser estabilizados por resonancia, lo que los convierte en blancos preferenciales para la abstracción de átomos de hidrógeno y el ataque de radicales libres a sus dobles enlaces<sup>99,100</sup>. En la **tabla 2.III** se muestran las constantes de velocidad para la oxidación de algunos ácidos grasos relevantes por radicales libres en solución (los valores pueden cambiar para las reacciones en membrana).

**Tabla 2.IV. Constantes de reacción de algunos radicales libres con ácidos grasos relevantes y con alfa tocoferol.** Extraído de <sup>49,68,102,103</sup>.

Sustrato	k (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )			
	Peroxilo (ROO <sup>·</sup> )	Alcoxilo (RO <sup>·</sup> )	Hidroxilo (OH <sup>·</sup> )	Dióxido de nitrógeno ( <sup>·</sup> NO <sub>2</sub> )
Ácido Estéarico (18:0)	<10 <sup>-3</sup>	2,3×10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>	
Ácido Oleico (18:1)	<1	3,3×10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>	<1
Ácido Linoleico (18:2)	62	8,8×10 <sup>6</sup>	9×10 <sup>9</sup>	2×10 <sup>5</sup>
Ácido Linolénico (18:3)		1,3×10 <sup>7</sup>	7×10 <sup>9</sup>	
Ácido Araquidónico (20:4)	197	2,0×10 <sup>7</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>6</sup>
α-tocoferol	3,5×10 <sup>6</sup>	3,1×10 <sup>8</sup>	10 <sup>10</sup>	<10 <sup>5</sup> (pH neutro)

El inductor de la lipoperoxidación será uno de los determinantes de las características del proceso, ya que diferentes iniciadores tienen distintos comportamientos<sup>101</sup>. Iniciadores biológicamente relevantes pueden ser por ejemplo metales de transición, ROS, RNS, irradiación y radicales proteicos. En sistemas modelo también suelen usarse azoiniciadores, moléculas hidrofóbicas (que se localizan en la bicapa y generan un suministro interno de radicales) o hidrofílicas (que se localizan en solución y generan un suministro externo de radicales) que se descomponen espontáneamente para dar N<sub>2</sub> y radicales libres con un flujo conocido de radicales libres que ayuda a estudiar la cinética<sup>100</sup>. Los metales de transición como el hierro y el cobre pueden actuar como iniciadores a partir de lipoperóxidos preexistentes, como se muestra en las reacciones 13, 14 y 15 (aunque estos mecanismos de reacción aún son debatibles)<sup>104,105</sup>. Además de depender de la concentración inicial de lipoperóxidos, luego de generar radicales libres iniciadores los metales de transición pueden continuar actuando sobre otros lipoperóxidos, lo que genera una aceleración en la lipoperoxidación. La cinética de la lipoperoxidación iniciada por metales de transición es cinéticamente compleja,

ya que el sustrato para la iniciación aumenta a medida que continúa la lipoperoxidación (autoaceleración), pero además su efectividad depende de factores biofísicos de la membrana que también se ven afectados por la oxidación, por lo que este tipo iniciadores no permiten un análisis cinético riguroso en función de concentraciones y perfiles de oxidación<sup>101,104,105</sup>.



Por otro lado, cuando los iniciadores son generadores orgánicos de radicales libres el análisis cinético es más simple, ya que la velocidad de generación de radicales puede ser constante y no es un proceso auto-acelerado como el descrito anteriormente. Estos suelen ser los utilizados en los estudios cinéticos de la lipoperoxidación, existiendo modelos matemáticos mejor definidos<sup>104</sup>.

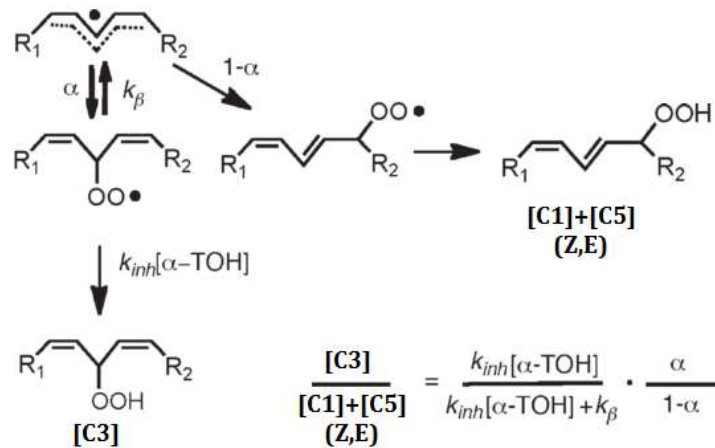
## ii) Propagación:

La propagación consta de una serie de pasos en que un lípido oxidado oxida a un lípido no oxidado, transfiriendo la característica de radical a una nueva molécula.

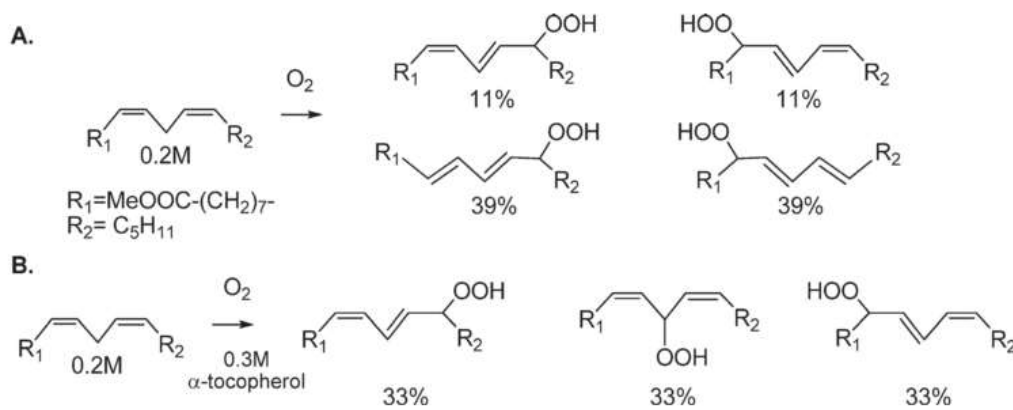
El primer paso es el de la adición de un oxígeno molecular al radical lipídico generando un radical lipoperóxilo, reacción con velocidad limitada por difusión (y reversible, como se puede observar en la **figura 2.13**). En el radical pentadienilo la densidad de spin se encuentra localizada en los carbonos de los extremos y en el central (ej. en el ácido linoleico serían los carbonos 9, 11 y 13), por lo que a priori el oxígeno podría añadirse a cualquiera de estos carbonos para formar un radical peróxilo centrado en uno de ellos. Sin embargo el lipoperóxido no conjugado, centrado en el carbono 11, sólo se encuentra cuando la lipoperoxidación se da en presencia de muy altas concentraciones de un buen donante de átomos de hidrógeno como el  $\alpha$ -tocoferol<sup>100</sup>. Esto se debe a que el enlace peróxilo-carbono es más débil para el carbono central que para los carbonos en los extremos, y este se disocia rápidamente a menos que sea atrapado por un donante de H $\cdot$  (como se puede apreciar en las constantes de velocidad en la **figura 2.15**), por lo que el hidroperóxido derivado de este radical es un producto cinético. Esta competencia cinética es de relevancia en estudios de lipoperoxidación, ya que la relación entre la cantidad de hidroperóxido formado en el carbono central del radical pentadienilo, y los hidroperóxidos conjugados con estereoisometría Z,E formados por la adición del oxígeno a los carbonos de los extremos, es un parámetro utilizado para determinar la velocidad con que un antioxidante puede donar un átomo de hidrógeno en bicapas lipídicas, como se muestra en la **figura 2.16**<sup>106</sup>.

Los productos con estereoisomería E,E son más estables termodinámicamente, pero requieren de dos reacciones adicionales, como se observa en la **figura 2.15**.

La distribución de productos, como se mencionó previamente, estará determinada por diversos factores, entre ellos la presencia de antioxidantes. En la **figura 2.17** se observa el cambio en la distribución de productos entre un escenario sin donante de átomos de hidrógeno, en que se generarán los productos más estables, y un medio con alta concentración de  $\alpha$ -tocoferol, en que se favorecerán la estabilización de los primeros intermediarios formados. Esto indica que la relación entre estos productos puede ser un indicador de la capacidad antioxidante de un medio, tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>100</sup>.



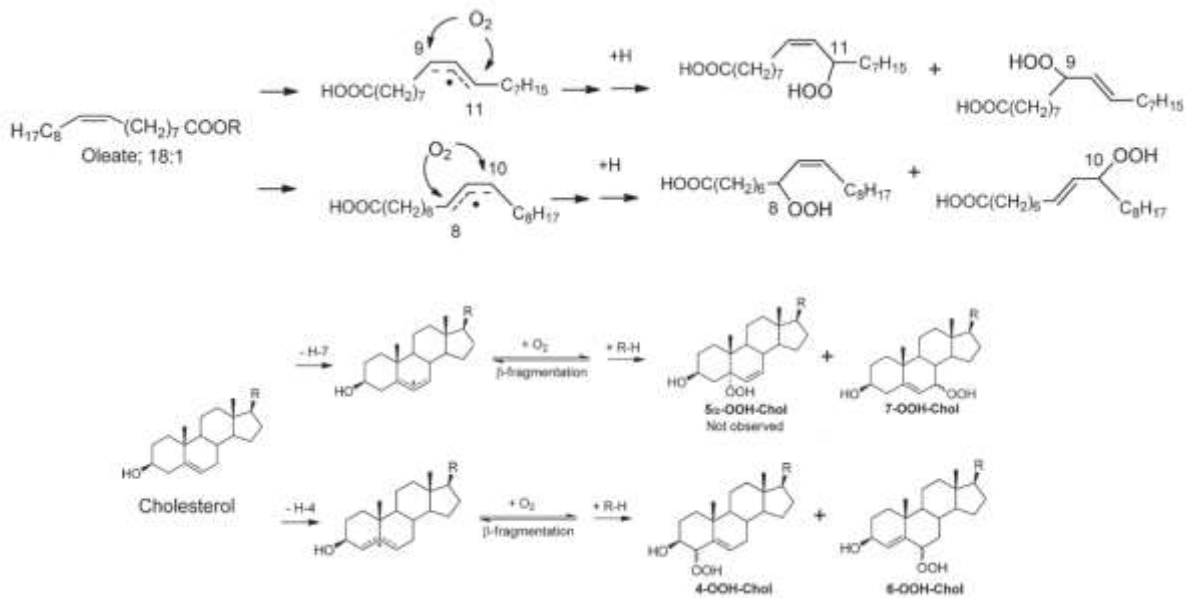
**Figura 2.16. Fundamento químico del radical clock aplicado a la reacción entre LOO<sup>•</sup> y tocoferol.** Competencia cinética en la formación de diferentes estereoisómeros, y su utilidad en la determinación de constantes de velocidad en la inhibición de la lipoperoxidación. Modificado de <sup>106</sup>.



**Figura 2.17. Efecto de los antioxidantes sobre la distribución de productos de lipoperoxidación.** A) Distribución de productos en medio con baja capacidad de donación de H B) Distribución de productos en un medio con alta capacidad de donación de H. (En ambos casos valores reportados para metil-linolato a 37°C en medio orgánico). Extraído de <sup>100</sup>.

En el caso del ácido oleico los radicales generados en los carbonos adyacentes a su doble enlace estarán deslocalizados entre tres átomos de carbono, pudiéndose adicionar el oxígeno a los de los extremos con igual probabilidad. Debido a que el

radical se puede generar mediante la abstracción de H de dos carbonos diferentes, el oxígeno se puede adicionar a 4 carbonos distintos con similar probabilidad. El colesterol también puede sufrir abstracción de un H adyacente a su doble enlace, en el carbono 7 o en el carbono 4, lo que podría generar hidroperóxidos en las posiciones 4, 5, 6 y 7, aunque productos de adición de oxígeno en el carbono 5 no han sido observados<sup>100</sup>. En la **figura 2.18** se muestran las estructuras de estos dos lípidos y de los radicales primarios e hidroperóxidos que pueden formar.



**Figura 2.18. Radicales primarios y principales hidroperóxidos formados a partir del ácido oleico y del colesterol.** Modificado de <sup>100</sup>.

El paso lento en la cadena de propagación es la transferencia de un átomo de hidrógeno de un lípido a un radical lipoperoxilo. Así como se describió que la relación entre hidroperóxidos en el carbono 11, e hidroperóxidos en los carbonos 9 y 13 ha sido utilizada para estimar constantes cinéticas de transferencia de H por antioxidantes, la relación entre estereoisómeros Z,E y E,E ha sido utilizada para estimar las velocidades de reacción entre dos lípidos y calcular las constantes de velocidad de propagación  $k_p$ , ya que cuanto más rápida sea la reacción de propagación de la característica radicalarea, más radicales lipoperoxilos serán estabilizados con la estereoisomería Z,E, como se puede deducir de la **figura 2.15** (método llamado “radical clock”)<sup>100,107</sup>. En la **tabla 2.V** se observan valores de  $k_p$  en solución y en bicapa reportados en un mismo artículo a través del “radical clock”. Debe tenerse en cuenta que las constantes de velocidad para reacciones de lípidos pueden ser reportadas en solución o en bicapa, existiendo posibles diferencias entre ellas. Un ejemplo interesante de las diferencias entre los dos sistemas es que en medios homogéneos la reactividad del radical peroxilo situado

en el carbono 9 del ácido linoleico es igual que la del radical situado en el carbono 13, sin embargo esta simetría se pierde en la bicapa, debido a que las limitaciones espaciales y el microambiente es diferente para los dos radicales. Sin embargo otras propiedades sí son similares entre los dos sistemas. Un ejemplo son los valores relativos de  $k_p$  en la tabla, que son proporcionales a la cantidad de carbonos bis-alílicos presentes en el ácido graso, tanto en solución como en membrana, y el hecho de que las mismas fórmulas cinéticas aplican a ambos sistemas<sup>100,107</sup>.

**Tabla 2.V. Valores de  $k_p$  para lípidos en solución o en bicapa.** La n en las unidades de la constante en bicapa se refiere a la fracción molar del lípido en la bicapa. Extraído de <sup>100,107</sup>. (ND=No Determinado)

Ácido graso	$k_p$ en benceno ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_p$ en bicapa ( $n^{-1}s^{-1}$ )	$k_p$ relativo en solución	$k_p$ relativo en bicapa	Carbonos bis-alílicos
Oleato	0,9	ND	0,014	ND	0
Linoleato (18:2)	62	35	1	1	1
Araquidonato (20:4)	197±13	115±7	3,2	3,3	3
Eicosapentaonato (20:5)	249±16	145±8	4,0	4,1	4
Docosahexaenoato (22:6)	334±37	172±13	5,4	4,9	5

Además de la abstracción de un átomo de hidrógeno de otro lípido, los radicales lipoperoxilo pueden seguir otros caminos de reacción, como por ejemplo la adición a los dobles enlaces de otros lípidos, o la ciclización intramolecular, lo que aumenta enormemente la complejidad de la lipoperoxidación y la cantidad de productos posibles, aunque no se profundizará en estas reacciones<sup>100</sup>.

### iii) Terminación:

La terminación de la lipoperoxidación es el evento en que un radical lipídico pierde su característica radical sin pasarla a un siguiente lípido. Esto puede darse de dos formas distintas, oxidando a otra molécula (antioxidantes generalmente) transfiriéndole la característica radical, o conjugándose con otro radical para dar un aducto (por ejemplo, la combinación entre dos radicales lipoperoxilo, o la combinación entre un radical lipídico y el óxido nítrico). Generalmente en presencia de antioxidantes como el alfa tocoferol, la terminación a través de esta molécula, y una vez que se depleta, comienza a darse la terminación por la combinación de radicales lipídicos<sup>101,104</sup>.

### b) Métodos de cuantificación de la lipoperoxidación:

Varios métodos distintos ya han sido desarrollados para medir la lipoperoxidación en distintas muestras, como muestras de relevancia industrial, sistemas modelo para el estudio de los procesos oxidativos y muestras biológicas de relevancia

médica para ser usado, por ejemplo, como biomarcador. Sin embargo el surgimiento de nuevos métodos y la puesta a punto de estos sigue siendo un área en desarrollo, por la gran variedad de productos finales que se producen, los distintos niveles de complejidad que requieren distintos análisis, las complicaciones que generan las características físicas de este tipo de moléculas y su inestabilidad<sup>100,108-110</sup>. En la referencia <sup>111</sup>, un review de 2014 en el tema, se dice que no existe método suficientemente específico, preciso, sensible y cuantitativo para poder medir los productos de lipoperoxidación en muestras biológicas.

Al ser los radicales lipídicos especies de vida corta, la amplia mayoría de los análisis de lipoperoxidación utilizan métodos para detectar los productos finales de estas reacciones. Hasta ahora se han discutido los productos principales de la lipoperoxidación, que son los lipoperóxidos, de los cuales, como ya se ha visto, existe una gran variedad, pero los productos son mucho más variados, como se mencionó, y varios de ellos pueden ser analizados.

### **i) Yodimetría:**

Durante mucho tiempo el método yodimétrico fue la principal técnica para medir lipoperóxidos en una variedad de muestras. Este método se basa en la reacción 18, en que los lipoperóxidos pueden convertir 2 aniones yoduro en una molécula de yodo. Este luego puede ser titulado, o en exceso de yoduro puede convertirse en triyoduro, con picos de absorbancia a 290 nm y 360 nm<sup>108,111</sup>. Una de las mayores desventajas de este método es su sensibilidad al oxígeno y que otros hidroperóxidos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también puede oxidar al ioduro y generar interferencias<sup>108</sup>.



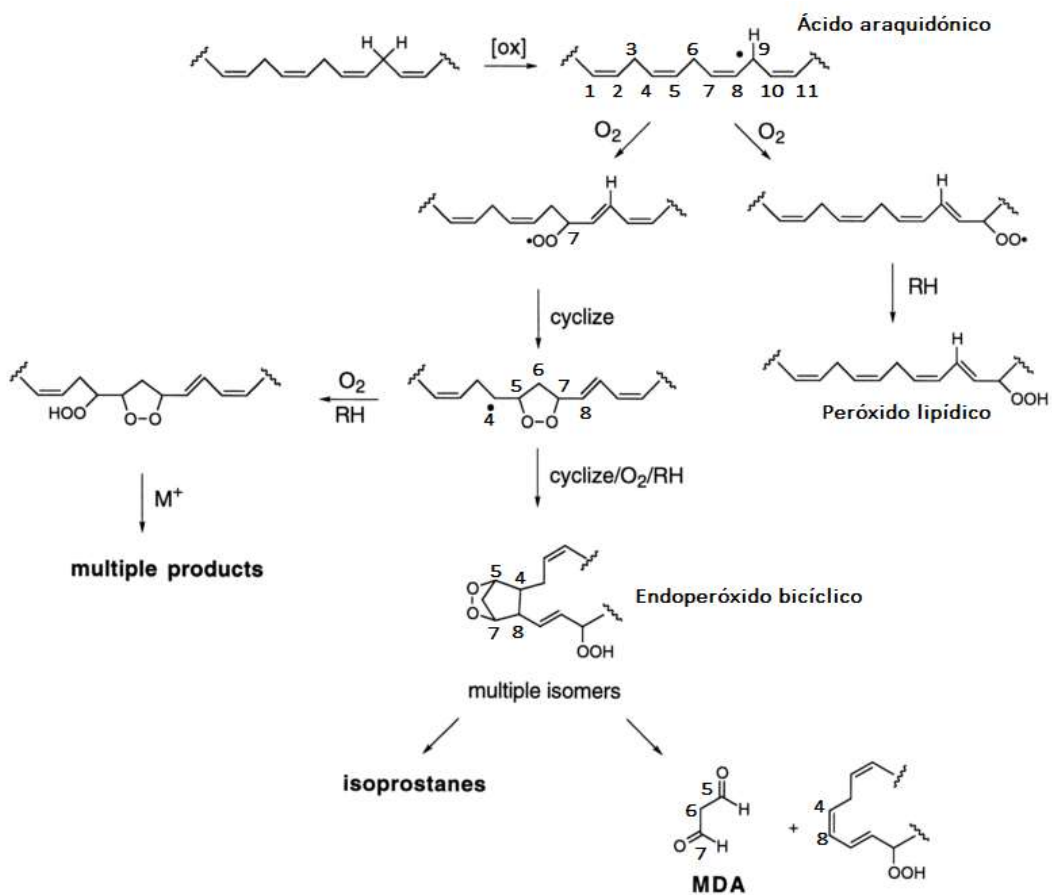
### **ii) Método FOX:**

Un método colorimétrico que actualmente tiene mucha difusión es el método FOX (Ferrous Oxidation–Xylenol Orange). Este método se basa en la oxidación del hierro ferroso (como se puede ver en la reacción 16) por parte de los hidroperóxidos lipídicos, y el posterior cambio en el espectro del Xylenol Orange al acomplejarse con hierro férrico. Una ventaja de este ensayo respecto al método iodimétrico es su fácil implementación, al no tener una sensibilidad importante a la presencia de oxígeno<sup>112</sup>. Sin embargo se han reportado varios factores que afectan su rendimiento, y que llevan a que el método no tenga una gran reproducibilidad, y que genera que muchas veces este tenga que ser optimizado para diferentes sistemas. Varias sustancias comúnmente presentes en muestras biológicas parecen interferir con el ensayo, que además no es específico para los hidroperóxidos lipídicos, e incluso se ha reportado que bajo ciertas condiciones puede formarse un complejo entre el complejo Fe–XO y la fosfatidilcolina que genera un corrimiento importante en el máximo de absorbancia del primero<sup>109,113</sup>. Dos factores

adicionales que vale la pena mencionar son que las características de absorción del Xylenol Orange y su respuesta en el ensayo pueden variar según el proveedor y el batch del reactivo, y que diferentes hidroperóxidos pueden generar  $\text{Fe}^{3+}$  con distinta estequiometría, por lo que los resultados del FOX muchas veces suelen expresarse como equivalentes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o de hidroperóxido de cumeno<sup>109,114</sup>.

### iii) Método TBARS:

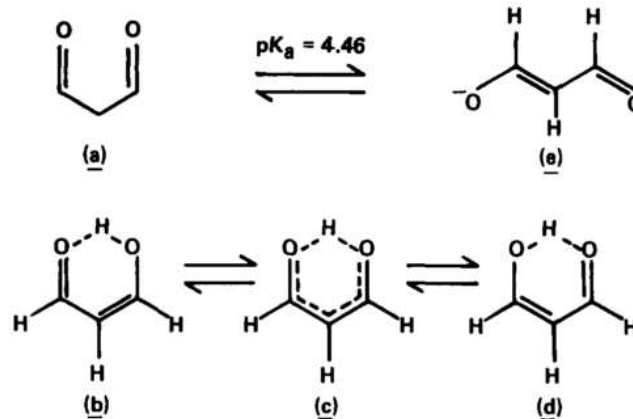
El método TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Species) es otro método colorimétrico, que se basa en la formación de un aducto entre en ácido tiobarbitúrico (TBA) y el malondialdehído (MDA)<sup>115</sup>. El MDA es un producto de la oxidación de lípidos con 3 o más dobles enlaces<sup>116</sup>. Se piensa que la principal fuente biológica de malondialdehído es la descomposición de los endoperóxidos bicíclicos formados durante la lipoperoxidación, como se muestra en la **figura 2.19**, aunque otras especies, como la que también se observa en la figura que cuenta con un hidroperóxido y un endoperóxido cíclico (el de más a la izquierda en la imagen) también son capaces de formar<sup>115,117,118</sup>.



**Figura 2.19. Generación de malondialdehído a partir de la oxidación lipídica.** Modificado de <sup>117</sup>



El malondialdehído es una molécula reactiva, que en solución se encuentra principalmente en su forma enólica (estructuras b, c, d y e en la **figura 2.20**), y dado su  $pK_a$  de 4,46 en solución acuosa en condiciones fisiológicas se encuentra principalmente como enolato (**figura 2.20**, estructura e) lo que le permite actuar como nucleófilo o electrófilo. La forma enólica no cargada tiene una reactividad mayor, particularmente hacia nucleófilos<sup>115</sup>.

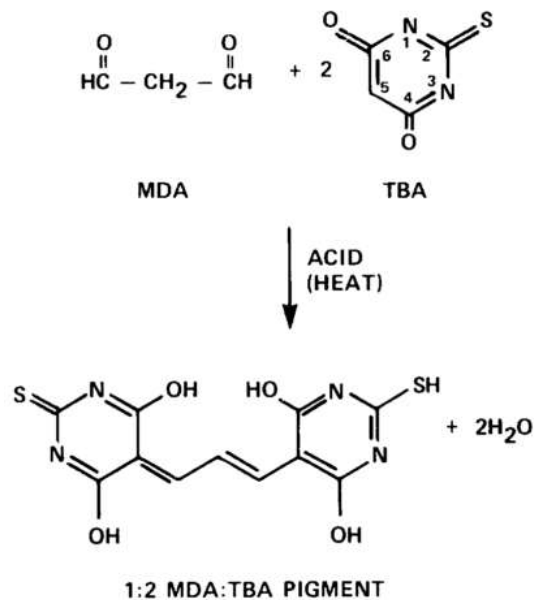


**Figura 2.20. Formas químicas que adopta el malondialdehído. Extraído de** <sup>115</sup>

La reactividad del MDA hace que pueda reaccionar con distintos grupos de las moléculas biológicas. Por ejemplo, puede reaccionar con las bases de ADN generando aductos que luego producen mutaciones, siendo el MDA una molécula altamente mutagénica<sup>117</sup>. También puede modificar proteínas, formando bases de Schiff con residuos de lisina, y generando entrecruzamiento de proteínas que pueden ser modificaciones relevantes de la LDL al aumentar la afinidad de los macrófagos por ésta<sup>116,119</sup>. La acción del MDA en tejidos ha sido asociada a diversas patologías como el Parkinson, la aterosclerosis, diabetes y cáncer de colon<sup>118</sup>.

La cuantificación del MDA ha sido ampliamente utilizada por muchos años como indicador de lipoperoxidación y de estrés oxidativo en muestras biológicas y en sistemas modelo, debido a que es una especie de vida relativamente larga si se la compara con otros productos e intermediarios de la lipoperoxidación. El método más utilizado para medir MDA ha sido el ensayo TBARS, en que se explota la reactividad de esta molécula con nucleófilos a alta temperatura y bajo pH para generar un aducto coloreado y fluorescente entre el MDA y el TBA, como se observa en la **figura 2.21**, aunque su validez como índice de lipoperoxidación o de estrés oxidativo es muy controversial<sup>8,115</sup>. Este método cuenta con la desventaja de que existen otras especies que pueden reaccionar con el TBA para dar aductos coloreados, lo que hace que el ensayo a priori no tenga una buena selectividad, especialmente cuando se analizan muestras complejas (aunque técnicas adicionales como separación por HPLC pueden ayudar a aumentar la selectividad). Además el uso de este ensayo como indicador de la oxidación lipídica implica asumir que esta guarda una relación proporcional con la producción de MDA, lo

que no en todos los casos es válido, dada la alta complejidad de la oxidación de lípidos, sobre todo en el medio biológico. Por ejemplo, muestras con diferentes tipos de lípidos tendrán distintas relaciones entre la lipoperoxidación y la generación de MDA, por lo que la comparación entre sistemas simples con diferente composición lipídica debe hacerse cuidadosamente<sup>115</sup>.



**Figura 2.21. Reacción entre el ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído en el ensayo TBARS.** Extraído de <sup>115</sup>.

### **3) Objetivos:**

#### **Objetivo General:**

El objetivo de este trabajo es estudiar los mecanismos de nitración de tirosina en ambientes hidrofóbicos, y el efecto que algunos factores fisicoquímicos y bioquímicos tienen sobre esta modificación postraduccional, poniendo énfasis en el vínculo entre la lipoperoxidación y la nitración de tirosina, y particularmente, en el radical lipoperoxilo como especie oxidante de la tirosina. Se utilizarán liposomas y péptidos transmembrana conteniendo residuos de tirosina en diferentes posiciones como modelo.

#### **Objetivos específicos:**

1. Estudiar el efecto de la posición de la tirosina en la bicapa sobre su nitración, y el rol que juega la presencia de lípidos oxidables en el sistema.
2. Estudiar los efectos del  $\alpha$ -tocoferol sobre la nitración de tirosina para hipotetizar sobre su posible rol biológico como defensa ante esta modificación.
3. Estudiar el efecto de la concentración de oxígeno en los modelos con y sin lípidos oxidables, para ver posibles efectos de la lipoperoxidación.

## **4) Materiales y métodos:**

### **a) Materiales:**

El fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sulfato de amonio ferroso  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), ácido desoxicólico y  $(\pm)$   $\alpha$ -tocoferol fueron adquiridos de Sigma. El fosfato de sodio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), ácido 2,2,2-trifluoroacético (TFA), ácido tiobarbitúrico y el trifluoroetanol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los fosfolípidos fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids. Los péptidos transmembrana conteniendo tirosina fueron adquiridos de Bachem. El hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) fue adquirido de Applichem. El naranja de xilenol fue adquirido de Fluka. El cloroformo fue adquirido de Mallinckrodt Chemicals, el etanol fue adquirido de Carlo Erba, el acetonitrilo fue adquirido de R. Benzo y el metanol fue adquirido de Pharmco-AAPER. En todos los experimentos se utilizó agua ultrapura y se enjuagó los recipientes previo a su uso.

### **b) Métodos:**

#### i) Síntesis del peroxinitrito:

El peroxinitrito utilizado fue sintetizado a partir de nitrito de sodio y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en medio ácido en un reactor de flujo detenido como se describe en <sup>32</sup>, excepto que se utilizó  $\text{MnO}_2$  granular y no en columna para eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las soluciones de peroxinitrito fueron almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$ , y su concentración se cuantificó previo a cada experimento midiendo su absorbancia a 302 nm, usando su coeficiente de absorptividad molar de  $\epsilon=1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a esa longitud de onda como se indica en <sup>29</sup>. Todas las diluciones necesarias se prepararon en soluciones de hidróxido de sodio entre 5 mM y 20 mM. Para los experimentos con adición reversa se diluyó el peroxinitrito en agua y se agregó ácido clorhídrico hasta observar la desaparición del característico color amarillo (cuidando de mantener el pH en el entorno a 7). El equipo empleado en la cuantificación fue un espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 Tablet, Varian, Inc.

#### ii) Formación de liposomas:

Las soluciones de lípidos fueron preparadas en cloroformo y almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$  o  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. Para preparar liposomas multilamelares primero se evaporó el cloroformo bajo un flujo de  $\text{N}_2$  para obtener una capa de lípido sobre las paredes del recipiente, torneándolo para obtener una capa lo más homogénea posible. En la mayoría de los experimentos luego se sometió a las capas de lípido resultantes a vacío de  $\sim 50$  mbar durante 1-3 horas para eliminar las trazas de cloroformo. Las capas de lípido seco resultantes fueron almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$  bajo Argón hasta ser utilizadas, en la mayoría de los casos dentro de las 24 horas siguientes. Los

liposomas se formaron al agregarse al recipiente una solución filtrada de amortiguador fosfato 100 mM, pH=7,4 con quelante DTPA 0,1 mM, acompañada de agitación. Las moléculas que se incorporaron a los liposomas se añadieron en solución (metanol/TFA 2,5% ó TFE en el caso de los péptidos, metanol en el caso del BTBE y etanol en el caso del tocoferol) a los liposoma en cloroformo previo a la formación de la capa de lípidos.

Los liposomas unilamelares se generaron con un sonicador de punta, sonicando los liposomas multilamelares en hielo, durante tandas de ~10 segundos hasta que la suspensión se volviera translúcida. Luego se centrifugó la suspensión resultante para separar de la solución el óxido de titanio de la punta del sonicador y los liposomas multilamelares restantes.

### iii) Procesamiento de las muestras y análisis de nitración por HPLC:

Para los liposomas conteniendo péptidos se ensayaron dos métodos de procesamiento distintos, uno descrito por Zhang *et al* (2003)<sup>120</sup> y otro diseñado en este trabajo. En el anexo se encuentra una comparación entre ambos (**figura suplementaria 1**).

En el método reportado por Zhang, con ligeras modificaciones, se suspendieron 50  $\mu$ L de liposomas en 950  $\mu$ L de agua. Luego se centrifugó la suspensión a 12800 rpm durante 2 horas para precipitar los liposomas conteniendo los péptidos y descartar el sobrenadante. En algunos experimentos en esta etapa se secó el pellet sometándolo a vacío en un SpeedVac Thermo Scientific SPD1010. Finalmente se redisolvió el pellet en metanol con 2,5% de TFA (V/V).

En el método diseñado en este trabajo se disolvió a los liposomas con una solución de etanol con 2,5% de TFA y 5% de TFE V/V. A un volumen de suspensión de liposomas se agregaron 2 volúmenes de la mezcla etanólica.

A las soluciones procesadas de las muestras con péptidos se las analizó por HPLC de fase reversa, en un sistema Agilent 1200, usando una columna Agilent Eclipse XDB-C18, de 15 cm de largo y 4,6 mm de diámetro, con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m. La fase móvil A estuvo compuesta de acetonitrilo con 0,1% TFA (V/V), y la fase B compuesta de agua con TFA 0,1%, y se utilizó un flujo de 0,75 mL/min. El método comienza con 40% de fase A y 60% de fase B, manteniéndose isocrático hasta el minuto 5, cuando comienza un gradiente lineal de aumento en la fase A, de 2,25 %/min durante 20 minutos, para luego mantenerse en 85 % de fase A y 15 % de fase B durante 5 minutos más. Se mide la absorbancia a 280 nm y 360 nm, y fluorescencia con excitación a 291 nm y emisión a 401 nm.

A los liposomas conteniendo BTBE se los procesó mediante una extracción orgánica, agregando 50  $\mu$ L de metanol, 100  $\mu$ L de cloroformo y 20  $\mu$ L de cloruro de sodio 5M. A la fase orgánica conteniendo el BTBE se la evaporó bajo N<sub>2</sub>, y se

resuspendió el residuo seco en una solución de 85 % metanol y 15 % solución amortiguadora fosfato 15 mM pH=3. A estas muestras luego se las analizó por HPLC, usando el mismo equipo y la misma columna que para las muestras ya descritas, con un flujo de 1 mL/min. La fase móvil A estuvo compuesta de metanol, y la fase móvil B de solución amortiguadora fosfato 15 mM pH=3. El método comienza con 75 % de fase móvil A y 25 % de fase móvil B, que se mantiene durante 7 minutos, para luego pasar a incrementar la fase A con un gradiente de 4,16 %/min durante 6 minutos. Luego se mantiene 100 % de fase A durante 5 minutos antes de regresar a las condiciones iniciales con un gradiente de 5 minutos. Se mide absorbancia a 280 nm y 360 nm, y fluorescencia con excitación a 294 nm y emisión a 401 nm.

A las muestras de tirosina en solución se las analizó por HPLC, inyectando las muestras sin procesar en el sistema de HPLC ya descrito. Se utilizó una columna de fase reversa C18 TOSOH-Bioscience, TSKgel ODS-120A de 25 cm de largo y 4,6 mm de diámetro, con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m. La separación se realizó con un método isocrático con una mezcla de 97 % solución amortiguadora de fosfato 50 mM a pH=3, y 3 % de metanol, a un flujo de 1 mL/min durante 33 minutos. Se midió la absorbancia a 280 nm y 360 nm y la fluorescencia con excitación a 294 nm y emisión a 401 nm.

A las muestras de tirosina en presencia de liposomas de DLPC se les agregó desoxicolato al 1,2 % (g/100mL) para solubilizar los liposomas, y luego se cuantificó la cantidad de derivado nitrado alcalinizando con NaOH 5 M y midiendo absorbancia a 430 nm, utilizando  $\epsilon=4100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### iv) Ensayo TBARS:

Se le agregó a 50  $\mu$ L de las muestras BHT en etanol al 0,025 % (m/V) (aproximadamente 1,1 mM) para detener la lipoperoxidación. A estas luego se les agregaron 150  $\mu$ L de solución TBARS (33 mM de TBA, 18,7 mM de SDS y 9,8 % de ácido acético V/V, preparado en agua) y 150  $\mu$ L de ácido acético 21 %, y se las incubó a 80  $^{\circ}$ C durante 1 hora. Posteriormente se les agregaron 300  $\mu$ L de metanol y 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético 6 mM, y se centrifugaron a 13.000 g durante 10 minutos. Se cuantificó el TBA formando aductos en el sobrenadante por HPLC o en placa, midiendo su fluorescencia con excitación a 515 nm y emisión a 553 nm, y su absorbancia a 532 nm. En todos los experimentos se realizaron curvas de calibración con 1,1,3,3-tetrametoxipropano, que produce MDA por hidrólisis ácida. En algunos experimentos se varió el volumen de muestra utilizado, variando de forma directamente proporcional el resto de los volúmenes.

Para la cuantificación por HPLC se utilizó el equipo mencionado anteriormente, con una columna C18 de 25 cm de largo y 4,6 mm de diámetro, con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m. Se analizó con un método isocrático de 20 minutos, usando

como fase móvil una mezcla de 72 % de amortiguador fosfato 10 mM pH=6,8, 17 % de metanol y 11 % de acetonitrilo, con un flujo de 1 mL/min.

v) Cámara hipóxica:

Para modular la concentración de oxígeno en las muestras se utilizó una cámara hipóxica de Coy Laboratory Products, a la que se bombea nitrógeno hasta llegar al porcentaje de oxígeno deseado (medido en tiempo real dentro de la cámara). Las muestras se dejaron equilibrar con la atmósfera hipóxica durante 30 minutos y luego se les agregó oxidante sin perturbar la atmósfera dentro de la cámara.

vi) Software matemático:

Las gráficas y los ajustes matemáticos se realizaron con el programa OriginPro 8. Los ajustes lineales fueron calculados por mínimos cuadrados por el programa. Los errores reportados son la desviación estándar para cada punto ( $\pm$ SD), calculada utilizando Microsoft Excel 2010.

vii) Simulaciones de dinámica molecular:

Los datos de dinámica molecular se obtuvieron en colaboración con el grupo de Modelado Molecular de la Universidad de Buenos Aires. Las simulaciones se llevaron a cabo empleando una bicapa de 66 moléculas de 1,2-palmitoil-linoleoil-fosfatidilcolina con el péptido correspondiente inserto. Se utilizó el campo de fuerza CHARMM36 para los lípidos y el CHARMM27 para los péptidos. Luego de insertar el péptido (con la estructura de  $\alpha$ -hélice) en la bicapa previamente equilibrada con un área fijada de 70 Å<sup>2</sup>/molécula, se procedió a equilibrar nuevamente el sistema. Posteriormente como producción, los experimentos de dinámica molecular fueron extendidos 100 ns cada uno utilizando un ensamble NVT. Los mismos, fueron realizados con el programa ACEMD.

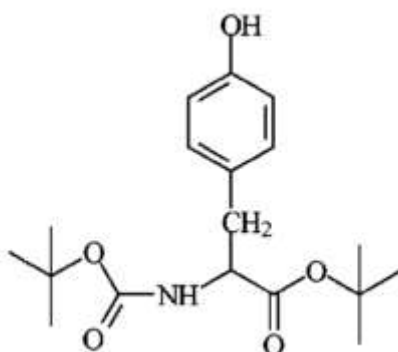
## 5) Resultados y discusión:

Para estudiar los mecanismos de nitración de tirosina en membranas se utilizaron sondas hidrofóbicas que consisten en péptidos transmembrana conteniendo tirosina en diferentes posiciones, y se las incorporó a liposomas de fosfatidilcolina con diferente composición. Las secuencias de los péptidos modelo utilizados en este trabajo se muestran en la **tabla 5.I**. Se trata de péptidos derivados de los llamados péptidos KALP de 23 aminoácidos, péptidos con repetidos de alanina leucina que favorecen la formación de una alfa hélice hidrofóbica, con dos residuos de lisina en cada extremo para favorecer el anclaje del péptido a las bicapas lipídicas. Estos contienen una tirosina en tres posiciones distintas, en la posición 4, la posición 8 y la posición 12, y en el trabajo se los llama Y4, Y8 e Y12 respectivamente.

**Tabla 5.I. Secuencia, peso molecular y pureza (reportada por el proveedor) de los péptidos utilizados en el trabajo.**

Péptido	Secuencia	Peso molecular (Da)	Pureza reportada por proveedor (medida por HPLC)
Y4	Ac-KKAYALALALALALALALAKK-NH <sub>2</sub>	2351	>89%
Y8	Ac-KKALALAYALALALALALAKK-NH <sub>2</sub>	2351	>90%
Y12	Ac-KKALALALALAYALALALAKK-NH <sub>2</sub>	2351	>87%

También se utilizó la sonda hidrofóbica BTBE en un experimento, cuya estructura se muestra en la **figura 5.1**.



**Figura 5.1. Estructura química del BTBE.** Extraído de <sup>121</sup>

Los lípidos utilizados fueron dilauril fosfatidilcolina (DLPC) y fosfatidilcolina de yema de huevo (EYPC). El DLPC es un fosfolípido con ácido láurico (12:0) en las posiciones 1 y 2 del esqueleto de glicerol, y se utilizó para los modelos sin lipoperoxidación. El EYPC es una mezcla de fosfolípidos extraídos de la yema de huevo, con un perfil variado de ácido grasos que se muestra en la **tabla 5.II** según está reportado por el proveedor. A partir de dicha tabla fácilmente se calcula que el



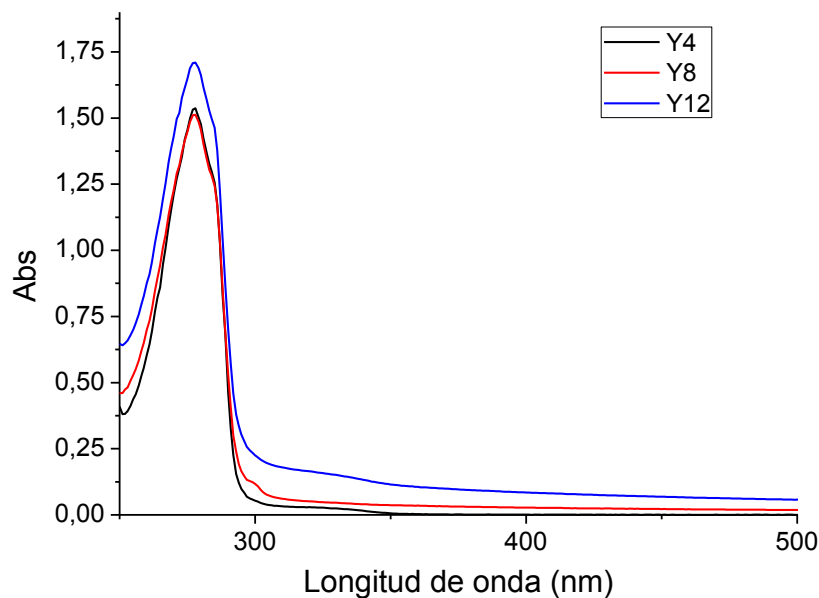
53,8 % de los ácidos grasos son insaturados y el 20,7 % de los ácidos grasos en la mezcla son poliinsaturados, por lo que esta mezcla de lípidos se utilizó como modelo para sistemas con lipoperoxidación.

**Tabla 5.II. Perfil de ácidos grasos del EYPC.**

Ácido graso	Porcentaje
14:0	0,2
16:0	32,7
16:1	1,1
18:0	12,3
18:1	32,0
18:2	17,1
20:2	0,2
20:3	0,3
20:4	2,7
22:6	0,4
Desconocido	1,0

### 5.1) Espectros UV-Vis de los péptidos:

Lo primero que se hizo fue registrar los espectros de soluciones 1mM de péptido que se muestran en la **figura 5.2**, preparadas en metanol con 2,5% de TFA como aditivo, que es el solvente que se reporta en un trabajo previo con estos péptidos para preparar las soluciones de trabajo. Los máximos de absorbancia se registraron a 278nm en los tres casos.



**Figura 5.2. Espectros de los péptidos utilizados en el trabajo, disueltos en metanol/TFA (2,5%). (n=1)**

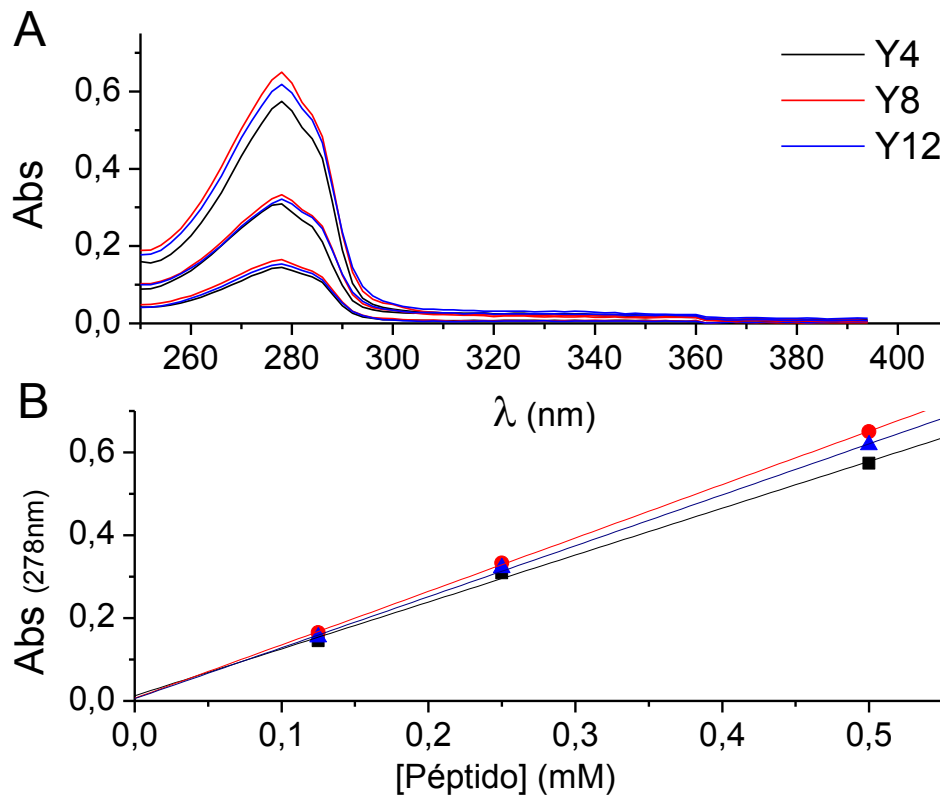
En la **tabla 5.III** se muestran los valores máximos de absorbancia, y los valores de absorptividad molar calculados a partir de ellos. Estos valores de absorptividad molar son muy similares a los reportados en la bibliografía para distintos derivados de la tirosina en solución acuosa ( $\sim 1500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a  $275,5 \text{ nm}$ )<sup>122</sup>, pero considerablemente mayores que los reportados para el análogo hidrofóbico de la tirosina, BTBE en una mezcla con 75 % metanol y 25 % de solución acuosa ( $1200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a  $280 \text{ nm}$ )<sup>121</sup>. Es notoria la diferencia entre Y12 y los otros dos péptidos, que no sólo se muestra en el pico de absorbancia, sino también para el resto de las longitudes de onda donde no se esperaría que exista absorbancia de ninguna especie (**figura 5.2**).

La mayor absorptividad de Y12 en todas las longitudes puede estar relacionada con la mayor turbidez que se observó macroscópicamente para su solución en metanol/TFA (2,5 %) en comparación con las soluciones de los otros dos péptidos. A su vez, la solución de Y8 en metanol/TFA 2,5 % es ligeramente más turbia que la solución de Y4, y en la **figura 5.2** también se aprecia que el espectro de Y8 tiene absorbancias mayores que Y4 en zonas en que no se esperaría tener especies absorbentes en la solución. Esta apreciación puede estar vinculada al orden de elución de los péptidos en cromatografía de fase reversa, que como se observa en la **figura 5.4** es Y4-Y8-Y12, indicando una hidrofiliidad decreciente en el orden Y4>Y8>Y12. El metanol es un solvente relativamente polar, por lo que posiblemente no sea un solvente ideal para estos péptidos con un gran segmento apolar. Además, los residuos de lisina que pueden dar una mayor solubilidad en solventes próticos al ionizarse, tienen una solubilidad baja en metanol<sup>123</sup>, que acompañada de la mayor hidrofobicidad del péptido Y12 puede estar favoreciendo la formación de agregados en esa solución que alejen el valor de absorptividad molar calculado del reportado para el BTBE. Sin embargo, en la solución se incluye al ácido 2,2,2-trifluoroacético (TFA) como contraión, a una concentración de 33 mM, lo que dificulta la racionalización molecular del fenómeno observado. El TFA es un aditivo usado como contraión en HPLC y en otras aplicaciones. Aunque no hay una única teoría de cómo ejerce su acción en la cromatografía, sí es aceptado que el 2,2,2-trifluoroacetato actúa formando pares iónicos con cationes y de esa forma aumenta la hidrofobicidad aparente de las moléculas con cargas positivas en cromatografía, por la hidrofobicidad de su grupo  $-\text{CF}_3$ <sup>124</sup>. En el caso de estas soluciones, a pesar de que en teoría el TFA puede ser capaz de ionizar a los residuos de lisina, también puede ser capaz de interactuar con ellos y aumentar las interacciones hidrofóbicas entre péptidos que favorezcan su agregación.

Los espectros se repitieron a diferentes concentraciones en etanol/TFE (6 %) (**figura 5.3**) y a partir de los máximos de absorbancia se calcularon los valores de absorptividad molar para cada péptido (**tabla 5.III**). En este caso los valores son menores que los observados en metanol/TFA (2,5 %) y más próximos al valor reportado para el BTBE. También se observa que los valores para los tres péptidos son más similares entre ellos que cuando se prepararon las soluciones en met/TFA

(2,5 %). Esto es consistente con el aspecto macroscópico de las soluciones de péptido en etanol/TFE, que son transparentes.

El TFE estabiliza las hélices alfa<sup>125</sup> y es el solvente utilizado para los péptidos KALP en estudios de biofísica de membrana<sup>126</sup>, por lo que es esperable que evite la formación de agregados que podrían formarse en metanol/TFA. La observación macroscópica de la diferencia de turbidez entre las soluciones preparadas en metanol/TFA (2,5 %) y las preparadas en etanol/TFE (6 %) se ve apoyada por las propiedades espectrales que mostraron estas soluciones.



**Figura 5.3. Espectroscopía de los péptidos disueltos en etanol/TFE.** A) Espectros de los péptidos a 1,25 mM, 2,5 mM y 5 mM. B) Absorbancia a 278 nm en función de [Péptido].(n=1)

Los datos obtenidos permiten concluir que las propiedades espectrales observadas del residuo de tirosina en los péptidos no varía considerablemente con respecto a las reportadas para la tirosina libre o las del BTBE. Diferencias de absorbancia para la tirosina en diferentes medios son esperables<sup>127</sup>, por lo que diferencias entre valores reportados para la tirosina libre, y los observados para los péptidos no necesariamente indican diferencias espectrales intrínsecas significativas, así como tampoco se puede afirmar que la menor absorptividad molar en etanol/TFE con respecto a metanol/TFA se deba exclusivamente a la formación de agregados propuesta. Sin embargo, la similitud entre los valores de las soluciones preparadas en etanol/TFE con respecto a las preparadas en metanol/TFA, y el hecho de que la solución de Y12 en met/TFA sea la más turbia y la que presenta la

mayor absorptividad molar apoyan la observación macroscópica de que el TFE sea un mejor aditivo que el TFA para preparar soluciones de trabajo de estos péptidos.

**Tabla 5.III. Valores de absorptividad molar calculados a partir de las figuras 5.2 y 5.3B.**

Péptido	Absorptividad molar (278 nm) ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	
	En metanol/TFA	En etanol/TFE $\pm$ SD
Y4	1540	1132 $\pm$ 62
Y8	1510	1290 $\pm$ 18
Y12	1710	1230 $\pm$ 36

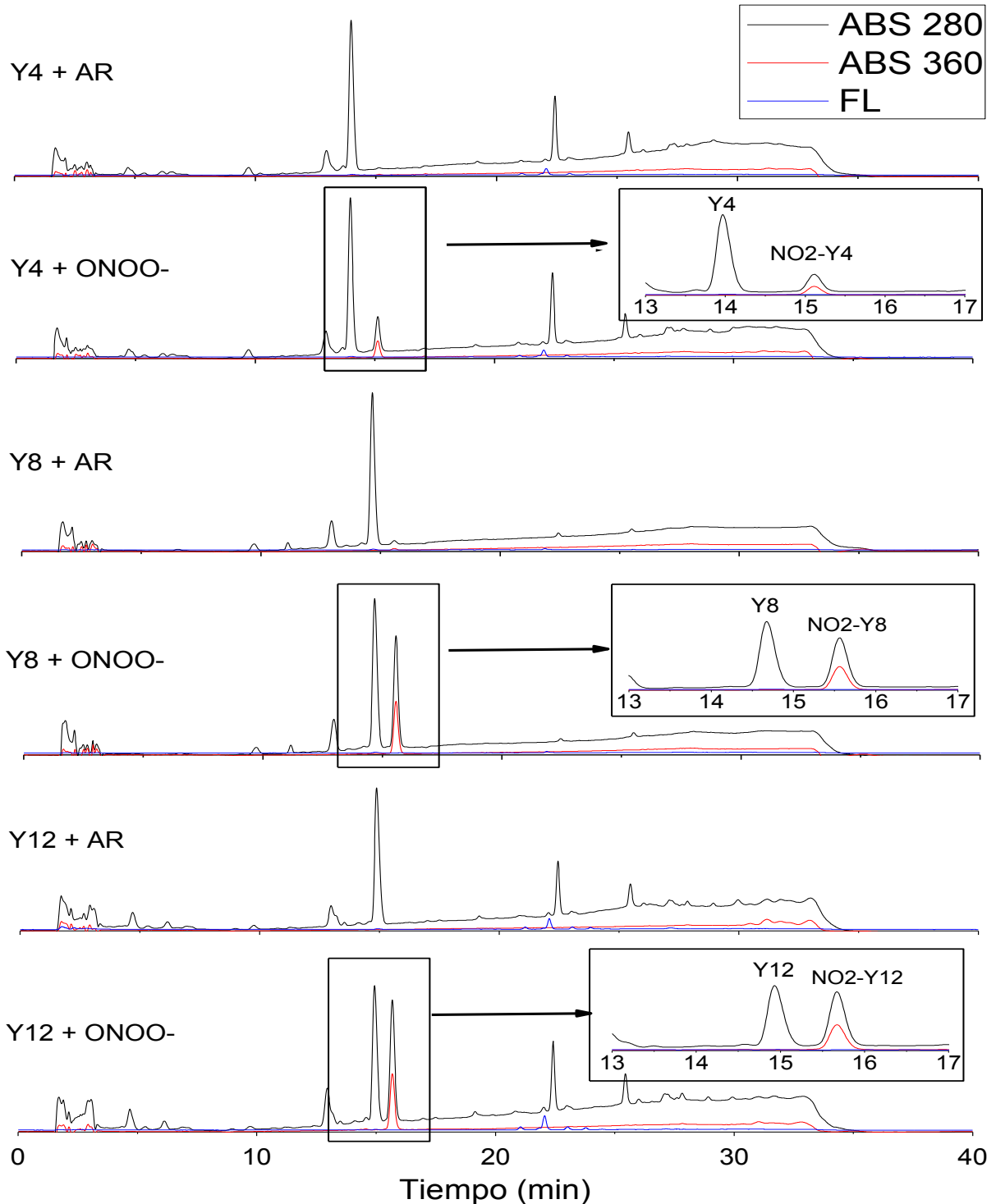
### 5.2) Nitración en función de [ONOO<sup>-</sup>] en bolo:

Para comenzar a estudiar el efecto de la posición de la tirosina en la membrana y del tipo de lípido que compone los liposomas sobre la nitración de tirosina, se comenzó observando cómo los cambios en estos factores alteran los rendimientos de nitración en el sistema más simple, que consta de la adición de peroxinitrito en forma de bolo (una gota), bajo una agitación vigorosa.

La cuantificación de las especies se realizó por HPLC de fase reversa, como se describe en materiales y métodos. En esta técnica se emplea una columna con una matriz orgánica de carácter hidrofóbico, y se utiliza una fase móvil polar. En la **figura 5.4** se muestran los cromatogramas de los péptidos, con y sin nitración, en los que se observa una clara separación entre los picos de péptido nitrado y péptido no nitrado (asignados simplemente por la correlación de su área con la concentración de péptido y de peroxinitrito agregados). También se observan varios picos no identificados, que en diferentes muestras aumentan o disminuyen de forma aparentemente aleatoria.

Una de las primeras observaciones al realizar este ensayo fue la existencia de variabilidad en la recuperación de péptido total en los diferentes sistemas, y entre experimentos independientes repetidos para un mismo sistema. Además en algunos casos se observó una disminución en la recuperación de péptido total con el agregado de peroxinitrito. Para poder comparar los valores de nitración ante la variabilidad de recuperaciones, se recurrió a una normalización de la cantidad de péptido nitrado por la cantidad total de péptido recuperado, que se reporta en el trabajo como porcentaje de péptido nitrado (Y-NO<sub>2</sub>%), y se calculó mediante la **ecuación 1**. No se tomaron en cuenta otras formas modificadas del péptido en la ecuación debido a que no se pudo detectar ninguna en los experimentos, aunque es posible que una de las razones de la disminución de la recuperación de péptido total con el aumento de la concentración de peroxinitrito se deba a la formación de especies no detectadas. Vale mencionar la ausencia de formación de dímeros de tirosina, en acuerdo con lo observado por Zhang et al<sup>120</sup>. Es importante resaltar que para que esta normalización tenga validez se realiza la asunción de que los

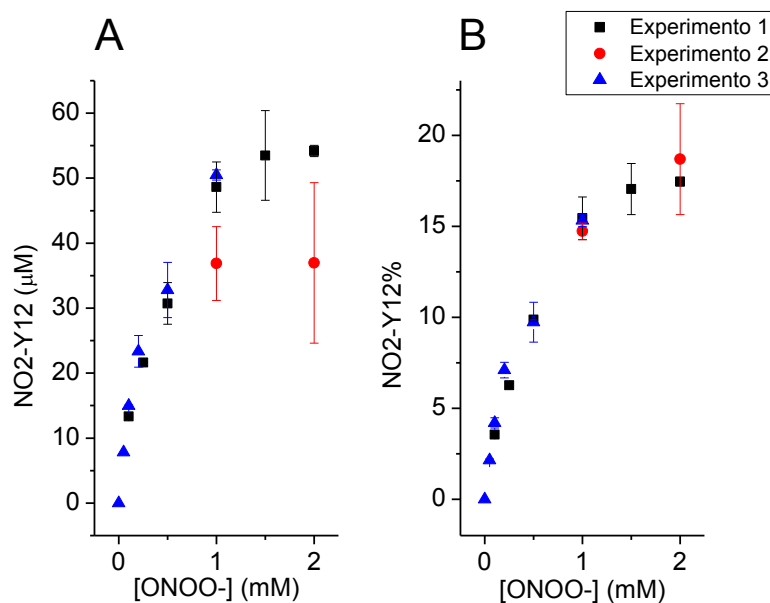
efectos que provocan variación de recuperación total entre las muestras afectan en la misma proporción la cantidad de péptido nitrado y de péptido no nitrado, de forma que la relación entre ellos no se ve afectada por estos factores.



**Figura 5.4. Cromatogramas de los péptidos.** Se muestran los cromatogramas para los tres péptidos luego de una adición reversa de  $\text{ONOO}^-$  y luego de agregado de  $\text{ONOO}^-$ . Los insertos en los cromatogramas con agregado de  $\text{ONOO}^-$  muestran una ampliación del cromatograma entre los 13 y los 17 minutos, donde eluyen todas las especies estudiadas.

$$Y - NO_2\% = 100 \times \frac{[Y - NO_2]}{[Y - NO_2] + [Y]} \quad \text{Ecuación 1}$$

A modo de ejemplo, en la **figura 5.5** se muestran los resultados obtenidos para Y12 en tres experimentos distintos de agregado de peroxinitrito en bolo, expresados en concentración de NO<sub>2</sub>-Y12 recuperado y en NO<sub>2</sub>-Y12 %. Se observa que las diferencias entre experimentos se acentúan cuando se expresa la cantidad de péptido nitrado en términos totales y no de forma normalizada, y que los desvíos estándar son mayores para casi todos los puntos en las gráficas con valores absolutos.

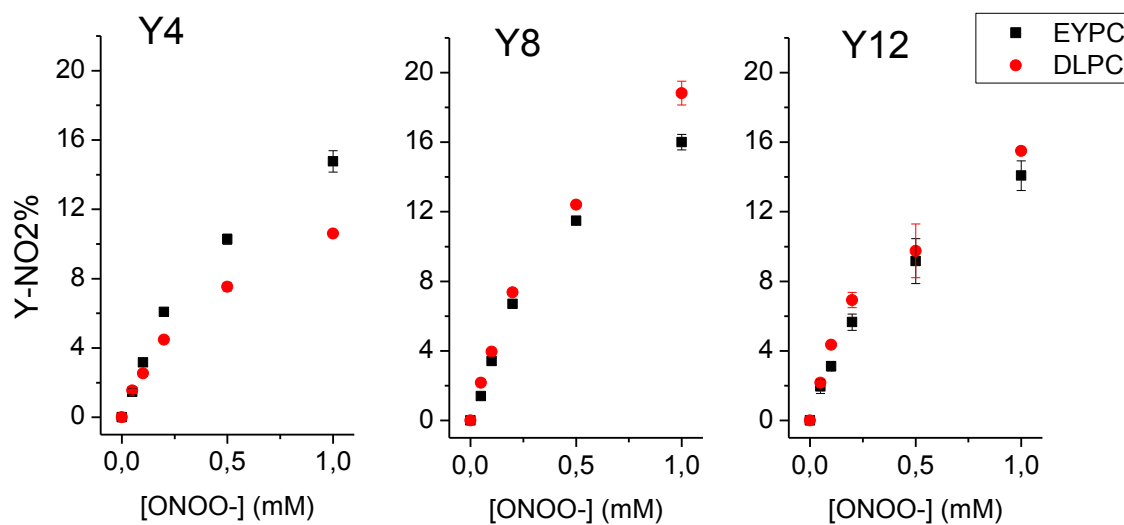


**Figura 5.5. Comparación entre experimentos con datos absolutos y normalizados para Y12.** A) Nitración sin normalizar en experimentos con DLPC. B) Nitración normalizada para los mismos experimentos con DLPC.

En la **figura 5.6** se muestran los resultados de nitración para los tres péptidos incorporados a liposomas de DLPC y de EYPC. Para Y4 se observa que la nitración es mayor en los liposomas de EYPC que en los de DLPC. En cambio para Y8 y Y12 la diferencia entre los dos sistemas es notoriamente menor. Esta observación se repite en los resultados de la **tabla 5.VI**, que se discutirán posteriormente. Un posible factor de relevancia en este caso es el “mismatch” hidrofóbico para los diferentes sistemas. El “mismatch” hidrofóbico se define como la diferencia entre el largo hidrofóbico del péptido y el grosor hidrofóbico de la bicapa en equilibrio<sup>128</sup>, y en todos los casos será mayor para los sistemas de DLPC, debido a que las bicapas formadas por este lípido de cadena corta tendrán un menor grosor que las formadas por los fosfolípidos de mayor longitud presentes en EYPC<sup>129</sup>. Dado que Y4 es el péptido con el residuo de tirosina más cercano a la superficie de la bicapa (**figura 5.9**), puede esperarse que sea el más afectado por la variación del “mismatch” hidrofóbico entre los diferentes liposomas, ya que su microambiente

puede ser el que se vea más afectado por cambios en las interacciones entre la bicapa y los extremos del péptido.

También puede observarse que los porcentajes de nitración en EYPC fueron muy similares para los tres péptidos, y que, en DLPC, Y8 se nitró en mayor medida que Y12 a las mayores concentraciones de peroxinitrito pero no a concentraciones bajas. Estos datos indican que la susceptibilidad de la tirosina a nitrarse por peroxinitrito agregado en bolo no es muy dependiente de los cambios en la posición dentro de la bicapa, o de los parámetros biofísicos que cambian entre EYPC y DLPC.



**Figura 5.6. Porcentaje de nitración en función de la concentración de peroxinitrito agregada en bolo.** Datos del experimento 3, con procesamiento de muestras mediante agregado de etanol/TFA/TFE. (n=3).

Una observación relevante es que tomando en cuenta las constantes de velocidad recopiladas en la introducción (**tabla 2.1, figura 2.3, tabla 2.4**), y la relación de concentraciones entre las especies presentes (tomando en cuenta la presencia de dos ácidos grasos por cada molécula de fosfolípido), puede estimarse que apenas el 2,8% del  $\cdot\text{NO}_2$  generado, y el 1% del  $\text{OH}\cdot$  reaccionarían con la tirosina para dar radical tirosilo en lugar de hacerlo con los lípidos presentes en las muestras con EYPC, como se muestra en la **tabla 5.IV**. Para las muestras con DLPC, en cambio, el 100% del  $\cdot\text{NO}_2$  y el 5% del  $\text{OH}\cdot$  reaccionarían, en principio, con la tirosina. Además, aunque no se pueden conocer las concentraciones generadas de  $\text{TyrO}\cdot$ , podría esperarse que los lípidos insaturados también compitan con esta especie por el  $\cdot\text{NO}_2$ . Este cálculo parece contradecir los porcentajes de nitración similares entre EYPC y DLPC. Una posible respuesta a esta discrepancia es la planteada previamente por nuestro grupo, según la que los radicales primarios reaccionarían con los lípidos, pero estos a su vez formarían radicales lipoperoxilo capaces de oxidar a la tirosina<sup>88</sup>, aumentando los rendimientos de nitración con respecto a lo

esperable de la competencia simple. Según esta hipótesis, puede esperarse que disminuyendo la concentración de  $O_2$  en solución, necesario para formar los radicales lipoperoxilo, disminuya la nitración, como se observa en la referencia <sup>88</sup>. Sin embargo, en el trabajo de Prütz *et al*<sup>49</sup>, en que las constantes de velocidad del  $\cdot NO_2$  con estas moléculas son determinadas por radiólisis de pulso, se observa que, en una solución deaerada (desprovista de  $O_2$  como suele hacerse en experimentos de radiólisis de pulso), el ácido linoleico en exceso no inhibe la oxidación de tirosina de forma esperada según la hipótesis mencionada. En ese trabajo se proponen como posibles explicaciones la reacción reversa de la adición del  $\cdot NO_2$  a los dobles enlaces del ácido graso, y la oxidación de la tirosina por parte del radical alílico formado por la abstracción de un átomo de hidrógeno por parte del  $\cdot NO_2$ . Sin embargo, otra posibilidad a esta discrepancia es planteada por Huie *et al* en una revisión, en la que señala que los valores de las constantes de reacción del  $\cdot NO_2$  con los ácidos grasos reportadas por Prütz son mucho más altas que las esperables de lo observado en fase gaseosa, y que en otro trabajo se determina que la constante de velocidad del  $\cdot NO_2$  con el ácido linoleico es  $<5 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ , acorde a lo esperable y a lo observado<sup>130</sup>. Según esta última explicación, la competencia de los ácidos grasos insaturados por el  $\cdot NO_2$  puede ser despreciable con respecto a otros efectos (como los biofísicos de las distintas bicapas) si la constante de velocidad real para la reacción entre estas especies es baja, por lo que no se esperarían en principio una diferencia notoria entre los dos sistemas que se deba a las diferentes capacidades de competencia de los lípidos por los radicales primarios.

**Tabla 5.IV. Velocidad de reacción de los radicales derivados del peroxinitrito con las especies presentes en los liposomas de EYPC con péptido.** (referencias en tabla 2.1, figura 2.3 y tabla 2.4)

Especie	[C] relativa	k ( $M^{-1}s^{-1}$ )		k[C] ( $s^{-1}$ )		k[C] relativa (%)	
		$\cdot NO_2$	$OH\cdot$	$\cdot NO_2$	$OH\cdot$	$\cdot NO_2$	$OH\cdot$
Tyr	1	$3,5 \times 10^5$	$10^{10}$	$3,5 \times 10^5$	$10^{10}$	2,8	1
16:0+18:0	90	-	$10^9$	-	$9 \times 10^{10}$	-	9
18:1	64	<1	$10^9$	-	$6,4 \times 10^{10}$	-	6
18:2	34,2	$2 \times 10^5$	$9 \times 10^9$	$6,8 \times 10^6$	$3,1 \times 10^{11}$	54,2	31
20:4	5,4	$10^6$	$10^{10}$	$5,4 \times 10^6$	$5,4 \times 10^{11}$	43,0	53

**Tabla 5.V. Velocidad de reacción de los radicales derivados del peroxinitrito con las especies presentes en los liposomas de DLPC con péptido.** (referencias en tabla 2.1, figura 2.3 y tabla 2.4)

Especie	[C] relativa	k ( $M^{-1}s^{-1}$ )		k[C] ( $s^{-1}$ )		k[C] relativa (%)	
		$\cdot NO_2$	$OH\cdot$	$\cdot NO_2$	$OH\cdot$	$\cdot NO_2$	$OH\cdot$
Tyr	1	$3,5 \times 10^5$	$10^{10}$	$3,5 \times 10^5$	$10^{10}$	100	5
12:0	200	-	$10^9$	-	$2 \times 10^{11}$	-	95



Para determinar en qué grado contribuye la oxidación de la tirosina por parte de los radicales lipídicos y lipoperoxilos a la falta de competencia directa por los radicales primarios en los liposomas con EYPC, se procedió a estudiar la nitración de tirosina en un sistema en que los residuos de tirosina y los ácidos oxidables capaces de competir por los radicales primarios se encuentren separados físicamente. De esa forma los radicales derivados de la reacción entre los radicales primarios y los lípidos no podrían oxidar a la tirosina. Esto se logró en un ensayo en que se prepararon liposomas conteniendo péptido y liposomas sin contener péptido, y se mezclaron aproximadamente 5 segundos previo al agregado de peroxinitrito. De esta forma, en los liposomas sin péptido, los lípidos que pudieran ser oxidados por  $\cdot\text{NO}_2$  y  $\text{OH}\cdot$  no tendrían acceso a los residuos de tirosina, y su competencia por estos radicales no podría ser compensado por la posterior oxidación de la tirosina. Así si la oxidación de la tirosina por parte de los radicales lipídicos es un factor importante en la falta de competencia observada, se debería observar una acentuación en la diferencia entre EYPC y DLPC, derivada de la competencia de los lípidos insaturados por los radicales primarios. Un factor a tomar en cuenta es la posible fusión de los liposomas que elimine la separación física deseada, sin embargo en la bibliografía se reportan escalas temporales de varios minutos para la fusión de liposomas inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  y péptidos, y de varias horas para la fusión inducida por oxidación lipídica, por lo que parece válido asumir la falta de fusión entre liposomas en la breve duración del experimento<sup>131-133</sup>.

**Tabla 5.VI. Nitración de tirosina en presencia de liposomas sin péptido como competidor.** Se muestran los porcentajes de nitración (Y- $\text{NO}_2\%$ ) de 0,15mM de péptido en liposomas del tipo indicado (15mM de lípido) en presencia de liposomas del tipo indicado sin péptido como competidores (15mM de lípido adicionales) luego del agregado de peroxinitrito en bolo a concentración de 0,5mM. (n=3)

	Péptido en liposomas de EYPC 15mM		Péptido en liposomas de DLPC 15 mM	
	+ liposomas de EYPC 15 mM	+ liposomas de DLPC 15 mM	+ liposomas de EYPC 15 mM	+ liposomas de DLPC 15 mM
Y4	15,8 ± 0,3	18,1 ± 0,8	10,8 ± 0,7	11,7 ± 0,8
Y8	No determinado	19,0 ± 1,4	19,1 ± 1,1	18,0 ± 0,4
Y12	19,8 ± 1,9	19,5 ± 2,1	16,1 ± 0,2	16,8 ± 1,6

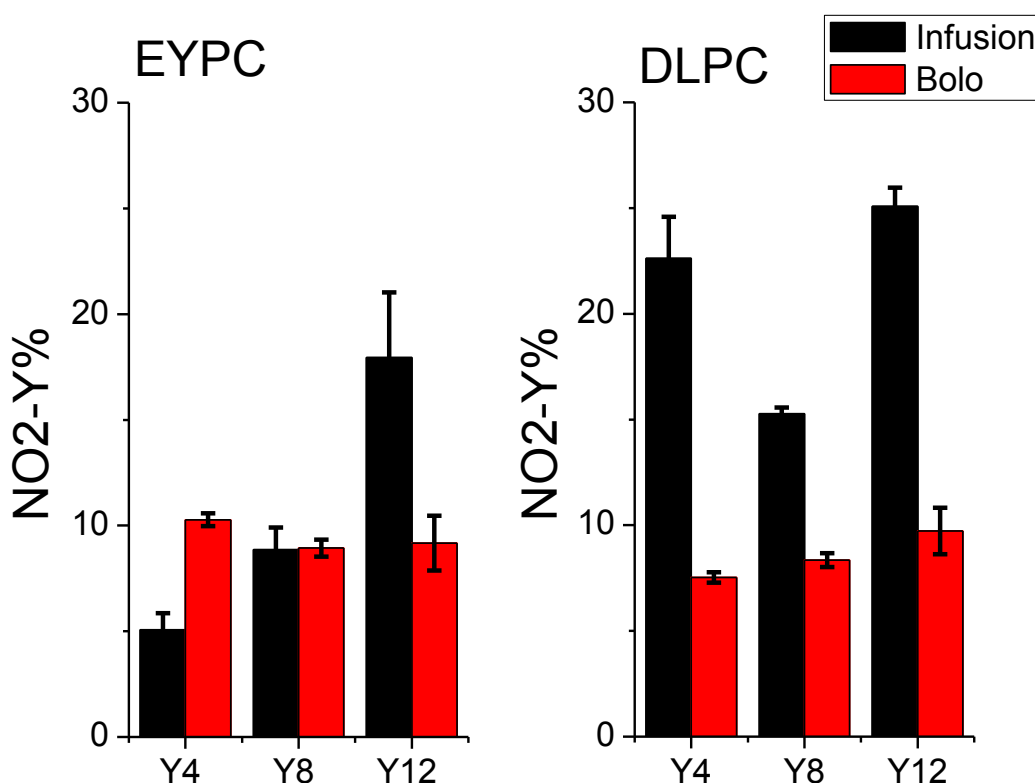
En la **tabla 5.VI** se muestran los porcentajes de nitración para cada péptido en las diferentes combinaciones de liposomas. Se observa que en la mayoría de los casos el porcentaje de nitración no se ve afectado por la composición de los liposomas sin péptido, agregados para competir por los radicales primarios. Dado que las relaciones entre péptido y ácidos grasos son parecidas a las utilizadas en la **tabla 5.IV**, las predicciones cinéticas serían similares. Asumiendo que el diseño experimental es efectivo en generar una barrera física entre los radicales lipídicos formados en este segundo grupo de liposomas y los residuos de tirosina, estos datos apoyan lo planteado por Huie *et al*, ya que en presencia de tirosina los ácidos

grasos insaturados no compiten de forma notoriamente mejor que los saturados por los radicales primarios derivados del peroxinitrito.

Vale la pena mencionar que para Y4 se observó una nitración considerablemente mayor en EYPC que en DLPC, a diferencia de Y8 y Y12 en que la diferencia pequeña en comparación con los márgenes de error, al igual que lo observado en el experimento de la **figura 5.6**.

### 5.3) Comparación entre agregado en bolo y agregado en infusión:

Dado que en el medio biológico el peroxinitrito estaría formado en forma de un flujo continuo por la reacción entre  $O_2^-$  y  $'NO$ , y como se ha mencionado en la introducción, el efecto que tenga el peroxinitrito sobre un sistema dependerá de la forma en que este sea agregado, es de interés estudiar el efecto del agregado de peroxinitrito en forma de infusión lenta. En la **figura 5.7** se compara la nitración de péptido en el agregado de peroxinitrito en bolo y en infusión para los diferentes sistemas.



**Figura 5.7. Comparación de porcentajes de nitración tras agregado de peroxinitrito en bolo y en infusión.** Porcentaje de nitración de péptido (0,3 mM) en liposomas de EYPC o de DLPC luego del agregado de 0,5 mM de  $ONOO^-$  en bolo y en infusión (a 25  $\mu M/min$ ).

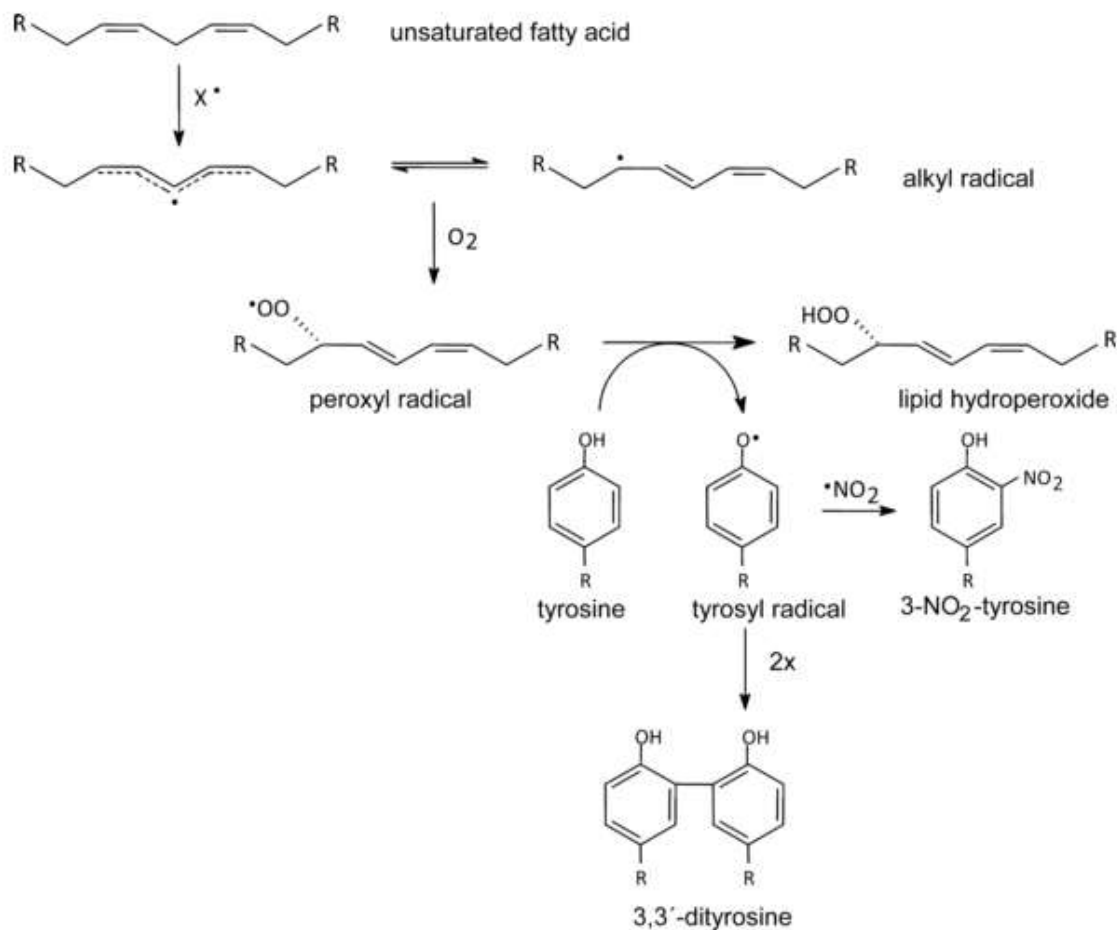
Los datos de la **figura 5.7** muestran que la diferencia entre el agregado en bolo y en infusión varía entre los diferentes péptidos y el tipo de liposoma utilizado. Sin

embargo, en DLPC se cumple que, para los tres péptidos, el agregado de peroxinitrito en infusión genera una mayor nitración que el agregado en bolo. Esto parece contradecir un trabajo previo de Zhang *et al* con los mismos péptidos, en el que no se observa una diferencia notoria en el rendimiento de nitración de Y8 entre el agregado de peroxinitrito en bolo o en infusión, utilizando liposomas de DLPC y una concentración final de 50  $\mu\text{M}$  de peroxinitrito a una velocidad de infusión de 5  $\mu\text{M}/\text{min}$ <sup>120</sup>. La misma discrepancia se observa entre un trabajo previo de nuestro grupo, en que se muestra que para una concentración 1 mM de peroxinitrito el agregado por infusión lenta produce una mayor nitración que el agregado en bolo para el BTBE en DLPC<sup>88</sup>, y otro artículo de Zhang *et al* en el que con el agregado de 50  $\mu\text{M}$  de peroxinitrito a BTBE en DLPC, no se observaron diferencias en el nivel de nitración<sup>134</sup>. Las discrepancias entre lo observado por Zhang a bajas concentraciones de peroxinitrito y lo observado por nuestro grupo (en este trabajo y el reportado en la literatura), pueden deberse a el rango de concentraciones utilizado en cada trabajo. Las concentraciones bajas utilizadas por Zhang se encuentran en la zona lineal de las curvas de nitración vs  $[\text{ONOO}^-]$  en bolo, mientras que nuestros resultados se obtuvieron en concentraciones por fuera del rango lineal (**figura 5.6**), donde nuevos fenómenos ganan relevancia. Un ejemplo de estos fenómenos es el aumento en las reacciones de terminación que se dan al utilizar altas concentraciones de peroxinitrito en bolo. Al utilizar concentraciones dentro del rango lineal de la curva mencionada, efectos como el mencionado tienen poca relevancia, y se verán poco afectados al cambiar el método de agregado por la infusión lenta. En cambio, al utilizar concentraciones mayores donde esos efectos se acentúan, el agregado por infusión puede aumentar el rendimiento al disminuir el efecto de esos factores que desvían a la curva de la linealidad. Si estos efectos son los que producen el aumento en la nitración por la infusión a concentraciones altas, se esperarían observar que las diferencias entre bolo e infusión aumenten con la concentración final de peroxinitrito utilizada.

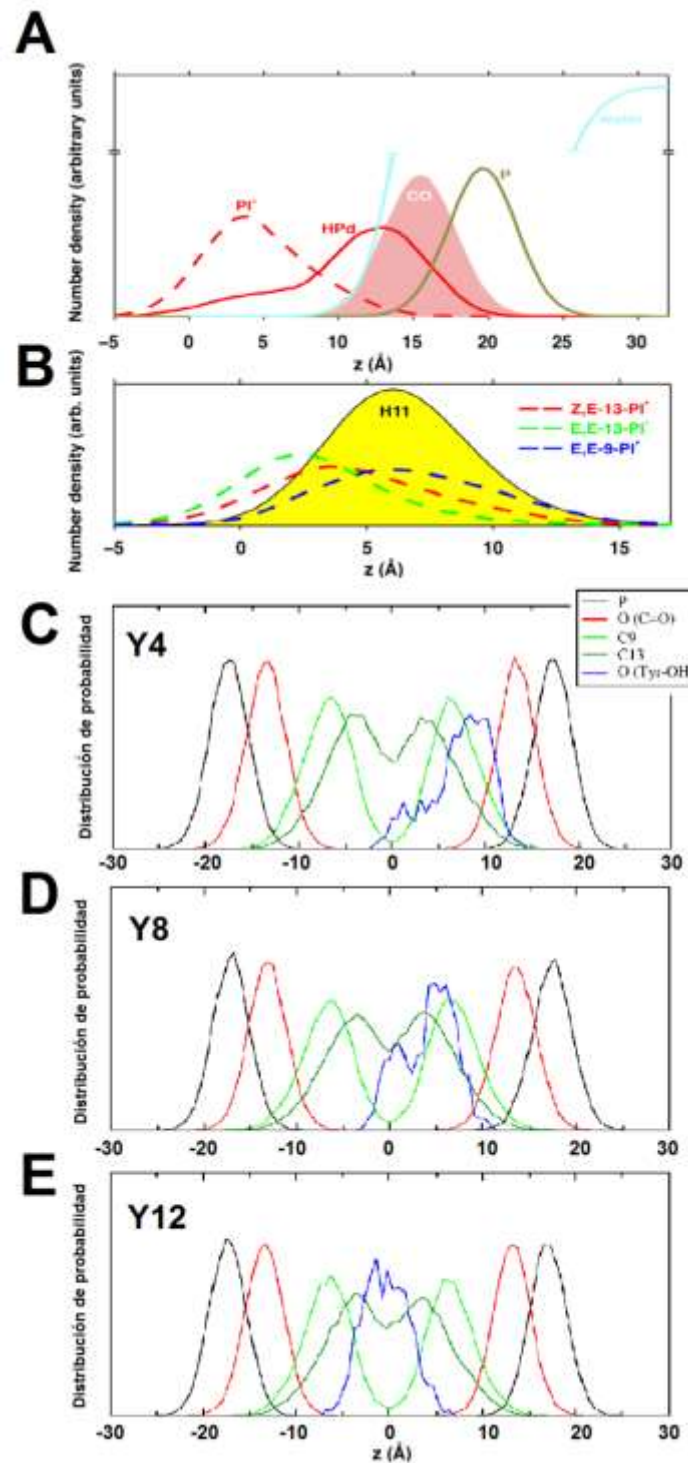
Otra observación relevante es que para la tirosina en solución acuosa, el agregado de peroxinitrito en infusión lenta genera menor rendimiento de nitración que el agregado en bolo, a diferencia de lo observado en los trabajos mencionados. En una revisión de la literatura no se encontraron hipótesis concretas para explicar esta diferencia entre tirosina en solución acuosa y en membranas. Sin embargo, una explicación posible es que dicho efecto esté vinculado al bajo rendimiento que se observa para la formación de dímeros en las tirosinas de membrana, como se discute en la **figura 5.10** y como se ha reportado en la literatura<sup>88,120</sup>. El menor rendimiento de nitración para tirosina en solución acuosa por el agregado en infusión se debe a que se genera una concentración estacionaria baja de radical tirosilo, frente a la que la tirosina compite con mayor eficiencia por los radicales derivados del peroxinitrito, lo que además favorece la formación de ditirosina<sup>135</sup>. Al verse dificultada la formación de ditirosina en membranas, esa vía no competiría de forma efectiva con la nitración de tirosina, como sí ocurre en

solución, y los rendimientos de nitración no disminuirían por ese efecto, debido a que el radical tirosilo en membranas tendría una mayor vida media para combinarse con el  $\cdot\text{NO}_2$  que el radical tirosilo en solución.

Notoriamente, el efecto observado en la **figura 5.7** para EYPC es diferente para los tres péptidos, se observa que para Y4 los rendimientos de nitración por el agregado de peroxinitrito en infusión disminuyen con respecto al agregado en bolo, para Y8 los rendimientos se mantienen igual, y para Y12 aumentan. En este caso, a la complejidad física de la bicapa se añade la complejidad química de los lípidos insaturados que dificultan una interpretación simple de los datos, y que posiblemente sea una de las causas de la mayor variabilidad entre péptidos que en DLPC. Dos reacciones de posible relevancia son, la posible oxidación de los lípidos insaturados por parte de la tirosina (con relevancia biológica propuesta por Savenkovas et al)<sup>99,136</sup>, y la demostrada por nuestro grupo en que los radicales lipoperoxilo pueden oxidar a los residuos de tirosina<sup>88</sup> (**figura 5.9**), teniendo efectos teóricamente opuestos sobre el rendimiento de la nitración.



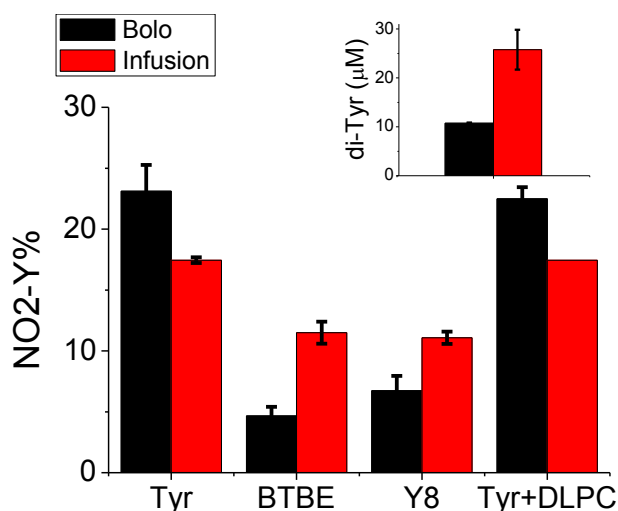
**Figura 5.8. Oxidación de tirosina por el radical lipoperoxilo.** Extraído de <sup>88</sup>.



**Figura 5.9. Distribución espacial en la bicapa de grupos químicos de interés.** El eje  $z$  es el eje transversal de la bicapa, siendo el valor 0 su punto central. (A) Distribución promedio del grupo radical de los radicales lipoperóxido (PI\*), del grupo hidroperóxido de los lipoperóxidos (HPd), el grupo carbonilo que une los ácidos grasos a los esqueletos de glicerol (CO), y los grupos fosfato de los fosfolípidos (P). (B) Distribución del grupo radical de diferentes isómeros del radical lipoperóxido indicados, y de los hidrógenos unidos al carbono 11 (H11). Extraído de <sup>137</sup>. (C), (D) y (E) Distribución del oxígeno de la tirosina (azul) y los carbonos 9 y 12 del ácido linoleico en la dinámica molecular de los péptidos (Y4, Y8 e Y12 respectivamente) incorporados a una bicapa de PLPC (datos obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. Darío Estrín de la Universidad de Buenos Aires).

En la **figura 5.9** se muestra el modelado computacional de la distribución en la bicapa de algunos grupos relevantes a estas reacciones mencionadas. El grupo radical peroxilo de los radicales lipoperoxilo se localiza preferentemente hacia la profundidad de la membrana, teniendo una distribución cercana al centro de la bicapa<sup>137</sup>. Este modelo apoyaría que su capacidad de oxidar a los residuos de tirosina favorezca mayormente la nitración de Y12 e Y8, y en poca medida a Y4, lo que se corresponde con lo observado en la **figura 5.7**. También se observa la posición del carbono 11 del ácido linoleico, susceptible a abstracción de H por parte de los radicales tirosilo, y se ve que su localización se encuentra solapada con las distribuciones de los tres péptidos, pero mayormente con Y8. Según este modelo, el péptido con mayor capacidad de oxidar a los lípidos (y de reparar al radical tirosilo) pareciera ser Y8, y luego Y12 e Y4 en menor medida. Esto puede ayudar a explicar por qué, en EYPC, Y12 presenta una nitración tanto mayor que la de Y8 ante el agregado de peroxinitrito en infusión, si se considera que la co-localización con el carbono 11 puede estar vinculado a la vida media del radical tirosilo en esta bicapa (dado que se podrían reparar más fácilmente), y siendo que Y8 pareciera contar con la mayor co-localización también puede contar con el radical tirosilo de menor vida media. También es posiblemente uno de los factores por los que baja la nitración de Y4 cuando el agregado se hace en infusión lenta. Ante un bajo flujo de radicales, estas reacciones de reparación podrían cobrar mayor importancia al competir mejor por los radicales tirosilo, y de esa forma su efecto se vería acentuado con el agregado en infusión con respecto a lo observado con el agregado en bolo. Aunque es posible que existan otros efectos relevantes, los datos de simulación en conjunto con los datos experimentales apoyan las dos hipótesis planteadas que vinculan la nitración de tirosina con la lipoperoxidación. Actualmente se están realizando simulaciones de dinámica molecular en colaboración con el grupo del Dr. Darío Estrín de la Universidad de Buenos Aires continuando con esta línea.

En la **figura 5.10** se observan los rendimientos de nitración para el agregado de peroxinitrito en bolo y por infusión lenta a tirosina en solución, BTBE y Y8 en DLPC, y tirosina en solución en presencia de liposomas de DLPC. Los resultados obtenidos coinciden con lo predicho por las hipótesis expuestas y lo reportado en la literatura (tomando en cuenta que se trabajó con una concentración relativamente alta de peroxinitrito), con excepción de la ausencia de dímero del BTBE que sí ha sido observado en la literatura en estas condiciones, tanto en el agregado en bolo como el agregado en infusión. Es interesante notar que aparentemente la presencia de liposomas de DLPC no presenta por sí sola un efecto sobre la nitración de tirosina en solución, de acuerdo a lo que podría esperarse a priori si la tirosina en solución no interactúa de forma importante con los liposomas.



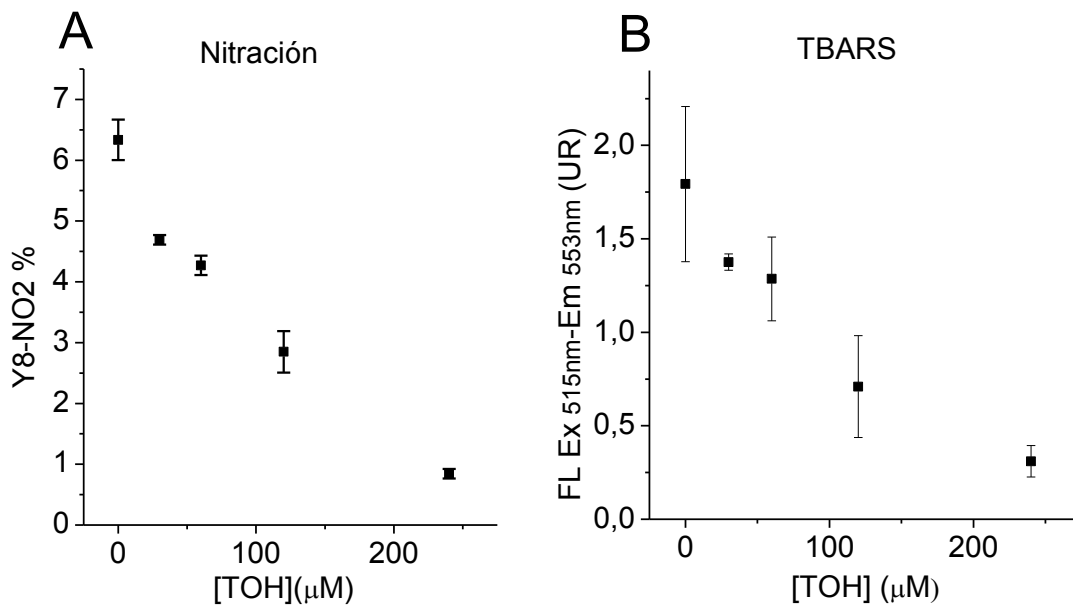
**Figura 5.10. Comparación de agregado de peroxinitrito en bolo y en infusión lenta para tirosina, BTBE y Y8.** Porcentaje de nitración luego del agregado de peroxinitrito 0,5 mM en bolo o en infusión (a 25  $\mu\text{M}/\text{min}$ ) para tirosina (0,3 mM en buffer fosfato pH=7,4 100 mM), BTBE (0,3 mM) en DLPC (30 mM), Y8 (0,3 mM) en DLPC (30 mM), y tirosina acuosa en buffer con DLPC (30 mM). En el inserto se muestra la cuantificación de di-tirosina para las muestras de tirosina en solución acuosa sin DLPC. Para BTBE y Y8 no se detectó dímero, y para tirosina en presencia de DLPC no se cuantificó el dímero (n=2).

#### 5.4) Efecto del alfa tocoferol:

Otro factor biológicamente relevante que resulta de interés analizar es la presencia de alfa tocoferol, ya que puede actuar como antioxidante, tanto reaccionando con los radicales capaces de oxidar a la tirosina (ya sea los primarios derivados del peroxinitrito o los radicales lipídicos) como reparando al radical tirosilo, por lo que se procedió a estudiar el efecto de la presencia de  $\alpha$ -tocoferol en la nitración de Y8 en liposomas de EYPC.

En la **figura 5.11** se observa que a medida que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol se aproxima a la de tirosina, el rendimiento de la nitración disminuye rápidamente, al igual que el MDA detectado. Parece poco probable que el efecto de inhibición observado se deba a la competencia directa del tocoferol por los radicales primarios derivados del peroxinitrito. El bajo valor de la constante de velocidad entre el  $\cdot\text{NO}_2$  y el tocoferol ( $k < 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  reportado en la **tabla 2.IV**, aunque para solución acuosa usando Trolox C, un análogo hidrofílico del tocoferol) no alcanza en principio a explicar cuantitativamente la inhibición observada, aunque debe considerarse la posibilidad de que las velocidades de reacción de tirosina y tocoferol con  $\cdot\text{NO}_2$  sean diferentes en la bicapa (y que en ese ambiente el tocoferol pueda competir mejor por el  $\cdot\text{NO}_2$ ). También, como se calculó anteriormente, la amplia mayoría de  $\text{OH}\cdot$  reaccionará con los lípidos, por lo que parece improbable que su reacción con el tocoferol tenga un efecto importante. Sin embargo, otra reacción de posible relevancia es la reparación del radical tirosilo por reacción con el tocoferol. La constante de velocidad para la reacción entre el Trolox C y el

radical tirosilo, a pH=7 en solución está reportada en  $3,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , apenas un orden de magnitud menor que la reacción del radical tirosilo con el  $\cdot\text{NO}_2$  en solución. Esto hace pensar que probablemente la reacción de reparación directa del radical tirosilo por parte del  $\alpha$ -tocoferol en la membrana sea en gran parte responsable de la inhibición observada (sobre todo considerando la alta concentración de tocoferol utilizada), aunque es probable que esa constante de velocidad sea menor en membrana, especialmente tomando en cuenta la diferente ubicación que teóricamente tienen en la membrana estas dos moléculas (estando el tocoferol presente mayormente en la superficie<sup>66</sup> y el residuo de tirosina del Y8 en el interior de la bicapa<sup>120</sup>). También puede ser posible que la inhibición de la lipoperoxidación tenga un efecto al disminuir la cantidad de  $\text{LOO}\cdot$  con capacidad de oxidar a la tirosina, como podría indicar el parecido entre la **figura 5.11A** y la **figura 5.11B**, aunque según implicaría la **figura 5.9**, se vería dificultada por el problema estérico de la ubicación del radical lipoperoxilo dentro de la bicapa, y no en su superficie<sup>137</sup>.

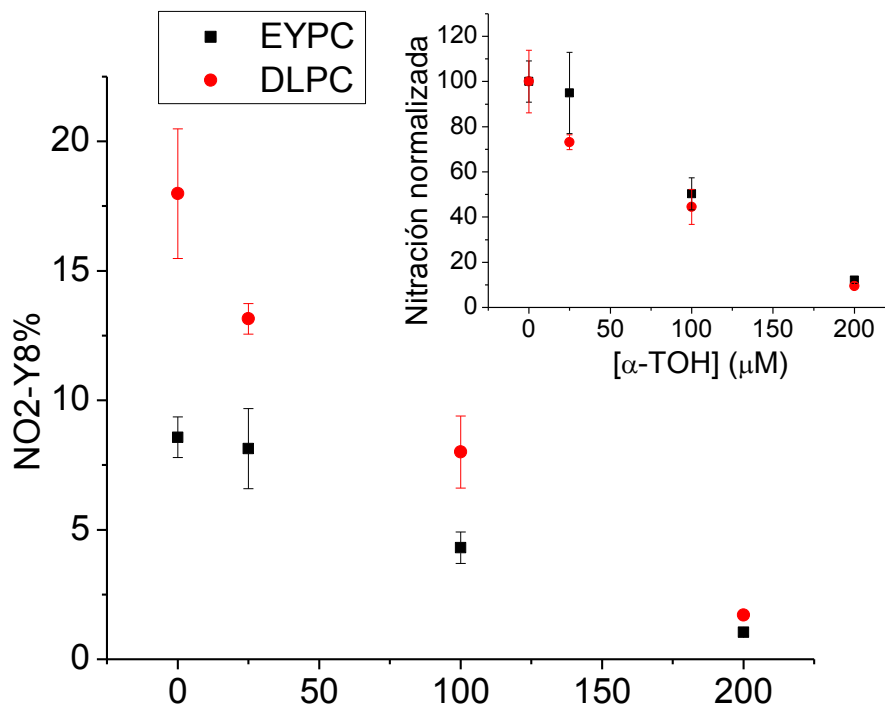


**Figura 5.11. Efecto del tocoferol en oxidación por agregado de peroxinitrito.** Se prepararon liposomas de EYPC (30 mM) conteniendo Y8 (0,3 mM) y concentraciones variables de alfa tocoferol, a los que luego se agregó 0,5 mM de peroxinitrito en bolo. Se determinaron (A) nitración y (B) MDA por ensayo de TBARS (n=3).

A continuación se estudió el efecto del  $\alpha$ -tocoferol ante el agregado de peroxinitrito en infusión, para simular un sistema químico más similar al biológico. Resulta llamativo que el efecto observado en la **figura 5.12** para EYPC no difiere considerablemente del observado para el agregado en bolo en la **figura 5.11**. También se observa que, en términos absolutos, la inhibición es mayor para el sistema con DLPC que para el sistema con EYPC, pero en el inserto de la figura se observa que en términos relativos la inhibición parece no verse muy afectada por la presencia de ácidos grasos insaturados. La similar inhibición relativa entre los



dos sistemas podría ser explicada por la competencia directa por los radicales primarios, y por la hipótesis de la reparación del radical tirosilo, ya que estos factores no contemplan las diferencias químicas del sistema provenientes de los lípidos. Para la hipótesis de la inhibición por consumo de radical  $LOO'$  es más difícil racionalizar lo que ocurriría. Estos tipos de inhibición no son excluyentes entre sí, y es posible que variando las condiciones, la relevancia de cada uno varíe. Si la inhibición por reparación del radical tirosilo es predominante en todos los casos, podría esperarse observar una mayor protección en Y4, cuyo residuo de tirosina está más próximo a la superficie de la bicapa donde se encuentra el tocoferol, y una menor protección para el péptido Y12, cuyo residuo de tirosina se encuentra más alejado.



**Figura 5.12. Efecto del alfa tocoferol en la nitración de Y8 por peroxinitrito agregado en infusión lenta.** Se agregó peroxinitrito en infusión lenta (25  $\mu\text{M}/\text{min}$ ), hasta una concentración de 0,5 mM, a péptido Y8 (0,3 mM) incorporado a liposomas de EYPC y DLPC (30 mM) en presencia de cantidades variables de  $\alpha$ -TOH. En la gráfica se observa el porcentaje de nitración del péptido en función de la concentración de tocoferol. En el inserto se muestran los mismos datos normalizados por los valores sin tocoferol. (Para [TOH] 0 $\mu\text{M}$  n=5, 25 $\mu\text{M}$  n=2, 100 $\mu\text{M}$  n=5 y para 200 $\mu\text{M}$  n=3).

Más allá de los mecanismos de acción del tocoferol en la inhibición de la nitración de tirosina, en el ensayo se utilizaron concentraciones de tocoferol dentro del rango de una molécula de tocoferol cada 100-1000 de lípidos que se encuentra en sistemas biológicos. El tocoferol no fue eficaz inhibiendo la nitración cuando se usó en concentraciones bajas ( $\sim 1$  molécula cada 1000 de lípidos), pero sí lo fue a concentraciones mayores ( $\sim 1$  molécula cada 100 de lípidos), con las que la inhibición fue importante. A pesar de que se utilizó sólo una concentración de péptido, esto parecería indicar que la capacidad del tocoferol de inhibir la nitración

de tirosina en sistemas biológicos dependerá fuertemente de su concentración local, que puede variar tanto de célula en célula como entre diferentes dominios de membrana.

### 5.5) Prueba del efecto de la concentración de oxígeno en el medio:

Finalmente se estudió el efecto de la concentración de oxígeno sobre la nitración de tirosina. Este parámetro cobra relevancia biológica ya que en varios escenarios relevantes las concentraciones de oxígeno son menores a la atmosférica, y diferentes tejidos tienen diferente concentración de oxígeno<sup>138</sup>. Según lo demostrado por nuestro grupo en un trabajo previo, la concentración de oxígeno puede tener un efecto relevante sobre la nitración de tirosinas de membrana, mediado por los radicales lipoperoxilo. Dado que los radicales lipoperoxilo son capaces de oxidar a la tirosina, y el O<sub>2</sub> es necesario para la formación de estos radicales a partir del L<sup>•</sup>, de acuerdo a esta teoría una disminución en la concentración de oxígeno produciría una disminución en el rendimiento de la nitración de tirosina al inhibir la formación de LOO<sup>•</sup>.

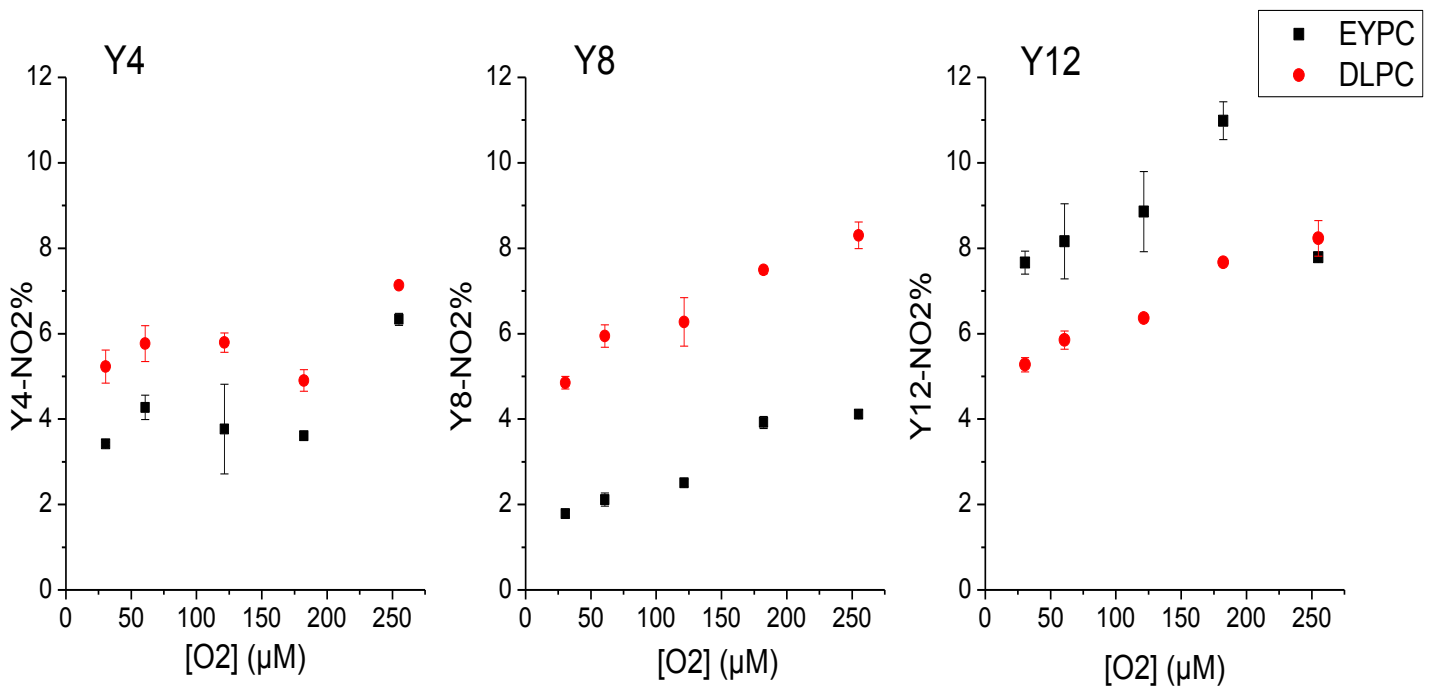
**Tabla 5.VII. Concentraciones estimadas de oxígeno en agua, y en liposomas de EYPC en las condiciones utilizadas.**

%O <sub>2</sub> atmosférico	[O <sub>2</sub> ](μM) en agua	[O <sub>2</sub> ](μM) en EYPC
21	255	1071
15	182	765
10	121	510
5	61	255
2,5	30	128

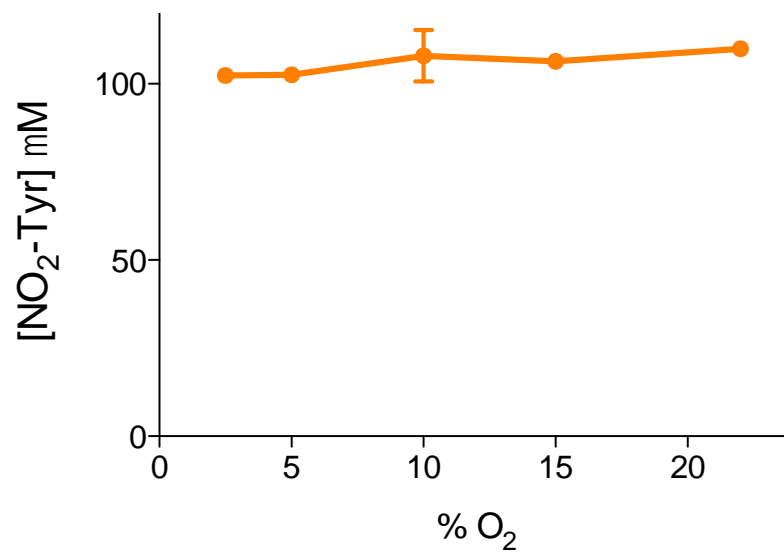
Asumiendo equilibrio entre el oxígeno disuelto en la solución y el atmosférico, se puede estimar la concentración de oxígeno molecular presente en la solución para cada valor, utilizando su solubilidad en agua con salinidad de 18,1 ppt (el valor en la tabla referenciada más próximo al valor calculado de 14,3 ppt para el amortiguador fosfato utilizado) y a 20 °C. El valor reportado es de 8,17 mg/L, o 255 μM para agua expuesta a aire (que tiene un 21% de O<sub>2</sub>)<sup>139</sup>. Se debe tomar en cuenta que el O<sub>2</sub> es más soluble en ambientes apolares que en agua, y está reportado un coeficiente de partición K<sub>p</sub>=4,2 entre liposomas de EYPC y buffer<sup>140</sup>. Con estos dos datos se pueden calcular los valores que se muestran en la **tabla 5.VII**.

Utilizando estos valores se graficaron los porcentajes de nitración en función de la concentración de oxígeno en buffer (**figura 5.13**). Para Y8 y Y12 se ve una clara correlación entre el aumento de la concentración de oxígeno y de los rendimientos de nitración de tirosina. Para Y4 la correlación es menos clara pero aun así se observa un aumento en la nitración de tirosina a la mayor concentración de oxígeno con respecto a las demás (la tendencia observada para Y4 puede deberse

al efecto observado en la **figura S.2**). De acuerdo a lo observado en la **figura 5.9** los péptidos Y8 e Y12 serían los más afectados por los cambios en la concentración de oxígeno, al tener su grupo fenol con la mayor colocalización con el grupo peroxilo formado en membrana. Por otro lado, en la **figura 5.14** se observa en un resultado previo de nuestro grupo que la nitración de tirosina en solución acuosa no muestra una dependencia de la concentración de oxígeno, lo que permite descartar que los efectos observados en la nitración de los péptidos se deba a reacciones del oxígeno con otras especies aparte de los lípidos. En conjunto, los datos de nitración en función del oxígeno y los de dinámica molecular ofrecen evidencia sólida a favor del mecanismo de la **figura 5.8**. Vale la pena mencionar que aunque a primera vista este resultado pueda parecer contradecirse con el análisis de la **tabla 5.VI** en que este mecanismo no parece ser la causa de la falta de competencia entre los lípidos insaturados y la tirosina por el  $\cdot\text{NO}_2$ , en ese experimento no se descarta la acción de la especie  $\text{LOO}\cdot$  producida por el  $\text{OH}\cdot$ , que puede ser la misma para los liposomas de DLPC y los de EYPC, sino que solamente se demuestra que este mecanismo no es el responsable de la falta de competencia por  $\cdot\text{NO}_2$ .



**Figura 5.13. Efecto del oxígeno en la nitración de los residuos de tirosina de péptidos transmembrana.** Se dejó equilibrar las soluciones de péptido (0,3mM) incorporado en los liposomas (30mM de lípido) en la cámara hipóxica, y luego se agregó peroxinitrito a una concentración final de 1mM en forma de bolo. (n=2)



**Figura 5.14. Efecto del oxígeno en la nitración de tirosina en solución acuosa.** Se dejó equilibrar la tirosina en solución en la cámara hipóxica, y luego se agregó peroxinitrito a una concentración final de 1mM en forma de bolo.

## **6) Conclusiones:**

En el trabajo se estudió el efecto de diferentes factores fisicoquímicos y bioquímicos sobre la nitración de tirosinas en membrana.

En primer lugar se pudo concluir que el peroxinitrito es capaz de nitrar tirosinas ubicadas dentro de membranas lipídicas, compuestas tanto de lípidos saturados como de mezclas naturales de lípidos, de una forma dependiente de su concentración. También que ante el agregado de peroxinitrito en bolo la profundidad de la tirosina en la bicapa, y el tipo de lípido utilizado no tienen un gran efecto sobre los rendimientos de nitración.

Al estudiar la falta de competencia aparente entre los lípidos insaturados y la tirosina por el  $\cdot\text{NO}_2$  se pudo concluir que las constantes de velocidad reportadas por Prütz *et al* para los lípidos insaturados con  $\cdot\text{NO}_2$  probablemente sean sobreestimaciones, de acuerdo a lo planteado por Huie *et al*.

Luego se observó que las diferencias entre lípidos y péptidos se hacen notorias cuando el peroxinitrito es agregado en infusión, un sistema más similar al biológico. Esto permite concluir que el efecto de estos dos parámetros es dependiente de la forma en la que se agrega el peroxinitrito, o mejor dicho, de factores que se ven alterados por la forma de agregado. El análisis de los resultados experimentales en conjunto con simulaciones de dinámica molecular ofrecen evidencia sólida a favor de la participación de los lípidos poliinsaturados a través de dos mecanismos; la oxidación de los residuos de tirosina por parte del  $\text{LOO}\cdot$  propuesta por nuestro grupo, y la reparación del radical tirosilo al abstraer un átomo de hidrógeno de los carbonos bis-alílicos de los ácidos grasos propuesta por Savenkovas *et al*. Además puede concluirse por los rendimientos observados para los liposomas de EYPC que, sin tomar en cuenta las complejidades adicionales de nuevas especies químicas, las tirosinas en el centro de la bicapa serán las más susceptibles a oxidarse en membranas biológicas.

Con respecto al efecto del tocoferol, dado el hecho de que dentro del rango biológico de la relación  $\alpha$ -tocoferol:lípidos (entre 100 y 1000 lípidos por molécula de tocoferol) su inhibición de la nitración *in vitro* pasó de muy ineficiente a muy eficiente, sólo se puede decir que su efecto *in vivo* dependerá en principio de la concentración local. Se discutieron hipótesis sobre su mecanismo de acción *in vitro*, y aunque no es posible determinar la relevancia de cada una a partir de los datos obtenidos, sí se puede concluir que la teoría de la reparación del radical tirosilo implica que además de la concentración del tocoferol, su co-localización con los residuos de tirosina también tendrá una gran relevancia, a diferencia de las teorías de mecanismo por competencia por los radicales, y que esto puede permitir discernir *in vitro* cual es el mecanismo por el que opera.

Al analizar el efecto de la concentración de oxígeno sobre los rendimientos de nitración de tirosina se puede concluir que, como se demostró previamente para el BTBE, los radicales lipoperoxilo son capaces de oxidar residuos de tirosina y de esta forma mediar la nitración de tirosina, y que los residuos de tirosina más susceptibles a oxidarse por esta vía serán aquellos que se encuentren en el interior de la bicapa (Y8 e Y12 en este caso).

Finalmente, si se observan las figuras suplementarias también puede concluirse que, en principio, el método de procesamiento de las muestras desarrollado en este trabajo es superior al reportado en la literatura, ya que además de obtenerse una mejor precisión, requiere algunas horas menos de trabajo y no necesita de evaporadores de muestras. Además puede permitir trabajar con liposomas unilamelares, a diferencia del método por centrifugación ya que estos tienen un bajo coeficiente de sedimentación (resultados no mostrados).

En suma, podemos concluir que la nitración de tirosinas asociadas a membranas tiene determinantes fisicoquímicas que difieren de las observadas en entornos acuosos, principalmente por la participación de radicales lipídicos en la oxidación de residuos de tirosina, y el oxígeno molecular puede participar como agente crítico modulando las reacciones de oxidación de tirosinas asociadas a entornos hidrofóbicos tales como membranas y lipoproteínas. Estos hallazgos permitirán seguir caracterizando en mejor detalle la bioquímica de la nitración de tirosina, y posiblemente ayudarán a racionalizar observaciones biológicas y elaborar hipótesis sobre el rol de esta modificación en el daño por estrés oxidativo.

## **7) Referencias:**

1. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. & Fenn, W. Oxygen Poisoning and X-Irradiation: A Mechanism in Common. *Science* **119**, 623–626 (1954).
2. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300 (1956).
3. McCord, J. M. & Fridovich, I. Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049–6055 (1969).
4. McCord, J. M., Keele, B. B. & Fridovich, I. An Enzyme-Based Theory of Obligate Anaerobiosis: The Physiological Function of Superoxide Dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 1024–7 (1971).
5. Thomas, D. D. *et al.* The Chemical Biology of Nitric Oxide: Implications in Cellular Signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 18–31 (2008).
6. Valko, M. *et al.* Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
7. Ristow, M. & Zarse, K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp. Gerontol.* **45**, 410–8 (2010).
8. Gutteridge, J. M. & Halliwell, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**, 136–47 (2000).
9. Möller, M. N., Lancaster, J. R. & Denicola, A. The Interaction of Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Membranes. *Curr. Top. Membr.* **61**, 23–42 (2008).
10. Fridovich, I. Oxygen: how do we stand it?. *Med. Princ. Pract.* **22**, 131–137 (2012).
11. Voet, D. & Voet, J. G. *Biochemistry*. (John Wiley & Sons Inc, 2011).
12. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M. & Cayota, A. Unraveling Peroxynitrite Formation in Biological Systems. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 463–488 (2001).
13. Wood, P. M. The Redox Potential of the System Oxygen-Superoxide. *FEBS Lett.* **44**, 1–3 (1974).
14. Chevalet, E., Rouelle, F., Fierst, L. & Lambert, J. P. Electrogeneration and Some Properties of the Superoxide Ion in Aqueous Solutions. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **39**, 201–216 (1972).

15. Gus'Kova, R. A., Ivanov, I. I., Kol'Tover, V. K., Akhobadze, V. V. & Rubin, A. B. Permeability of Bilayer Lipid Membranes for Superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) Radicals. *Biochim. Biophys. Acta* **778**, 579–585 (1984).
16. Lynch, R. E. & Fridovich, I. Permeation of the Erythrocyte Stroma by Superoxide Radical. *J. Biol. Chem.* **253**, 4697–4699 (1978).
17. Ferrer-Sueta, G. & Radi, R. Chemical Biology of Peroxynitrite: Kinetics, Diffusion, and Radicals. *ACS Chem. Biol.* **4**, 161–77 (2009).
18. Hausladen, a & Fridovich, I. Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J. Biol. Chem.* **269**, 29405–8 (1994).
19. Buettner, G. R. Superoxide Dismutase in Redox Biology: The Roles of Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Anticancer Agents Med. Chem.* **11**, 341–346 (2011).
20. Hughes, M. N. *Chemistry of Nitric Oxide and Related Species. Methods in enzymology* **436**, 3–19 (Elsevier Masson SAS, 2008).
21. Möller, M. N., Li, Q., Lancaster, J. R. & Denicola, A. Acceleration of Nitric Oxide Autoxidation and Nitrosation by Membranes. *IUBMB Life* **59**, 243–248 (2007).
22. Thomas, D. D., Flores-Santana, W., Switzer, C. H., Wink, D. A. & Ridnour, L. A. *Determinants of Nitric Oxide Chemistry : Impact of Cell Signaling Processes. Nitric Oxide* 3–25 (Elsevier Inc., 2010). doi:10.1016/978-0-12-373866-0.00001-0
23. Fukuto, J. M., Cisneros, C. J. & Kinkade, R. L. A Comparison of the Chemistry Associated with the Biological Signaling and Actions of Nitroxyl (HNO) and Nitric Oxide (NO). *J. Inorg. Biochem.* **118**, 201–8 (2013).
24. Wink, D. A. & Mitchell, J. B. Chemical Biology of Nitric Oxide: Insights into Regulatory, Cytotoxic and Cytoprotective Mechanisms of Nitric Oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 434–456 (1998).
25. Kopincová, J., Púzszerová, A. & Bernátová, I. Biochemical Aspects of Nitric Oxide Synthase Feedback Regulation by Nitric Oxide. *Interdiscip. Toxicol.* **4**, 63–8 (2011).
26. Lancaster, J. R. Nitroxidative, Nitrosative, and Nitrative Stress: Kinetic Predictions of Reactive Nitrogen Species Chemistry Under Biological Conditions. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1160–74 (2006).
27. Smith, B. C., Fernhoff, N. B. & Marletta, M. a. Mechanism and Kinetics of Inducible Nitric Oxide Synthase Auto-S-Nitrosation and Inactivation. *Biochemistry* **51**, 1028–40 (2012).



28. Halfpenny, E. & Robinson, P. L. Pernitrous Acid. The Reaction between Hydrogen Peroxide and Nitrous Acid, and the Properties of an Intermediate Product. *J. Chem. Soc.* 928–938 (1952).
29. Hughes, M. N. & Nicklin, H. G. The Chemistry of Pernitrites. Part I. Kinetics of Decomposition of Pernitrous Acid. *J. Chem. Soc.* 450–452 (1968).
30. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. & Freeman, B. A. Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1620–1624 (1990).
31. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. & Freeman, B. a. Peroxynitrite-Induced Membrane Lipid Peroxidation: The Cytotoxic Potential of Superoxide and Nitric Oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 481–7 (1991).
32. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. & Freeman, B. A. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls. The Cytotoxic Potential of Superoxide and Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244–4250 (1991).
33. Ischiropoulos, H. *et al.* Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 431–7 (1992).
34. Szabó, C., Ischiropoulos, H. & Radi, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 662–80 (2007).
35. Radi, R. Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant. *J. Biol. Chem.* **288**, 26464–72 (2013).
36. Carballal, S., Bartesaghi, S. & Radi, R. Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 768–80 (2014).
37. Alvarez, B. & Radi, R. Peroxynitrite Reactivity with Amino Acids and Proteins. *Amino Acids* **25**, 295–311 (2003).
38. Mahoney, L. R. Evidence for the Formation of Hydroxyl Radicals in the Isomerization of Pernitrous Acid to Nitric Acid in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 5262–5263 (1970).
39. Merényi, G., Lind, J., Goldstein, S. & Czapski, G. Peroxynitrous acid homolyzes into  $\cdot\text{OH}$  and  $\cdot\text{NO}_2$  radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 712–3 (1998).
40. Goldstein, S. & Lind, J. Chemistry of Peroxynitrites as Compared to Peroxynitrates. *Chem. Rev* **105**, 2457–2470 (2005).
41. Bartesaghi, S. *et al.* Protein Tyrosine Nitration in Hydrophilic and Hydrophobic Environments. *Amino Acids* **32**, 501–15 (2007).

42. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M. & Radi, R. Peroxynitrite Reaction with Carbon Dioxide/Bicarbonate: Kinetics and Influence on Peroxynitrite-Mediated Oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 49–58 (1996).
43. Lyman, S. V & Hurst, J. K. Rapid Reaction between Peroxynitrite Ion and Carbon Dioxide: Implications for Biological Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8867–8868 (1995).
44. Squadrito, G. L. & Pryor, W. A. Oxidative Chemistry of Nitric Oxide: The Roles of Superoxide, Peroxynitrite, and Carbon Dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 392–403 (1998).
45. Berlett, B. S., Levine, R. L. & Stadtman, E. R. Carbon Dioxide Stimulates Peroxynitrite-Mediated Nitration of Tyrosine Residues and Inhibits Oxidation of Methionine Residues of Glutamine Synthetase: Both Modifications mimic Effects of Adenylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2784–9 (1998).
46. Trujillo, M. & Radi, R. Peroxynitrite Reaction with the Reduced and the Oxidized forms of Lipoic Acid: New Insights into the Reaction of Peroxynitrite with Thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 91–8 (2002).
47. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G. & Radi, R. Peroxynitrite detoxification and its biologic implications. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1607–20 (2008).
48. Augusto, O. *et al.* Nitrogen Dioxide and Carbonate Radical Anion: Two Emerging Radicals in Biology. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 841–859 (2002).
49. Prütz, W. a, Mönig, H., Butler, J. & Land, E. J. Reactions of Nitrogen Dioxide in Aqueous Model Systems: Oxidation of Tyrosine Units in Peptides and Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 125–34 (1985).
50. Prütz, W. A. Tyrosine Oxidation by NO<sub>2</sub><sup>·</sup> in Aqueous Solution. *Z. Naturforsch* **39**, 725–727 (1984).
51. Möller, M. N. *et al.* Membrane “Lens” Effect: Focusing the Formation of Reactive Nitrogen Oxides from the <sup>·</sup>NO/O<sub>2</sub> Reaction. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 709–14 (2007).
52. Radi, R. Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Functional Effects. *Acc. Chem. Res.* **46**, 550–9 (2013).
53. Solar, S., Solar, W. & Getoff, N. Reactivity of OH with Tyrosine in Aqueous Solution Studied by Pulse Radiolysis. *J. Phys. Chem.* **123**, 2091–2095 (1984).
54. Jomova, K. & Valko, M. Advances in Metal-Induced Oxidative Stress and Human Disease. *Toxicology* **283**, 65–87 (2011).

55. Goldstein, S. & Merényi, G. The Chemistry of Peroxynitrite: Implications for Biological Activity. *Methods Enzymol.* **436**, 49–61 (2008).
56. Gutteridge, J. M. C. & Halliwell, B. Antioxidants: Molecules, Medicines, and Myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 561–4 (2010).
57. Du, J., Cullen, J. J. & Buettner, G. R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1826**, 443–57 (2012).
58. Hunter, E. P. L., Desrosiers, M. F. & Simic, M. G. The Effect of Oxygen, Antioxidants, and Superoxide Radical on Tyrosine Phenoxyl Radical Dimerization. *Free Radic. Biol. Med.* **6**, 581–585 (1989).
59. Sturgeon, B. E. *et al.* The Fate of the Oxidizing Tyrosyl Radical in the Presence of Glutathione and Ascorbate: Implications for the Radical Sink Hypothesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 30116–30121 (1998).
60. Quintana-Cabrera, R. & Bolaños, J. P. Glutathione and  $\gamma$ -glutamylcysteine in the antioxidant and survival functions of mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 106–10 (2013).
61. Aquilano, K., Baldelli, S. & Ciriolo, M. R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.* **5**, 1–12 (2014).
62. Folkes, L. K., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Radi, R. & Wardman, P. Kinetics of reduction of tyrosine phenoxyl radicals by glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **506**, 242–9 (2011).
63. Trujillo, M. *et al.* Peroxynitrite-derived carbonate and nitrogen dioxide radicals readily react with lipoic and dihydrolipoic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 279–88 (2005).
64. Marquardt, D. *et al.* Dimyristoyl Phosphatidylcholine: A Remarkable Exception to  $\alpha$ -Tocopherol's Membrane Presence. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 203–210 (2014).
65. Burton, G. W. *et al.* Autoxidation of Biological Molecules. 4. Maximizing the Antioxidant Activity of Phenols. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7053–7065 (1985).
66. Marquardt, D. *et al.* Tocopherol Activity Correlates with Its Location in a Membrane: A New Perspective on the Antioxidant Vitamin E. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 7523–7533 (2013).
67. Brigelius-Flohé, R. Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 543–54 (2009).
68. Niki, E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radic. Biol. Med.* **66**, 3–12 (2014).

69. Bowry, V. W., Ingoldt, K. U. & Stocker, R. Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem. j.* **288**, 341–344 (1992).
70. Bowry, V. W. & Stocker, R. Tocopherol-Mediated Peroxidation. The Prooxidant Effect of Vitamin E on the Radical-Initiated Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6029–6044 (1993).
71. Brigelius-Flohé, R. & Galli, F. Vitamin E: a vitamin still awaiting the detection of its biological function. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 583–7 (2010).
72. Azzi, A. Molecular mechanism of  $\alpha$ -tocopherol action. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 16–21 (2007).
73. Traber, M. G. & Atkinson, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 4–15 (2007).
74. Atkinson, J., Harroun, T., Wassall, S. R., Stillwell, W. & Katsaras, J. The location and behavior of alpha-tocopherol in membranes. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 641–51 (2010).
75. Ischiropoulos, H. Protein tyrosine nitration--an update. *Arch. Biochem. Biophys.* **484**, 117–21 (2009).
76. Reynolds, M. R., Berry, R. W. & Binder, L. I. Nitration in neurodegeneration: deciphering the “Hows” “nYs”. *Biochemistry* **46**, 7325–36 (2007).
77. Baldus, S. *et al.* Spatial Mapping of Pulmonary and Vascular Nitrotyrosine Reveals the Pivotal Role of Myeloperoxidase as a Catalyst for Tyrosine Nitration in Inflammatory Diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1010–1019 (2002).
78. Tyurina, Y. Y. *et al.* A mitochondrial pathway for biosynthesis of lipid mediators. *Nat. Chem.* **6**, 542–52 (2014).
79. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (W. H. Freeman and Company, 2008).
80. Bennati, M., Lenzian, F., Schmittel, M. & Zipse, H. Spectroscopic and theoretical approaches for studying radical reactions in class I ribonucleotide reductase. *Biol. Chem.* **386**, 1007–22 (2005).
81. Warren, J. J., Winkler, J. R. & Gray, H. B. Redox properties of tyrosine and related molecules. *FEBS Lett.* **586**, 596–602 (2012).
82. Abello, N., Kerstjens, H. a M., Postma, D. S. & Bischoff, R. Protein Tyrosine Nitration: Selectivity, Physicochemical and Biological Consequences, Denitration, and Proteomics Methods for the Identification of Tyrosine-Nitrated Proteins. *J. Proteome Res.* **8**, 3222–38 (2009).

83. Yang, H., Zhang, Y. & Pöschl, U. Quantification of Nitrotyrosine in Nitrated Proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 879–86 (2010).
84. Souza, J. M., Peluffo, G. & Radi, R. Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 357–66 (2008).
85. Radi, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 4003–8 (2004).
86. Sharov, V. S., Galeva, N. a, Dremina, E. S., Williams, T. D. & Schöneich, C. Inactivation of rabbit muscle glycogen phosphorylase b by peroxynitrite revisited: does the nitration of Tyr613 in the allosteric inhibition site control enzymatic function? *Arch. Biochem. Biophys.* **484**, 155–66 (2009).
87. Neumann, H., Hazen, J. L., Weinstein, J., Mehl, R. a & Chin, J. W. Genetically Encoding Protein Oxidative Damage. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4028–33 (2008).
88. Bartesaghi, S. *et al.* Lipid peroxy radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 821–35 (2010).
89. Tien, M. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of tyrosine. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 61–6 (1999).
90. Brennan, M.-L. *et al.* A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.* **277**, 17415–27 (2002).
91. Bolscher, B. G. & Wever, R. A kinetic study of the reaction between human myeloperoxidase, hydroperoxides and cyanide. Inhibition by chloride and thiocyanate. *Biochim. Biophys. Acta* **788**, 1–10 (1984).
92. Burner, U., Furtmüller, P. G., Kettle, A. J., Koppenol, W. H. & Obinger, C. Mechanism of Reaction of Myeloperoxidase with Nitrite. *J. Biol. Chem.* **275**, 20597–20601 (2000).
93. Van Dalen, C. J., Winterbourn, C. C., Senthilmohan, R. & Kettle, A. J. Nitrite as a Substrate and Inhibitor of Myeloperoxidase. Implications for Nitration and Hypochlorous Acid Production at Sites of Inflammation. *J. Biol. Chem.* **275**, 11638–11644 (2000).
94. Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **87**, 315–424 (2007).
95. Beckman, J. S. Understanding peroxynitrite biochemistry and its potential for treating human diseases. *Arch. Biochem. Biophys.* **484**, 114–6 (2009).
96. deBoer, T. R., Palomino, R. I., Idiga, S. O., Millhauser, G. L. & Mascharak, P. K. Tyrosine nitration in peptides by peroxynitrite generated in situ in a light-

- controlled platform: Effects of pH and thiols. *J. Inorg. Biochem.* **138**, 24–30 (2014).
97. Catalá, A. A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 318–23 (2010).
  98. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y. & Noguchi, N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 668–76 (2005).
  99. Niki, E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 469–84 (2009).
  100. Yin, H., Xu, L. & Porter, N. a. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* **111**, 5944–72 (2011).
  101. Schnitzer, E., Pinchuk, I. & Lichtenberg, D. Peroxidation of liposomal lipids. *Eur. Biophys. J.* **36**, 499–515 (2007).
  102. Forni, L. G., Mora-Arellano, V., Packer, J. E. & Willson, R. L. Nitrogen Dioxide and Related Free Radicals: Electron-transfer Reactions with Organic Compounds in Solution containing Nitrite or Nitrate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1–6 (1986).
  103. Davies, M. J., Forni, L. G. & Willson, R. L. Vitamin E analogue Trolox C. E.S.R and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions. *Biochem. J.* **255**, 513–522 (1988).
  104. Pinchuk, I. & Lichtenberg, D. Analysis of the kinetics of lipid peroxidation in terms of characteristic time-points. *Chem. Phys. Lipids* **178**, 63–76 (2014).
  105. Fagali, N. & Catalá, A. Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chem. Phys. Lipids* **159**, 88–94 (2009).
  106. Pratt, D. a, Tallman, K. a & Porter, N. a. Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: New mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. *Acc. Chem. Res.* **44**, 458–67 (2011).
  107. Xu, L., Davis, T. A. & Porter, N. A. Rate Constants for Peroxidation of Polyunsaturated Fatty Acids and Sterols in Solution and in Liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 13037–13044 (2009).
  108. Girotti, A. W. Mechanisms of Lipid Peroxidation. *Free Radicals Biol. Med.* **1**, 87–95 (1985).
  109. Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E. a & Guardiola, F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-

- xylenol orange method: a review of the factors that influence the method's performance. *Anal. Biochem.* **377**, 1–15 (2008).
110. Yin, H. & Porter, N. a. New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 170–84 (2005).
  111. Niki, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 809–17 (2014).
  112. Jiang, Z. Y., Woollard, a C. & Wolff, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26**, 853–6 (1991).
  113. Fukuzawa, K. *et al.* Measurement of Lipid Hydroperoxides by the Ferric-Xylenol Orange Method (1) Characteristics of the Ferric-Xylenol Orange/Membrane Phosphatidylcholine Complex. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **55**, 9–14 (2009).
  114. Fukuzawa, K. *et al.* Measurement of Phosphatidylcholine Hydroperoxides in Solution and in Intact Membranes by the Ferric-Xylenol Orange Assay. *Anal. Biochem.* **359**, 18–25 (2006).
  115. Janero, D. R. Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactivity as Diagnostic Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissue Injury. *Free Radic. Biol. Med.* **9**, 515–540 (1990).
  116. Guéraud, F. *et al.* Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic. Res.* **44**, 1098–124 (2010).
  117. Marnett, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* **424**, 83–95 (1999).
  118. Onyango, A. N. & Baba, N. New hypotheses on the pathways of formation of malondialdehyde and isofurans. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1594–600 (2010).
  119. Grintzalis, K., Zisimopoulos, D., Grune, T., Weber, D. & Georgiou, C. D. Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. *Free Radic. Biol. Med.* **59**, 27–35 (2013).
  120. Zhang, H. *et al.* Transmembrane Nitration of Hydrophobic Tyrosyl Peptides: Localization, Characterization, Mechanism of Nitration, and Biological Implications. *J. Biol. Chem.* **278**, 8969–78 (2003).
  121. Bartesaghi, S. *et al.* Mechanistic studies of peroxyxynitrite-mediated tyrosine nitration in membranes using the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester. *Biochemistry* **45**, 6813–25 (2006).
  122. Edelhofer, H. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. *Biochemistry* **6**, 1948–1954 (1967).

123. Zhao, D., Li, Q., Duan, E., Li, H. & Shen, X. Solubility of L-Lysine Hydrochloride in Dimethyl Sulfoxide, Methanol, Ethanol, Water, and Glycol between (283 and 323) K. *J. Chem. Eng. Data* **54**, 2126–2127 (2009).
124. Guo, D., Mant, C. T. & Hodges, R. S. Effects of Ion-Pairing Reagents on the Prediction of Peptide Retention in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **386**, 205–222 (1987).
125. Rajan, R. & Balaram, P. A model for the interaction of trifluoroethanol with peptides and proteins. *Int. J. Pept. Protein Res* **48**, 328–336 (1996).
126. Holt, A. *et al.* Tilt and rotation angles of a transmembrane model peptide as studied by fluorescence spectroscopy. *Biophys. J.* **97**, 2258–66 (2009).
127. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411–23 (1995).
128. Strandberg, E., Esteban-Martín, S., Ulrich, A. S. & Salgado, J. Hydrophobic mismatch of mobile transmembrane helices: Merging theory and experiments. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1242–9 (2012).
129. Lewis, B. A. & Engelman, D. M. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.* **166**, 211–7 (1983).
130. Huie, R. E. The reaction kinetics of NO<sub>2</sub>. *Toxicology* **89**, 193–216 (1994).
131. Gast, K. *et al.* Auto-Oxidation-Induced Fusion of Lipid Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **686**, 99–109 (1982).
132. Elferink, M. G. ., van Breemen, J., Konings, W. N., Driessen, A. J. . & Wilschut, J. Slow fusion of liposomes composed of membrane-spanning lipids. *Chem. Phys. Lipids* **88**, 37–43 (1997).
133. Xia, Y., Sun, J. & Liang, D. Aggregation, Fusion, and Leakage of Liposomes Induced by Peptides. *Langmuir* **30**, 7334–42 (2014).
134. Zhang, H., Joseph, J., Feix, J., Hogg, N. & Kalyanaraman, B. Nitration and Oxidation of a Hydrophobic Tyrosine Probe by Peroxynitrite in Membranes: Comparison with Nitration and Oxidation of Tyrosine by Peroxynitrite in Aqueous Solution. *Biochemistry* **40**, 7675–86 (2001).
135. Pfeiffer, S., Schmidt, K. & Mayer, B. Dityrosine Formation Outcompetes Tyrosine Nitration at Low Steady-state Concentrations of Peroxynitrite: Implications fo Tyrosine Modification by Nitric Oxide/Superoxide in vivo. *J. Biol. Chem.* **275**, 6346–6352 (2000).

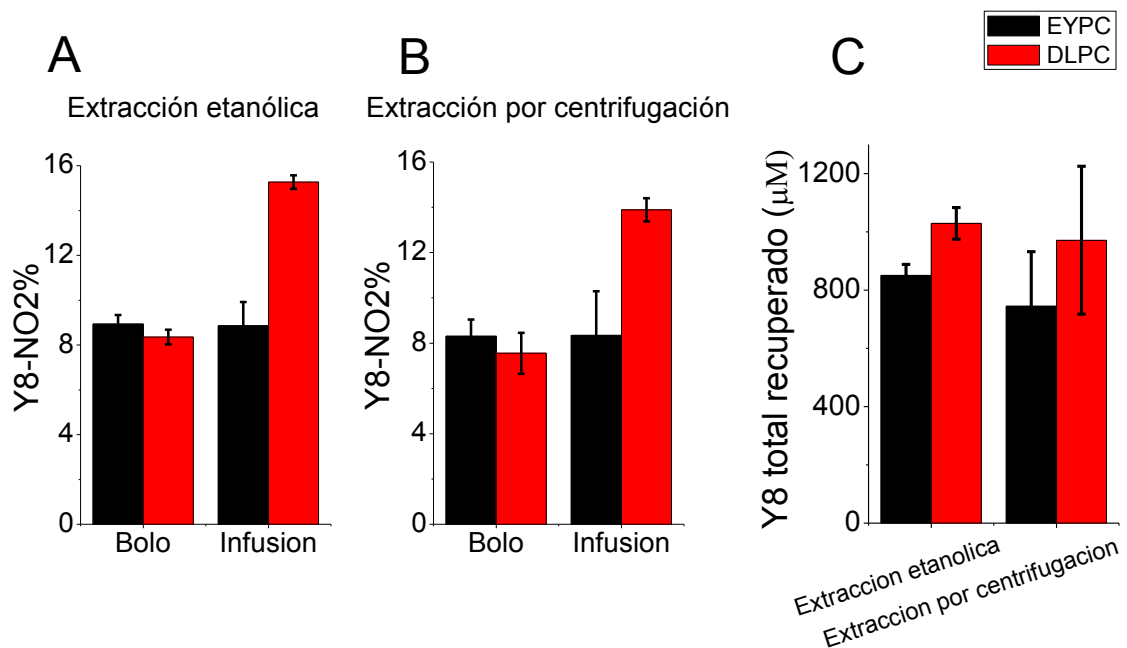


136. Savenkovas, M. I., Mueller, D. M. & Heinecke, J. W. Tyrosyl Radical Generated by Myeloperoxidase Is a Physiological Catalyst for the Initiation of Lipid Peroxidation in Low Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **269**, 20394–20400 (1994).
137. Garrec, J., Monari, A., Assfeld, X., Mir, L. M. & Tarek, M. Lipid Peroxidation in Membranes: The Peroxyl Radical Does Not “Float.” *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 1653–1658 (2014).
138. Carreau, A., Hafny-Rahbi, B. El, Matejuk, A., Grillon, C. & Kieda, C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 1239–1253 (2011).
139. <http://www.yisi.com/media/pdfs/DO-Oxygen-Solubility-Table.pdf>. **35**,
140. Möller, M. *et al.* Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **280**, 8850–4 (2005).

## Anexo:

### Comparación de los métodos de procesamiento de las muestras:

Durante la realización del experimento de comparación entre el agregado en bolo y el agregado en infusión se elaboró el método de procesamiento con etanol/TFE/TFA y se comparó con el método reportado por Zhang *et al*<sup>120</sup>. Estos están descritos en la sección de materiales y métodos. La comparación se realizó extrayendo dos alícuotas de cada muestra del experimento de la **figura 5.6** y procesando cada una por uno de los métodos, de forma que la única variable fuera el método de procesamiento. En el ensayo se comparan los porcentajes de nitración producidos por el agregado de peroxinitrito en bolo y en infusión lenta.



**Figura S.1. Comparación del procesamiento por agregado de etanol/TFE/TFA y el procesamiento por centrifugación (Zhang *et al*<sup>120</sup>).** Se trató al péptido Y8 (0,3 mM) en liposomas de EYPC ó DLPC (30 mM) con un agregado de 0,5 mM de peroxinitrito en forma de bolo o en infusión (25 µM/min) (A) Porcentajes de nitración en bolo e infusión obtenidos mediante el procesamiento de las muestras por agregado de dos volúmenes de etanol/TFE 5%/TFA 2,5%. (B) Porcentajes de nitración obtenidos mediante el procesamiento de las muestras por centrifugación. (C) Recuperación total de péptido por cada método, promediando las muestras con agregado en bolo e infusión (n=2).

En la **figura S.1A** y **S.1B** se observa que ambos métodos de procesamiento producen resultados similares en cuanto al porcentaje de nitración en cada punto, y que los resultados obtenidos por el método de procesamiento con solución etanólica tienen una menor dispersión que los obtenidos por el método reportado en la literatura. Además en la **figura S.1C** se ve que la recuperación de péptido total entre muestras tiene una dispersión considerablemente menor cuando se utiliza el método de extracción etanólica, pero que aun así los valores promedio de

recuperación son muy similares entre los dos métodos, lo que apoya la validez del nuevo protocolo por su equivalencia con el ya reportado.

**Recuperación de péptido en función de tiempo transcurrido hasta el procesamiento de las muestras:**

Al realizar el experimento de nitración en función de la concentración de oxígeno se procesaron las muestras en tres días distintos, de la forma que se muestra en la **tabla S.I**, almacenando las muestras sin procesar a 4°C.

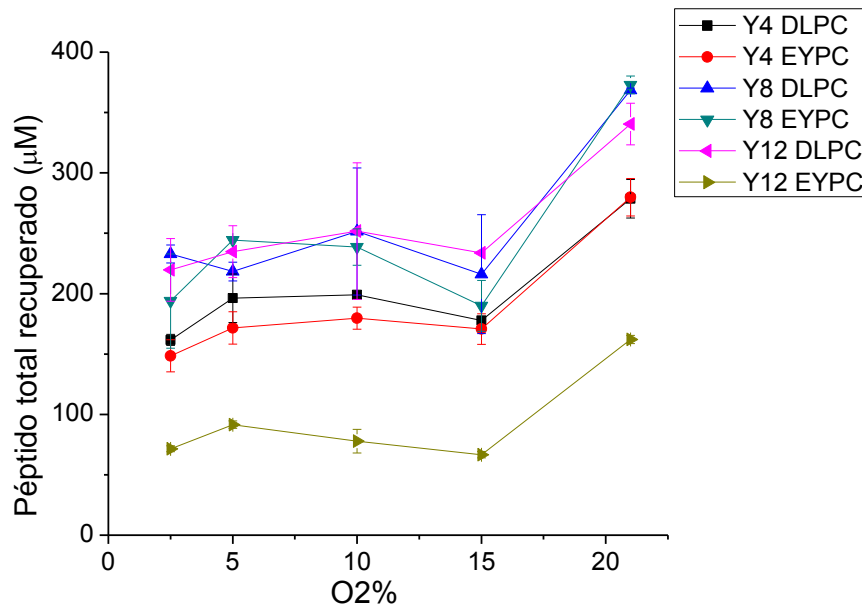
**Tabla 5.VII. Días entre el experimento y el análisis para las diferentes muestras.**

O <sub>2</sub> % atmosférico	Días entre el experimento y el análisis por HPLC
21% (control sin ONOO <sup>-</sup> )	0
21%	0
15%	2
10%	1
5%	1
2,5%	2

Lo que se observó en este experimento fue que la recuperación total de péptido disminuyó con el paso de los días, como se observa en la **tabla S.II**.

**Tabla S.II. Recuperaciones normalizadas respecto a la mayor recuperación del mismo par lípido-péptido.**

Péptido	Día	DLPC	EYPC
		(Recuperación±SD) %	(Recuperación±SD)%
Y4	0	100,0 ± 9,3	100,0 ± 9,7
	1	66,1 ± 3,9	58,0 ± 3,5
	2	56,7 ± 3,3	52,7 ± 5,5
Y8	0	100,0 ± 5,8	100,0 ± 5,4
	1	60,6 ± 9,3	69,0 ± 3,0
	2	57,9 ± 7,8	61,1 ± 8,2
Y12	0	100,0 ± 4,6	100,0 ± 4,8
	1	69,4 ± 10,3	50,2 ± 5,8
	2	64,0 ± 5,7	40,9 ± 2,1



**Figura S.2. Dependencia de la recuperación de péptido con la concentración de oxígeno.** Recuperación total de las muestras utilizadas en la sección 5.5.

En la figura se observa que la recuperación total obedece al tiempo que hayan pasado las muestras sin procesar, y que el perfil que se obtiene en esta figura es similar al obtenido para Y4 en la **figura 5.12**, lo que puede implicar que la dependencia de la nitración de Y4 con la concentración de oxígeno es baja, y se ve opacada por el efecto del día de procesamiento sobre el rendimiento de la nitración.

Los factores que pueden llevar a cambios en la recuperación son varios, como por ejemplo modificaciones químicas de los péptidos que cambien su tiempo de elución. Un ejemplo de este tipo de reacciones puede ser la conjugación del MDA con las lisinas de los péptidos, que se menciona en la introducción. A pesar de que no se continuó explorando las causas de la variación observada en la recuperación, a partir de este ensayo se comenzó a procesar los liposomas el mismo día en que se prepararon y se sometieron al oxidante.

### Agradecimientos:

Por el apoyo, a mi novia Tiki, a mis amigos, especialmente Jairo, Piria, Cola, Teo, Rana, Juani, Campolo, Mauricio y el resto de la gente del “call center”, a mis amigos de facultad, Guille, Santiago, Flo, Mauricio, Seba, Topo, Martina, a mi ex profesor Eduardo Mendez, a mis abuelos y a mis padres.

Por la invaluable ayuda con el HPLC, un agradecimiento especial a Mauricio Mastrogiovanni. Por enseñarme de dinámica molecular a Ariel Petruk.

Por las discusiones y opiniones valiosas, a Mauricio, Campolo, Madia, Vero Demicheli, Florencia Tomasina, Botti, Batthyany, Matías Möller, Etsuo Niki, Antoinette Killian.

A la Facultad de Ciencias de la UdelaR por la carrera gratuita y de excelente calidad.