

**Tesis de Doctorado en Química
Facultad de Química - PEDECIBA**

**MODULACIÓN DE LA ENZIMA PROSTAGLANDINA
G/H SINTASA POR ÁCIDO NITRO-ARAQUIDÓNICO:
MECANISMO Y CONSECUENCIAS EN LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS
BIOACTIVOS DERIVADOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO**

Lucía Bonilla Cal

Orientador: Dr. Homero Rubbo

Co-Orientador: Dr. Andrés Trostchansky

Tribunal de evaluación:

Dra. Ana Denicola

Dr. Álvaro Díaz

Dr. Bruce A. Freeman

Dr. Rafael Radi

Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina

Centro de investigaciones biomédicas en

radicales libres, CEINBIO

Universidad de la República

Montevideo, 12 de abril 2013

ÍNDICE

1.	RESUMEN Y ABREVIATURAS	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Óxido nítrico y especies reactivas de nitrógeno	2
2.2	Nitración lipídica	4
2.2.1	Mecanismos de nitración de ácidos grasos	4
2.2.1.1	Lipoperoxidación	4
2.2.1.2	Nitrogenación lipídica por óxido nítrico	6
2.2.1.3	Nitración lipídica por dióxido de nitrógeno	7
2.2.1.4	Nitración lipídica por peroxinitrito	9
2.2.2	Propiedades bioquímicas de los nitroalquenos	9
2.2.3	Propiedades biológicas de los nitroalquenos	12
2.2.4	Potencial terapéutico de los nitroalquenos	13
2.3	Prostaglandina G/H sintasa	14
2.3.1	Metabolismo del ácido araquidónico	14
2.3.2	Estructura y función de PGHS. Mecanismo de acción	16
2.3.3	Interacción de PGHS con especies reactivas de nitrógeno	21
2.3.4	Farmacología de PGHS	21
2.4	Antecedentes a este trabajo de investigación	23
3.	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo general	
3.2	Objetivos específicos	
4.	METODOLOGÍA	25
4.1	Síntesis de NO ₂ AA	25
4.2	Modulación de PGHS por NO ₂ AA	26
4.3	Impacto de NO ₂ AA sobre plaquetas humanas	30
4.4	Impacto de NO ₂ AA sobre la actividad PGHS-2 en macrófagos	33
4.5	Nitración catalítica de AA	34
4.6	Extracciones orgánicas	35
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
5.1	Síntesis de NO ₂ AA	36
5.1.1	Optimización del rendimiento de reacción	36
5.1.2	Análisis y purificación de isómeros posicionales de NO ₂ AA	38
5.2	Modulación de la enzima PGHS por NO ₂ AA	40
5.2.1	Caracterización cinética de la inhibición de PGHS por NO ₂ AA	41
5.2.1.1	Determinación de las actividades peroxidasa y ciclooxigenasa.....	41
5.2.1.2	Efecto de la dosis	42
5.2.1.3	Modelo cinético de inhibición	45

5.2.2	Evaluación de NO ₂ AA como potencial sustrato de PGHS	51
5.2.3	Efecto de NO ₂ AA sobre el grupo hemo de PGHS	51
5.3	Estudio de los determinantes estructurales en la interacción PGHS-NO ₂ AA	58
5.3.1	Interacción con el sitio activo COX	59
5.3.2	Inhibición de mutantes de PGHS-2 en residuos críticos para la unión al hemo y la unión a AINES	60
5.3.2.1	Mutantes en el sitio de unión a AINES (COX)	62
5.3.2.2	Mutantes en el sitio de unión del hemo (POX)	62
5.3.3	Análisis proteómico	67
5.3.4	Docking molecular	69
5.4	Modelos celulares para estudiar la inhibición de PGHS por NO ₂ AA	70
5.4.1	Efecto de NO ₂ AA en la actividad de macrófagos murinos	70
5.4.2	Efecto de NO ₂ AA en la actividad de plaquetas humanas	71
5.4.2.1	Formación de productos derivados del AA durante la activación plaquetaria	72
5.4.2.2	Agregación plaquetaria	75
5.4.2.3	Rol del *NO	77
5.4.2.4	Movilización de calcio y degranulación.....	79
5.4.2.5	Rol de la proteína quinasa C	81
5.5	Nitración catalítica de AA por PGHS en presencia de especies reactivas del nitrógeno	85
5.5.1	Detección y análisis de los productos de PGHS formados en presencia de peroxinitrito	85
5.5.2	Análisis de los productos formados en presencia de nitrito	88
5.5.3	Análisis de los productos formados en presencia de óxido nítrico	89
6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	93
7.	AGRADECIMIENTOS.....	95
8.	REFERENCIAS.....	96
9.	PUBLICACIONES.....	108

1. Resumen

El óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) cumple potentes acciones reguladoras en la función celular y viabilidad tisular. La disminución en su biodisponibilidad observada durante procesos inflamatorios crónicos y agudos responde a su transformación en especies reactivas del nitrógeno (ERN) y tiene un rol crítico en la regulación de la oxidación lipídica y en la consecuente formación de derivados nitrados de lípidos (nitroalquenos) con efectos anti-inflamatorios. Los nitrolípidos se forman *in vivo* y se han convertido en los últimos 20 años en uno de los principales objetos de estudio en el área de la química oxidativa de macromoléculas. Nuestro grupo ha caracterizado químicamente la síntesis y purificación de ácido nitroaraquidónico (NO_2AA), un nitroalqueno con propiedades biológicas asociadas a su capacidad anti-inflamatoria. El ácido araquidónico (AA^\bullet) es precursor de una amplia variedad de lípidos bioactivos, entre ellos los eicosanoides derivados de la vía Prostaglandina G/H sintasa (PGHS), y postulamos que su nitración para formar NO_2AA podría representar un mecanismo fundamental de modulación de los procesos inflamatorios vinculados al AA. En ese contexto integramos técnicas bioquímicas, proteómicas y computacionales para caracterizar cinética y estructuralmente la interacción de NO_2AA con PGHS-1 y PGHS-2. Demostramos que el NO_2AA es capaz de inactivar estas enzimas en forma irreversible, exhibiendo una potencia comparable a la de las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINES). Trasladamos este resultado a modelos celulares de relevancia biológica en el metabolismo de AA: plaquetas humanas y macrófagos murinos. El NO_2AA inhibió la actividad PGHS-1 y PGHS-2 *in vivo*, ejerciendo un potente efecto anti-agregante en plaquetas modulando el metabolismo normal del AA sumado a su acción sobre blancos adicionales a PGHS-1. Finalmente, ponemos a punto un sistema de reacciones para evaluar la síntesis catalítica de NO_2AA por la actividad PGHS y proponemos un posible mecanismo de regulación plaquetaria *in vivo*.

ABREVIATURAS: ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona; ACD, acetato-citrato-glucosa; TCEP, ácido 3,3',3''-fosfanetripropanoico; AAS, ácido acetilsalicílico; AA, ácido araquidónico; AGI, ácido graso insaturado; AGMI, ácido graso mono-insaturado; AGPI, ácido graso poliinsaturado; NO_2AA , ácido nitroaraquidónico; NO_2LA , ácido nitrolinoleico; NO_2OA , ácido nitrooleico; TCA, ácido tricloroacético; HETEs, ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos; Ang-II, angiotensina-II; aPGHS, apo-PGHS; $\cdot\text{AA}$, radical araquidonilo; COX, ciclooxigenasa; CAD, colission activated dissociation; TLC, cromatografía en capa fina; DAG, diacilglicerol; $\cdot\text{NO}_2$, dióxido de nitrógeno; AINES, drogas anti-inflamatorias no esteroideas; ESI, electrospray ionization; AREs, elementos de respuesta antioxidante; EPI, enhanced product ion scan; ERN, especies reactivas de nitrógeno; Fe^{2+} -PPIX, Fe^{2+} -protoporfirina IX; Fe^{3+} -PPIX, Fe^{3+} -protoporfirina IX; PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo; PMA, forbol 12-miristato 13-acetato; PIP_2 , fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PLA_2 , fosfolipasa A₂; sGC, guanilato ciclasa soluble; HO-1, hemo oxigenasa-1; LOOH, hidroperóxido lipídico; hPGHS, holo-PGHS; LOX, lipoxigenasa; MS, mass spectrometry; MPO, mieloperoxidasa; MEK/Erk, mitogen protein kinase kinase/extracellular-signal regulated kinase; MRM, multiple reaction monitoring; TMPD, N,N,N',N'-tetrametil-fenilenediamina; NO_x , NADPH oxidasa; NO_3^- , nitrato; NO_2^- , nitrito; NOS2, NOS inducible; NOS, óxido nítrico sintasas; $\cdot\text{NO}$, óxido nítrico; oxiHb, oxihemoglobina; EFOX, oxo-derivados electrofílicos; POX, peroxidasa; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; PGI_2 , prostaciclina; PGHS, prostaglandina G/H sintasa; PG, prostaglandina; PKC, proteína quinasa C; LO^\bullet , radical alcoxilo; L^\bullet , radical alquilo; LOO^\bullet , radical peroxilo; PAR, receptor activado por proteasa; SOD, superóxido dismutasa; O_2^\bullet , superóxido; N_2O_4 , tetraóxido de dinitrógeno; N_2O_3 , trióxido de dinitrógeno; TxA_2 , tromboxano A₂; TxB_2 , tromboxano B₂.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Óxido nítrico y especies reactivas de nitrógeno

El $\cdot\text{NO}$ es un radical libre producido por células de mamífero y sintetizado por la familia de enzimas denominada óxido nítrico sintasas (NOS) que catalizan la oxidación de L-arginina a L-citrulina en presencia de oxígeno molecular (O_2) y NADPH. Las isoformas de la NOS se dividen en: *i*) NOS neuronal constitutiva (nNOS), *ii*) NOS inducible (NOS2) presente en macrófagos, y *iii*) NOS constitutiva asociada a la membrana de células endoteliales (eNOS) [1, 2]. A diferencia de otros radicales, el $\cdot\text{NO}$ no es un oxidante ni un reductor fuerte por lo cual es relativamente estable. Su vida media en sistemas aeróbicos es de 5-60 segundos dependiendo de la presencia de blancos biológicos (ej. guanilato ciclasa soluble (sGC), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)) y de su compartimentalización [3-5]; esta vida media es lo suficientemente larga para permitirle difundir y actuar como segundo mensajero produciendo sus efectos biológicos. El $\cdot\text{NO}$ actúa como mediador de la regulación de la presión sanguínea, la agregación plaquetaria, y la plasticidad neuronal [3-5]. El $\cdot\text{NO}$ producido por las células endoteliales en respuesta a diversos agonistas (bradiquinina, acetilcolina, shear stress) difunde hasta el citosol de las células musculares lisas de la media vascular y activa la sGC, que a través de la producción de GMP cíclico (cGMP) induce la relajación del vaso sanguíneo [6]. El $\cdot\text{NO}$ también regula múltiples procesos biológicos de manera indirecta. La formación de especies reactivas derivadas del $\cdot\text{NO}$ (ERN) está involucrada en procesos de regulación fisiológica y también muy asociada a la patofisiología de la inflamación. Las principales reacciones del $\cdot\text{NO}$ son: *i*) combinaciones radical-radical para formar especies de mayor reactividad, *ii*) formación de complejos nitrosilo con centros metálicos de transición o aductos nitroso con biomoléculas, y *iii*) reacciones redox [7] (Figura 1).

El peroxinitrito es un poderoso oxidante que se forma *in vivo* por la reacción controlada por difusión entre el $\cdot\text{NO}$ y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($k = 4.3 \times 10^9 - 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [8, 9] (Figura 1). El $\cdot\text{NO}$ puede competir con la superóxido dismutasa (SOD) por el $\text{O}_2^{\cdot-}$ lo cual resulta en un flujo estacionario de peroxinitrito que se establece en el rango de concentraciones nanomolar [10]. En el medio biológico el par $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ establece un rápido equilibrio dependiente de pH ($\text{pK}_a=6.8$ a 37°C) y reacciona mediante *i*) oxidación directa por uno o dos electrones (figura 1), *ii*) adición nucleofílica a dióxido de carbono (CO_2) redirigiendo la actividad biológica del peroxinitrito [11-15] hacia formación del intermediario anión nitrosoperoxocarbonato ($\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$) ($k = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [11], que se descompone formando dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) y anión radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) [16], o nitrato (NO_3^-) [11, 14, 15] (Figura 1), o *iii*) clivaje homolítico del ácido peroxinitroso (ONOOH) (figura 1) a $\cdot\text{NO}_2$ y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) o isomerización directamente a NO_3^- (Figura 1) [9]. Cuando aumenta la producción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ la síntesis de peroxinitrito adquiere relevancia biológica: la especie aniónica - ONOO^- - y su ácido conjugado - ONOOH - y las ERN derivadas de la adición del peroxinitrito al CO_2 , y en menor medida las ERN derivadas de su homólisis, modifican una gran variedad de blancos biológicos. Las ERN tienen una reactividad única hacia

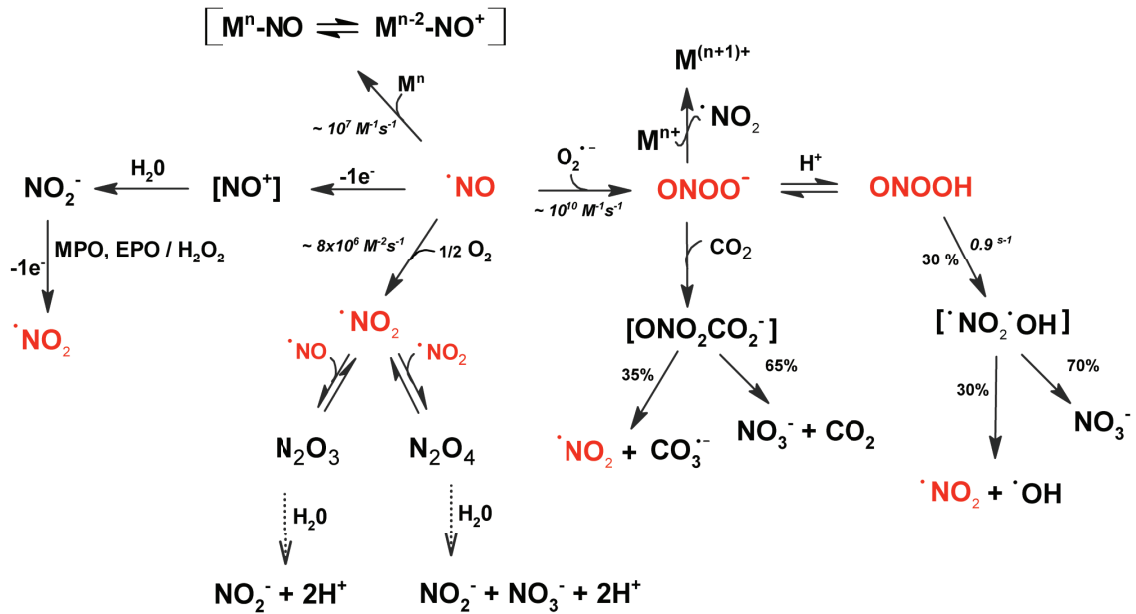


Figura 1. Principales mecanismos de reacción de $\cdot NO$ y formación de ERN. El $\cdot NO$ se sufre reacciones de tipo redox (ej. oxidaciones o reducción por un electrón), auto-oxidación, o combinación con otros radicales (ej.: $O_2^{\cdot-}$ para formar peroxinitrito). El peroxinitrito es una especie no radicalar altamente oxidante, que forma $\cdot NO_2$ por varias vías. Enzimas como la mieloperoxidasa (MPO) promueven la oxidación por un electrón de NO_2^- para formar $\cdot NO_2$ dependiente de la presencia de H_2O_2 . Los radicales y especies involucradas en la nitración lipídica se muestran en rojo.

(Modificado de Denicola *et al.*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996, Vol. 333, y de Radi *et al.*, Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, 2000, Ch. 4).

proteínas [17], lípidos [18-21] y ADN [22, 23] promoviendo reacciones de nitrosación, nitración y/o oxidación. Estas modificaciones inducen respuestas citotóxicas que promueven las respuestas inflamatorias y procesos neurodegenerativos [24, 25], y más recientemente también se ha reconocido que actúan como medio de señalización redox en la regulación de procesos biológicos, en particular la nitración de residuos tirosina en proteínas y la nitración de ácidos grasos insaturados [26, 27].

El $\cdot NO_2$ es un radical altamente oxidante descrito inicialmente como un contaminante ambiental. Su formación *in vivo* se debe principalmente a la *i*) autooxidación del $\cdot NO$ ($k = 2 \times 10^6 M^{-2}s^{-1}$), *ii*) oxidación de nitrito (NO_2^-) por hemoperoxidasas, y *iii*) homólisis de ONOOH (Figura 1) [7]. Las moléculas gaseosas de $\cdot NO_2$ formadas establecen un equilibrio con su dímero, el N_2O_4 . En presencia de agua el N_2O_4 se descompone rápidamente a NO_2^- y NO_3^- . Alternativamente, el $\cdot NO_2$ reacciona con $\cdot NO$ para formar N_2O_3 , un agente nitrosante que se descompone a NO_2^- en presencia de agua (Figura 1). En ambientes ácidos con altas concentraciones de NO_2^- , como el compartimento gástrico, el equilibrio favorece la formación de $\cdot NO_2$ a partir de N_2O_3 [28, 29].

2.2 Nitración lipídica

La reacción del $\cdot\text{NO}$ y las ERN con ácidos grasos insaturados (AGIs) genera una variedad de productos oxidados y nitrados, que poseen propiedades biológicas relevantes [18, 30-32]. Se han identificado, detectado y cuantificado derivados nitrados de AGIs en plasma y tejidos de pacientes normales e hipercolesterolémicos así como en membranas de glóbulos rojos [33, 34]; además, se ha demostrado que su formación se induce en sistemas expuestos a estímulos inflamatorios [35-38], y se ha descrito su rol como nuevos compuestos que modulan vías de señalización celular generalmente asociadas a procesos inflamatorios [39, 40].

2.2.1 Mecanismos de nitración de ácidos grasos

Los trabajos pioneros de William Pryor durante la década de 1980 fueron los primeros en aportar información sobre los mecanismos radicalares involucrados en la síntesis de los nitroalquenos [41, 42]. Durante este período se consideraba como única fuente de nitración a las toxinas normalmente presentes en el aire como consecuencia de la contaminación ambiental o el humo de cigarrillo, principalmente $\cdot\text{NO}_2$. En 1988 J.L Ignarro y colaboradores descubrieron que el factor de relajamiento derivado del endotelio (EDRF, del inglés) era el $\cdot\text{NO}$ [43], y rápidamente se supo que la síntesis endógena de especies reactivas derivadas del $\cdot\text{NO}$ estaba involucrada en la regulación de procesos fisiológicos. A partir de la década de 1990 la nitración lipídica mediada por ERN gana relevancia biológica como potencial vía de regulación redox de procesos celulares [18].

El mecanismo de síntesis de nitrolípidos *in vivo* se desconoce, pero numerosos trabajos *in vitro* señalan que las vías más probables involucran la reacción de los ácidos grasos con $\cdot\text{NO}_2$, peroxinitrito, $\cdot\text{NO}$, o NO_2^- en medio ácido (vía formación de $\cdot\text{NO}_2$), y particularmente $\cdot\text{NO}_2$ [32, 44]. La extrapolación de estas observaciones al medio biológico representa un desafío debido a la complejidad del sistema, donde se debe considerar el sitio celular de síntesis y la distribución celular de las especies reactivas responsables, la vida media de las especies intermediarias, y la presencia de targets biológicos que podrían competir por las especies nitrantes.

2.2.1.1 Lipoperoxidación

La lipoperoxidación es el proceso por el cual se incorpora O_2 a lípidos insaturados (LH) para formar hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (Figura 2). Es clave discutir este proceso para entender el mecanismo de nitración lipídica.

La etapa de iniciación de la lipoperoxidación consiste en un ataque a LH por parte de cualquier especie suficientemente reactiva como para abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno de la cadena lipídica (ej., $\cdot\text{OH}$) [45]. Característicamente, los átomos de hidrógeno unidos a carbonos adyacentes a un doble enlace establecen enlaces más lábiles

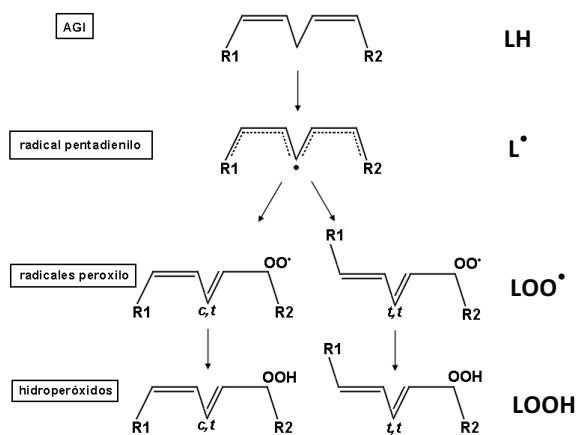


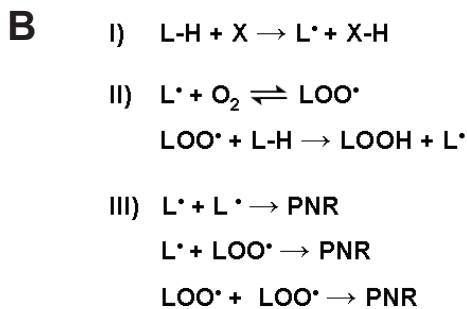
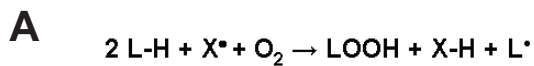
Figura 2. Formación de hidroperóxidos durante la lipoperoxidación. En la etapa de iniciación se forma un radical lipídico (L^{\bullet}) por abstracción de un hidrógeno lábil de la cadena hidrocarbonada, formando en el caso de AGPI un radical pentadienilo por abstracción de un hidrógeno bis-alílico. Los radicales LOO^{\bullet} formados por adición de O_2 pueden adoptar diferentes isomerismos geométricos y posicionales en función de los átomos dadores de hidrógeno en el ambiente de la reacción, que capturan a los radicales LOO^{\bullet} para generar los peróxidos lipídicos, LOOH. La cantidad de isómeros de LOOH formados aumenta con el número de insaturaciones presentes en el AGI.

radicales LOO^{\bullet} de AGI pueden adoptar diferentes isomerismos geométricos y posicionales, de acuerdo principalmente a la presencia de átomos dadores de hidrógeno en el ambiente de la reacción, que capturan a los radicales LOO^{\bullet} para generar LOOH. La cantidad de isómeros de LOOH formados aumenta en proporción al número de insaturaciones presentes en el AGI [49]. El radical LOO^{\bullet} resultante abstrae un hidrógeno de otra molécula lipídica, dando lugar a otro radical L^{\bullet} , que es el primero de la cadena de propagación. La velocidad de propagación depende de la fuerza del enlace C-H del lípido que está siendo oxidado; el radical reacciona preferencialmente con los hidrógenos en las posiciones bis-alílicas, resultando en la formación de un radical pentadienilo altamente deslocalizado [48] (Esquema 1).

En la etapa de terminación el acoplamiento de dos radicales da lugar a un producto no radicalar [48] (Esquema 1). En el medio celular ocurren procesos de terminación debido a la presencia de antioxidantes naturales (no radicalares) que capturan a los intermediarios de lipoperoxidación LOO^{\bullet} i) por transferencia de un átomo de hidrógeno formando LOOH y

(hidrógenos alílicos). Un ácido graso mono-insaturado (AGMI) tiene dos posiciones alílicas, mientras que los ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) tienen $x-1$ posiciones bis-alílicas, siendo x el número de dobles enlaces de la molécula [46]. Por lo tanto, los AGPI son más susceptibles a la lipoperoxidación que los ácidos grasos saturados o los AGMI [47]. En general, las reacciones de iniciación mediadas por radicales libres proporcionan más energía que la perdida por la disociación del enlace carbono-hidrógeno, de manera que la abstracción del hidrógeno alílico del LH forma una molécula no radicalar más estable y un radical alquilo centrado en carbono (L^{\bullet}) inestable en presencia de O_2 , radicales libres y agentes reductores [46]. Otras fuentes de iniciación de la cadena son los metales de transición, como el cobre u el hierro, ciertos sistemas enzimáticos o la radiación ionizante [48] (Esquema 1).

Durante la etapa de propagación se adiciona un O_2 al radical alquilo, L^{\bullet} , dando como producto un radical peroxilo centrado en O_2 , LOO^{\bullet} . La reacción entre los radicales L^{\bullet} y el O_2 tiene un comportamiento similar a un proceso mediado por difusión [46]. Los



Esquema 1. Reacciones de la lipoperoxidación. (A) Ecuación global. (B) Reacciones de I) iniciación, II) propagación, y III) terminación.

PNR, productos no radicalares

un radical derivado del antioxidante, o *ii*) por un acoplamiento radicalar entre el radical derivado del antioxidante y el radical LOO^\bullet . La terminación biológica de la lipoperoxidación disminuye el consumo autoxidativo de AGI, con un efecto protector sobre las células [50]. El organismo cuenta además con una serie de sistemas de defensa contra la lipoperoxidación. Entre ellos se encuentran los antioxidantes enzimáticos (SOD, glutatión peroxidasa, catalasa) y los antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular (α -tocoferol, ascorbato, ácido lipoico, glutatión, urato). Entre los antioxidantes de bajo peso molecular, el más destacado es la vitamina E (mezcla de tocoferoles, de los cuales el α -tocoferol es el más abundante y potente) [51, 52]. Alternativamente, la lipoperoxidación en la membrana puede terminarse por $\bullet\text{NO}_2$ o por $\bullet\text{NO}$,

formando productos nitrogenados [18, 53]. Una predominancia de la nitración lipídica por sobre la oxidación lipídica es esperable en condiciones hipóxicas (ej. isquemia-reoxigenación, inflamación), donde el nivel de O_2 tisular está disminuido y hay un aumento en la producción de $\bullet\text{NO}$.

2.2.1.2 Nitrogenación lipídica por $\bullet\text{NO}$

El $\bullet\text{NO}$ y sus ERN derivadas reaccionan con biomoléculas críticas alterando su función [54]. El $\bullet\text{NO}$ tiene un efecto dual como mediador biológico que queda perfectamente ilustrado en el proceso de lipoperoxidación [18, 53]. Una típica curva dosis/respuesta para $\bullet\text{NO}$ muestra que cuando la relación $\bullet\text{NO}/\text{O}_2^\bullet$ es baja, el aumento en los niveles de $\bullet\text{NO}$ estimula la producción de peroxinitrito capaz de iniciar la lipoperoxidación (efecto pro-oxidante); cuando la relación $\bullet\text{NO}/\text{O}_2^\bullet$ es igual o mayor a la unidad el $\bullet\text{NO}$ actúa como terminador de la lipoperoxidación (efecto anti-oxidante) [18]. Si bien el $\bullet\text{NO}$ no es lo suficientemente reactivo para iniciar la peroxidación lipídica, es altamente reactivo con los intermediarios que se forman durante la propagación del proceso (LO^\bullet , o LOO^\bullet) ($k=1\text{-}3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [55], dando lugar a la formación de una variedad de productos nitrogenados (Figura 3). La reactividad del $\bullet\text{NO}$ con los radicales lipídicos es mayor que para el tocoferol ($k \sim 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [56], indicando que el $\bullet\text{NO}$ podría proteger al tocoferol presente en membranas biológicas de los procesos oxidativos.

La nitración de ácidos grasos *in vivo* ocurre principalmente en compartimentos hidrofóbicos como la bicapa lipídica celular, o en el interior lipofílico de lipoproteínas. El $\bullet\text{NO}$ difunde libremente hacia el interior de membranas y lipoproteínas, debido a su pequeño radio molecular, carga neutra y carácter hidrofóbico. Este “efecto lupa” de la

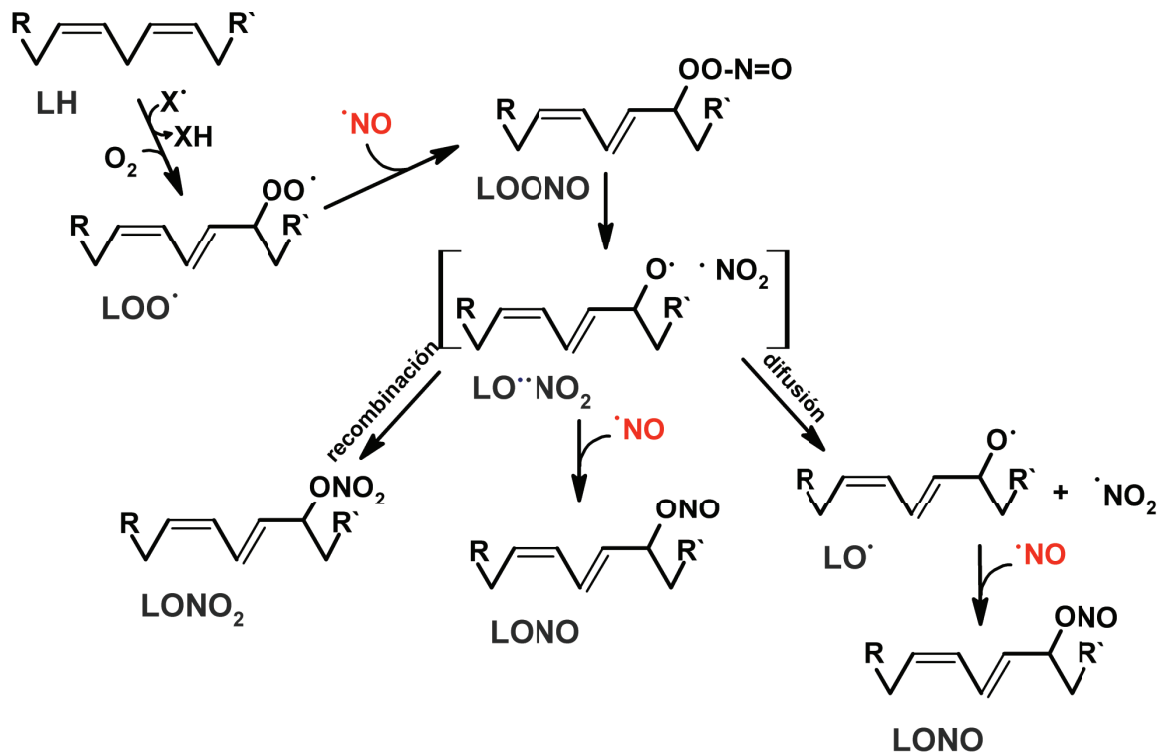


Figura 3. Mecanismos propuestos de nitración lipídica por $\cdot\text{NO}$. La adición de $\cdot\text{NO}$ a mezclas lipídicas durante la lipoperoxidación inhibe el consumo de O_2 , que se recupera únicamente cuando todo el $\cdot\text{NO}$ se consumió. La estequiometría de la reacción es de al menos dos moléculas de $\cdot\text{NO}$ por cada LOO^\cdot formado. El producto inicial de la reacción es un peroxinitrito orgánico (LOONO), un intermediario inestable que se descompone por varias vías. La homólisis del enlace O-O en LOONO forma LO^\cdot y $\cdot\text{NO}_2$, y una segunda molécula de $\cdot\text{NO}$ se consume en la reacción con LO^\cdot generando un alquilnitrito (LONO) como producto final. Vías alternativas dan lugar a otros productos nitrogenados.

(Figura adaptada de O'Donnell *et al.*, *Biochemistry*, 1997, Vol. 36)

membrana es responsable de que aproximadamente el 90% de la autoxidación del NO se lleve a cabo en este compartimento, a pesar de que representa únicamente el 3% del volumen celular total [57-59].

2.2.1.3 Nitración lipídica por $\cdot\text{NO}_2$

A diferencia del $\cdot\text{NO}$, el $\cdot\text{NO}_2$ es un potente agente oxidante y nitrante. La fuente más probable de $\cdot\text{NO}_2$ en los compartimentos hidrofóbicos es la autoxidación de $\cdot\text{NO}$, que a pesar de tener una constante de velocidad relativamente baja ($k=2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [57] está altamente favorecida por el efecto lupa de la membrana [58]. El $\cdot\text{NO}_2$ media la oxidación y nitración de AGIs por *i*) abstracción de hidrógeno de la cadena [41], *ii*) adición molecular a un centro de carbono [41]. Estas reacciones generan una mezcla de productos isomerizados, oxidados, derivados nitro-alílicos, nitroalquenos, di-nitro o nitro-hidroxilados [31, 60] (Figura 4). El perfil de los productos generados depende fundamentalmente de la concentración de $\cdot\text{NO}_2$ y O_2 presente. A bajas concentraciones de $\cdot\text{NO}_2$ predomina la vía de

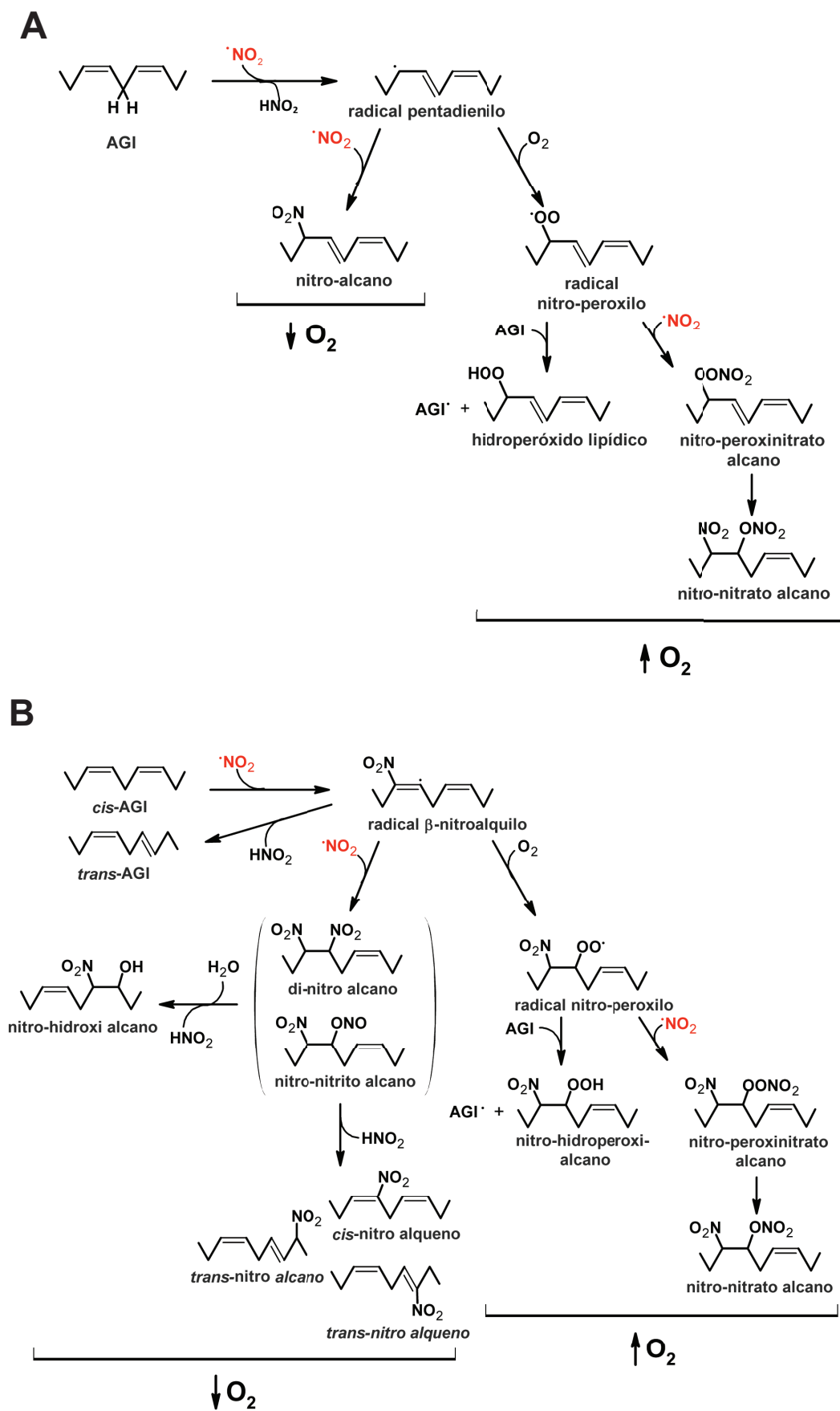


Figura 4. Mecanismos de nitración lipídica por $\cdot\text{NO}_2$. (A) El $\cdot\text{NO}_2$ puede abstraer un hidrógeno alílico o bis-alílico de un AGI formando un radical lipídico centrado en carbono y ácido nitroso (HONO), que se descompone rápidamente tornando la reacción irreversible. A baja tensión de O_2 , una segunda molécula

de $\cdot\text{NO}_2$ reacciona con el radical $\text{L}\cdot$ formando un nitroalcano (o derivado nitro-alílico). Cuando la tensión de O_2 es más elevada, se forma un radical nitro-peroxilo que es altamente inestable y puede reaccionar con un AGI vecino para iniciar la lipoperoxidación; alternatively reacciona con una segunda molécula de $\cdot\text{NO}_2$ para formar un nitro-nitrato alcano. **(B)** A concentraciones más elevadas, el $\cdot\text{NO}_2$ reacciona por adición homolítica a un centro insaturado para formar un radical β -nitroalquilo. En medio acuoso el principal producto es *trans*-AGI. En ambientes apolares y a baja tensión de O_2 , el radical reacciona con una segunda molécula de $\cdot\text{NO}_2$ formando un dinitro-alcano y/o un nitro-nitrito alcano, intermediarios inestables que se descomponen a nitroalqueno en *cis* o *trans* (minoritario) y HONO. Alternativamente, la hidrólisis de los alcanos nitrogenados puede dar un nitro-alcohol. Cuando la tensión de O_2 es más elevada, se forma un radical nitro-peroxilo capaz de iniciar la peroxidación lipídica o de reaccionar con otra molécula de $\cdot\text{NO}_2$ para formar un nitro-nitrato alcano.

(Figura adaptada de Pryor WA. *et al.*, J. Am. Chem. Soc, 1982, Vol. 104; Gallon AA. *et al.*, Lipids, 1993, Vol. 28; Gallon AA. *et al.*, Lipids, 1994, Vol. 29; O'Donnell *et al.*, Chem. Res. Toxicol, 1999, Vol. 12)

abstracción de hidrógeno (Figura 4A). En términos generales, la abstracción de hidrógeno por $\cdot\text{NO}_2$ es una reacción muy lenta, pero en sistemas con átomos de hidrógeno activados (ej. hidrógenos bis-alílicos en centros metileno) se torna muy favorable e irreversible. El mecanismo de nitración por $\cdot\text{NO}_2$ de mayor relevancia biológica es la adición a un centro de carbono insaturado; es una reacción reversible que se ve favorecida cuando la concentración de $\cdot\text{NO}_2$ es elevada (Figura 4B). El primer intermediario de la reacción es el radical β -nitroalquilo, y los productos finales dependen de la polaridad del medio (ambientes hidrofílicos favorecen la isomerización a *trans*) y de la tensión de O_2 (Figura 4B). Los niveles de O_2 tienen un fuerte impacto sobre el rendimiento de oxidación versus nitración, una vez que el $\cdot\text{NO}_2$ inició el proceso de oxidación lipídica [41, 61, 62]

2.2.1.4 Nitración lipídica por peroxinitrito

El peroxinitrito reacciona con una variedad de blancos biológicos, incluyendo residuos de tirosina en proteínas, tioles, y AGIs [17, 30, 63, 64]. Representa una fuente de $\cdot\text{NO}_2$ en membranas lipídicas, en donde ingresa por difusión (ONOOH) o a través de canales aniónicos (ONOO^-) [65]. El paso limitante de la nitración de AGIs por peroxinitrito es la formación de $\cdot\text{NO}_2$ por homólisis de ONOOH o de $\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$, ya que no hay reacción directa de ONOO^- o ONOOH con los centros carbono insaturados [18]. Cambios en el pH y en la concentración de CO_2 son importantes en la modulación de la reactividad de peroxinitrito con ácidos grasos, y pueden favorecer la nitración lipídica sobre las reacciones de oxidación [66].

2.2.2 Propiedades bioquímicas de los nitroalquenos

La presencia de nitro ($-\text{NO}_2$) en un centro insaturado de la cadena hidrocarbonada de un ácido graso da lugar a un nitroalqueno, con propiedades fisicoquímicas únicas respecto a su par no nitrado. Los nitroalquenos son levemente más polares que los ácidos grasos no nitrados, pero aún mantienen una alta hidrofobicidad debida a la cadena hidrocarbonada.

La deficiencia de electrones del grupo $-\text{NO}_2$ aumenta la acidez de los hidrógenos unidos a los carbonos adyacentes. Los hidrógenos bis-alílicos de grupos metileno en nitro-AGPI son particularmente reactivos/lábiles explicando la estabilidad reducida de los nitro-AGPI respecto a los nitro-AGMI en medio acuoso [60].

La deficiencia de electrones del grupo $-\text{NO}_2$ confiere de una elevada electrofilicidad al carbono β -adyacente en la cadena hidrocarbonada y favorece su reacción con centros nucleofílicos (ej.: cisteínas, histidina, o lisina presentes en las proteínas, glutatión (GSH) en el citosol, etc) por una adición de Michael, normalmente llamada “nitroalquilación” cuando el electrófilo es un nitroalqueno (Figura 5A) [67, 68]. Los aductos de Michael formados son fácilmente reversibles en el rango de concentración fisiológica de GSH. Se han identificado aductos de GSH con ácido nitro-oleico (NO_2OA) y nitro-linoleico (NO_2LA) en glóbulos rojos humanos de voluntarios sanos [67]. Los nitroalquenos tienen propiedades espectrales en el

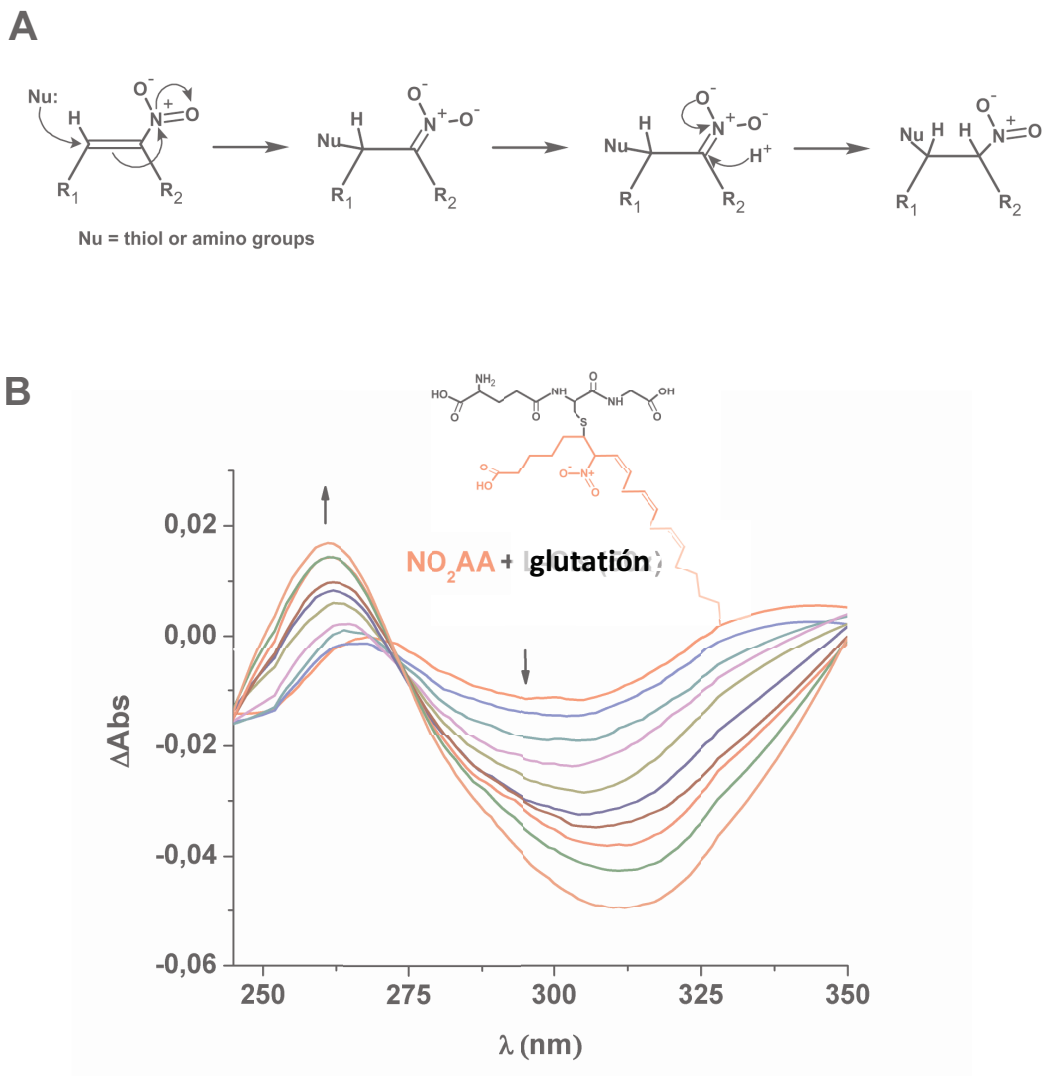


Figura 5. Reacción de Michael entre un nitroalqueno y una especie nucleofílica. (A) En la adición de Michael el nucleófilo reacciona con el electrófilo en la posición β formando un aducto covalente. **(B)** Análisis espectral de la reacción de NO_2AA con glutatión.

((A) se extrajo de Baker *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2007, Vol. 282)

UV características, que cambian cuando establecen un aducto covalente con cisteína o glutatión. El ácido nitroaraquidónico (NO₂AA) tiene un máximo de absorbancia alrededor de 270 nm en solventes apolares, característico del sistema conjugado que se forma en la cadena hidrocarbonada por adición del grupo -NO₂ a un grupo vinilo. En el transcurso de la nitroalquilación el grupo NO₂-vinilo se reduce a NO₂-alilo (donde -NO₂ está unido a un centro C-C saturado) y en consecuencia se observa una disminución en el máximo de absorbancia (Figura 5B) [68]. Esta propiedad proporcionó un método sencillo para la caracterización cinética de la reacción de nitroalquenos con pequeños targets nucleofílicos. La reacción de NO₂OA y NO₂LA con cisteína ($k=183$ and $355 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente; pH 7.4, T=37°C) fue igual o más rápida que para otros electrófilos lipídicos de relevancia biológica (ej. hidroxinonal, isoprostanos, etc) [68].

La estabilidad biológica de los nitrolípidos depende fundamentalmente del equilibrio que se establece entre su descomposición en medio acuoso, donde son inestables [60], y la reactividad electrofílica con blancos biológicos, ej. modificaciones post-traduccionales de proteínas [67]. Los nitroalquenos generados *in situ* o almacenados por esterificación a componentes lipídicos de membrana son estables y no reactivos. En respuesta al aumento de la concentración intracelular de calcio (Ca²⁺) son liberados al citosol por acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), y se movilizan para alcanzar sus targets celulares formando aductos de Michael con proteínas y tioles de bajo peso molecular [21, 32]. La descomposición de los nitroalquenos en medio acuoso genera [•]NO [60] y transcurre mediante *i*) una reacción de Nef modificada, que involucra la formación de un intermediario inestable nitroso, o *ii*) el rearreglo del nitroalqueno a ester de nitrito, seguido de la homólisis del enlace N-C [60, 69]. Los nitroalquenos son capaces de inducir vasorelajación por activación de la sGC [69-71] y podrían cumplir un rol como reservorios endógenos de [•]NO. Sin embargo, la mayoría de las propiedades biológicas descritas para nitroalquenos dependen de la modificación post-traducciona l de proteínas por nitroalquilación [27] (Tabla 1).

Tabla 1. Proteínas covalentemente modificadas por nitroalquenos

<i>Proteína modificada</i>	<i>Referencia</i>
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	Batthyany et al., J. Biol. Chem., 2006, Vol.281
PPAR-γ	Schopfer FJ. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2005, Vol. 102
Receptor tipo I de angiotensina II (AT ₁)	Zhang et al., Circ Res, 2010, Vol. 107
Factor nuclear kB (NFκB)	Cui et al., J Biol Chem, 2006, Vol. 281
Keap-1	Kansanen et al., J Biol Chem, 2011, Vol. 286
Proteína de desacoplamiento 2 (UCP-2)	Nadtochiy et al., Cardiovasc Res, 2009, Vol. 82
α-sinucleína (α-syn)	Souza et al. (datos sin publicar)

Si bien se conoce muy poco sobre los mecanismos de metabolización, transformación y degradación de nitroalquenos *in vivo*, se ha determinado que ingresan en la vía de la β -oxidación hepática [72], siendo el punto final de la degradación oxidativa el carbono al cual se encuentra unido el grupo $-\text{NO}_2$, siendo posible que compartan otras vías metabólicas de los de ácidos grasos no modificados.

2.2.3 Propiedades biológicas de los nitroalquenos

La nitración lipídica representa un nuevo mecanismo de señalización en la modulación de las respuestas celulares anti-inflamatorias y adaptativas [73]. Los nitroalquenos modulan el fenotipo inflamatorio de macrófagos y neutrófilos, regulan la actividad de factores de transcripción involucrados en diversos procesos celulares [60, 74-76], ejercen efectos cardioprotectores durante la injuria por isquemia reperusión o el preacondicionamiento isquémico en modelos de corazón aislado, y modulan la activación de las terminaciones nerviosas nociceptivas asociada al estrés nitro-oxidativo [37, 67, 77, 78]. Las propiedades descritas inicialmente en modelos *in vitro*, adquirieron gran potencial biológico cuando se demostró la síntesis endógena de nitrolípidos en condiciones normales y frente a estímulos pro-inflamatorios [33, 34, 37, 38, 67, 79-81].

La inflamación es una compleja respuesta del organismo a la penetración de un agente infeccioso o daño celular, con el fin remover el estímulo de la injuria así como iniciar el proceso necesario para sanar el tejido [82]. Es un proceso fisiológico crítico para el mantenimiento de la hemostasia, pero está también asociado al desarrollo de numerosas patologías como la aterosclerosis o el infarto de miocardio [83]. Los neutrófilos, monocitos/macrófagos, plaquetas y células endoteliales, responden a la estimulación por agonistas adoptando un fenotipo pro-inflamatorio que se caracteriza por *i*) la migración celular hacia el foco inflamatorio, *ii*) la exposición de proteínas de superficie (ej.: selectinas) que facilitan el reclutamiento de leucocitos hacia el sitio de inflamación por adhesión con plaquetas y células endoteliales, *iii*) la penetración de las células sanguíneas a través de las paredes vasculares [84, 85]. Secundariamente al cambio fenotípico, las células activadas liberan mediadores inflamatorios como las citoquinas, que regulan la respuesta inflamatoria. Algunos de las enzimas cuya expresión se induce en respuesta a la activación de genes inflamatorios son la PLA_2 , PGHS-2, NOS2, y las NADPH oxidasas (NOx). Finalmente, la resolución de la inflamación es necesaria para proteger a las células sanas de daño. La inflamación persistente o crónica induce un cambio progresivo en los tipos celulares presentes en el sitio de inflamación y el desarrollo de una serie de patologías relacionadas [82, 83].

Los nitroalquenos atenúan el cambio fenotípico de células inflamatorias por mecanismos independientes de la liberación de $\cdot\text{NO}$ [75, 76]. El NO_2LA , por ejemplo, inhibe la actividad de las células inflamatorias monocitos/macrófagos y de neutrófilos [38, 75, 76, 86]. Además, inhibe la activación de plaquetas por un mecanismo dependiente de cAMP, e inhibe la activación de células endoteliales [38, 75, 76, 86]. La activación de macrófagos

induce la síntesis endógena de nitrolípidos, que disminuyen la respuesta inflamatoria y facilitan la resolución de la inflamación [38]. Los nitroalquenos disminuyen la expresión de NOS2 y la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF α en respuesta a lipopolisacáridos (LPS) por mecanismos independientes de la formación de \cdot NO, la activación del receptor PPAR γ , o la inducción en la expresión de la enzima anti-oxidante hemo oxigenasa-1 (HO-1) [86]. También inhiben la adhesión de los monocitos al lecho endotelial [86], impidiendo la migración transendotelial hacia la íntima y su diferenciación hacia macrófagos mediante la inhibición de las moléculas de adhesión presentes en las células endoteliales activadas (ej.: P-selectina, E-selectina, molécula de adhesión intracelular-1, o VCAM-1) [86]. A modo de ejemplo, el derivado nitrado del AA impidió el ensamblaje de la NOx y la producción de radical O $_2^{\cdot-}$ en un modelo animal de inflamación [87]. Con respecto a los mecanismos de acción propuestos para estas actividades anti-inflamatorias, se postula que la modulación de las células pro-inflamatorias por nitroalquenos está mediada, al menos en parte, por la nitroalquilación de factores de transcripción nuclear. El NO $_2$ OA y NO $_2$ LA alquilan PPAR γ en un residuo de cisteína crítica [33], lo cual probablemente tiene consecuencias no solo en los procesos inflamatorios sino también en la regulación del balance energético y la adipogénesis [33, 69]. El factor de transcripción NF κ B tiene un rol importante en la regulación de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y proteínas de fase aguda. También es regulado negativamente por alquilación de residuos altamente conservados de cisteína en la subunidad p65 de unión a ADN [86]. El NO $_2$ LA induce la expresión de HO-1 [86, 88, 89], que también es blanco para otros lípidos bioactivos derivados del AA, como 15d-PGJ2 [90]. La HO-1 media eventos claves en las respuestas citoprotectoras desencadenadas durante la inflamación. La regulación de la expresión de HO-1 está mediada por elementos de la respuesta antioxidante (AREs) y es posible que los nitroalquenos induzcan la expresión en HO-1 por regulación de PPAR γ o NF κ B [89]. Los nitroalquenos también inhiben la señalización pro-inflamatoria mediada por STAT (transductor de señal y activador de la transcripción 3, factor de respuesta de fase aguda) mediante la inducción de MAP quinasa fosfatasa-1 (MAPK-1), una fosfatasa que contribuye a la resolución de la inflamación por alteración de la traducción del ARNm a proteínas [91]. La inducción de MAPK-1 por nitroalquenos es independiente de la activación de PPAR γ , la liberación de \cdot NO y del proceso de nitroalquilación, demostrando que existen mecanismos de acción de los nitroalquenos aún no identificados.

2.2.4 Potencial terapéutico de los nitroalquenos

Por todo lo antes expuesto, la nitración lipídica representa un mecanismo por el cual el \cdot NO y sus ERN derivadas traducen información inflamatoria y metabólica. Los nitrolípidos están presentes en la vasculatura [80] y se forman en condiciones inflamatorias [38] participando en la señalización redox adaptativa que promueve la resolución de la inflamación. Su hidrofobicidad e inestabilidad dificultan su cuantificación, pero se han detectado en el rango nanomolar de concentración, lo cual es suficiente para promover las acciones biológicas reportadas, incluyendo la inhibición de la actividad de plaquetas y

macrófagos [44]. Actualmente, uno de los principales intereses en el área es determinar si la suplementación exógena con nitroalquenos puede ser beneficiosa en el desarrollo de enfermedades inflamatorias. Luego de la extensiva demostración desde el año 2000 de las propiedades biológicas de nitrolípidos en modelos celulares, existen varios trabajos recientes donde se evalúa el efecto de nitroalquenos como moduladores farmacológicos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias en modelos animales [35, 37, 92]. La administración de NO₂OA subcutánea a ratones tratados con angiotensina II (Ang-II) disminuyó significativamente la presión sanguínea y la respuesta contráctil a Ang-II en arterias mesentéricas, por lo cual actualmente se evalúa el potencial farmacológico de NO₂OA como modulador de la hipertensión inducida por Ang-II [92]. En ratones C57/BL6 sometidos a un episodio de isquemia/reperfusión, la administración exógena de NO₂OA durante el episodio de isquemia tuvo efectos protectores, reduciendo el tamaño del infarto y preservando la función ventricular izquierda [35]. El mismo grupo de investigación evaluó la administración subcutánea de NO₂OA a ratones knock-out para apolipoproteína E que desarrollan aterosclerosis de forma precoz, y observaron una formación reducida de la lesión aterosclerótica cuando se administró el nitrolípido, revelando un potencial antiaterogénico para los nitroalquenos [87, 93].

Un aspecto muy importante en la determinación del potencial terapéutico de los nitrolípidos es que, si bien se han confirmado muchos roles protectores, aún no hay estudios que evalúen la toxicidad esperada por la administración de estos productos en el contexto de un tratamiento clínico. También es necesario un estudio farmacológico de los niveles efectivos alcanzados, la biodistribución de los nitroalquenos administrados, y las diferencias que existen entre las vías de administración (ej. oral versus subcutánea).

2.3 Prostaglandina G/H sintasa

2.3.1 Metabolismo del AA

El AA o ácido eicosatetraenoico es un AGPI con cuatro dobles enlaces oxidables (20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$) precursor de una gran familia de lípidos bioactivos. Su metabolismo está finamente regulado a nivel celular, donde se establece un balance entre su síntesis, transferencia entre fosfolípidos de membrana y desde las proteínas transportadoras, y liberación al citosol [94]. Se sintetiza a partir del ácido graso esencial linoleato (ω 6) en función del aporte de origen dietético, y su concentración celular influye en la función celular normal y el desarrollo de enfermedades [94-97]. Inclusive se ha planteado que una dieta pobre en AA disminuye la producción de eicosanoides pro-inflamatorios contribuyendo a la resolución de enfermedades crónicas [94].

El AA se libera hacia el citosol celular por acción de la PLA₂, en el paso limitante para su ingreso en diferentes vías de metabolización que concluyen en la síntesis de lípidos bioactivos (Figura 6) [73]. La metabolización del AA por la vía lipoxigenasa (LOX) se forman leucotrienos (LTs), lipoxinas, y ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) [94]. La vía PGHS

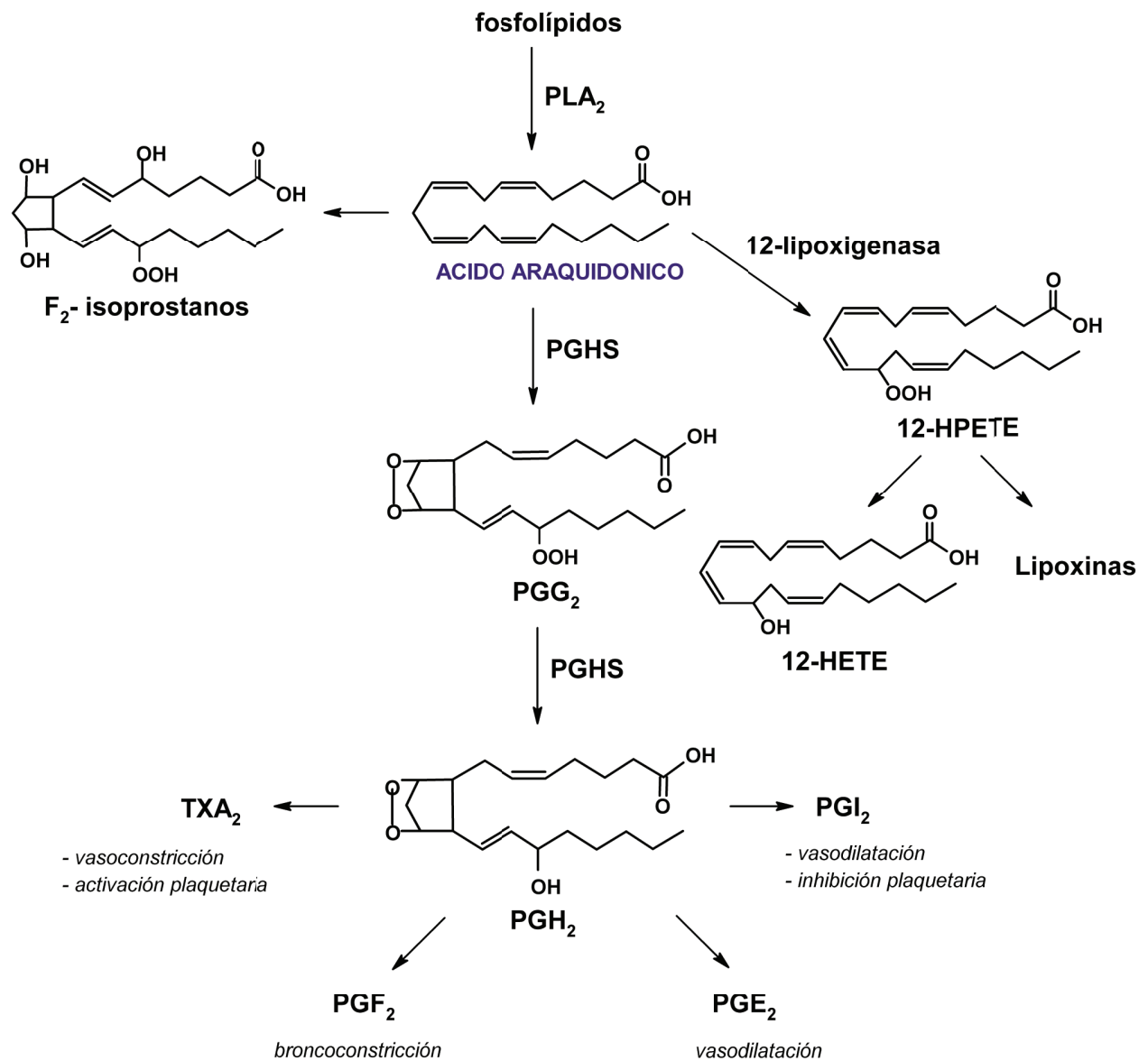


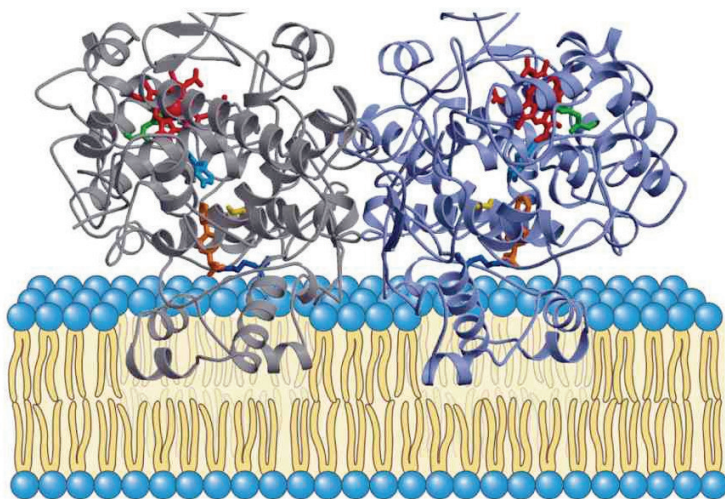
Figura 6. Metabolismo del ácido araquidónico. En respuesta a la estimulación de receptores de membrana, la hidrólisis de fosfolípidos libera AA desde las membranas hacia el citosol. El AA liberado es precursor de una variedad de lípidos bioactivos, incluyendo las prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y productos de la lipoxigenasa, involucrados en una gran cantidad de procesos fisiológicos relevantes durante la inflamación, estrés oxidativo y señalización celular.

cataliza el paso limitante en la síntesis de los prostanoides (prostaciclina, PGI₂, prostaglandina E₂, PGE₂, tromboxano A₂, TxA₂, etc) [98, 99]. En la vía de las enzimas P450 se oxida el AA a productos del ácido eicosatrienoico (EETs) [100]. Además de las vías enzimáticas, el AA es blanco de oxidaciones no enzimáticas por radicales libres para formar isoprostanos e isoleucotrienos [101, 102].

La producción de lípidos bioactivos derivados del AA en los sitios de inflamación está regulada por estímulos presentes en la respuesta inmunológica normal (IL-1, TNF-alfa,

lipopolisacáridos, etc.) y por respuestas del metabolismo basal. El destino metabólico que sigue el AA liberado al citosol es característico de cada tejido, y a menudo en tejidos diferentes un mismo precursor da origen a productos con función antagónica [99] (Figura 6). Uno de los ejemplos más claros es el “modelo del ying-yang” para el balance de los eicosanoides $\text{TxA}_2/\text{PGI}_2$ en el mantenimiento del tono vascular [103]. La actividad PGHS forma el producto prostaglandina H_2 (PGH_2), en el paso limitante en la síntesis de prostanoides. Las enzimas que catalizan la síntesis de los prostanoides a partir de PGH_2 se expresan diferencialmente en los tejidos: en plaquetas la TxA_2 sintasa cataliza la síntesis de TxA_2 , y en la vasculatura se expresa PGI_2 sintasa, que cataliza la formación de PGI_2 (Figura 6). El desbalance en la relación $\text{TxA}_2/\text{PGI}_2$ normal se encuentra en la base de varias enfermedades cardiovasculares [104]. TxA_2 y PGI_2 tienen efectos opuestos (vasoconstricción y vasodilatación, respectivamente), y en base a esto es difícil entender que la inhibición de PGHS tenga un efecto neto de protección vascular. La evidencia sugiere que al inhibirse PGHS los efectos antitrombóticos en plaquetas predominan sobre los efectos protrombóticos en la vasculatura [105], ya que el principal mediador del tono vascular es el $\cdot\text{NO}$, y la regulación por PGI_2 solo gana relevancia cuando los niveles de $\cdot\text{NO}$ están disminuidos [106]. Otro ejemplo de distribución característica de lípidos bioactivos en diferentes tejidos son los leucocitos y monocitos, que producen prostanoides (por la vía PGHS) y leucotrienos (por la vía LOX) a partir de AA, y los granulocitos, que producen fundamentalmente leucotrienos a partir de AA [94, 107, 108].

2.3.2 Estructura y función de PGHS. Mecanismo de acción



Estructura de PGHS. PGHS es un homo-dímero que se inserta permanentemente en la membrana celular de manera monotípica, orientándose hacia el lumen de retículo endoplásmico o la cara interna de las envolturas nucleares. Cada monómero une de manera no covalente un grupo hemo, y está constituido por un dominio de unión a membrana, un dominio EGF (epidermal growth factor), y un dominio catalítico (el más voluminoso).

La PGHS se encuentra en el inicio de la cascada metabólica que convierte al AA en prostaglandinas (PGs) [98], mediadores en la señalización celular con acción tipo hormonal que regulan una enorme variedad de procesos fisiológicos incluyendo la vasodilatación/vasoconstricción, la excreción de sodio y reabsorción de agua a nivel renal, el balance de la agregación plaquetaria, la respuesta inmunológica, la reproducción, y el ciclo sueño-vigilia. En vertebrados existen 2 isoformas de PGHS (1 y 2) con una elevada homología (60%) y un plegamiento idéntico, aunque están codificadas por dos genes con regulación independiente: la isoforma PGHS-1 se expresa constitutivamente en prácticamente todos los tejidos,

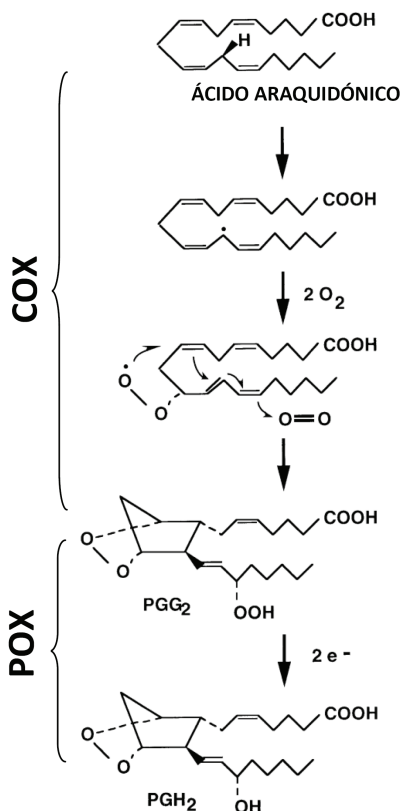


Figura 7. Reacciones COX y POX catalizadas por PGHS. La actividad COX cataliza la auto-oxidación controlada de AA, formando un radical araquidonilo, y su posterior dioxigenación al hidroperoxi-endoperóxido PGG₂. La actividad POX cataliza la reducción de PGG₂ al producto final, el hidroxi-endoperóxido PGH₂.

(Figura extraída de Smith *et al.*, Prostaglandins & other lipid mediators, 2002, Vol. 68)

consistente con un rol en el mantenimiento homeostático celular, y PGHS-2 se expresa basalmente en algunos tejidos, pero es fundamentalmente inducible en respuesta a la estimulación celular por agonistas [98]. PGHS-2 está muy vinculada al cáncer [109-111] y también a la síntesis de prostanoides en los sitios de inflamación en respuesta a IL-1, TNF-alfa, o lipopolisacáridos. También cumple funciones fisiológicas en el cerebro, los riñones y el sistema cardiovascular, sitios donde se expresa constitutivamente [98]. En cardiomiocitos, por ejemplo, produce PGI₂ con un rol protector frente a la injuria oxidativa [112].

PGHS es un homodímero localizado hacia el lado luminal de la membrana del retículo endoplásmico y envolturas nucleares, representando uno de los pocos ejemplos de proteínas insertadas en la membrana de forma monotípica. Cada subunidad (70 kDa) contiene un grupo hemo formado por Fe³⁺-protoporfirina IX (Fe³⁺-PPIX), crítico para la actividad [98, 113]. La enzima cataliza la oxidación radicalar y la posterior bis-oxigenación de AA, en un mecanismo que ha sido descrito como una "autooxidación radicalar controlada" debido a que se forman radicales araquidonilo (AA•) como intermediarios de la reacción, sufriendo la adición de moléculas de O₂ de manera estero- y regio-específica [98, 99, 114, 115]. Se trata de una enzima bifuncional: la bis-oxigenación del AA para formar PGG₂ está mediada por la actividad cicloxigenasa (COX), y la posterior reducción de PGG₂ a PGH₂ está mediada por la actividad peroxidasa (POX) (Figura 7). Las actividades POX y COX se llevan a cabo en dos sitios activos diferentes, comunicados funcionalmente entre sí. El sitio activo POX, que contiene al grupo hemo, se encuentra cercano a la superficie de la proteína y relativamente expuesto

al solvente (Figura 8). El sitio activo COX se localiza al fondo de un canal hidrofóbico que atraviesa el interior de la proteína desde el dominio de unión a membrana hasta el dominio catalítico, y es donde se lleva a cabo la dioxigenación del AA [116] (Figura 8).

Además de reducir a PGG₂, la actividad POX es necesaria para iniciar el ciclo catalítico de la enzima [117, 118]. La figura 9 muestra el mecanismo de acción detallado de PGHS y la interrelación entre las actividades POX y COX [99, 114, 115]. El grupo hemo en el sitio activo POX es oxidado por dos electrones para reducir el sustrato hidropéroxido a su alcohol

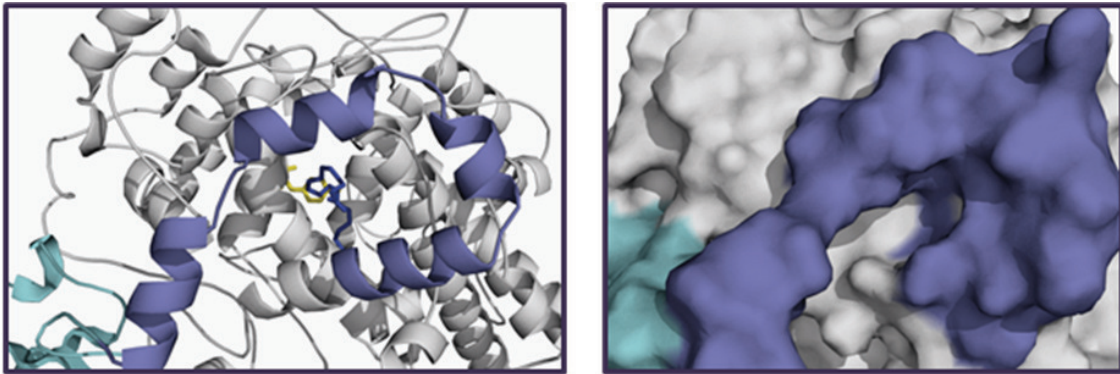
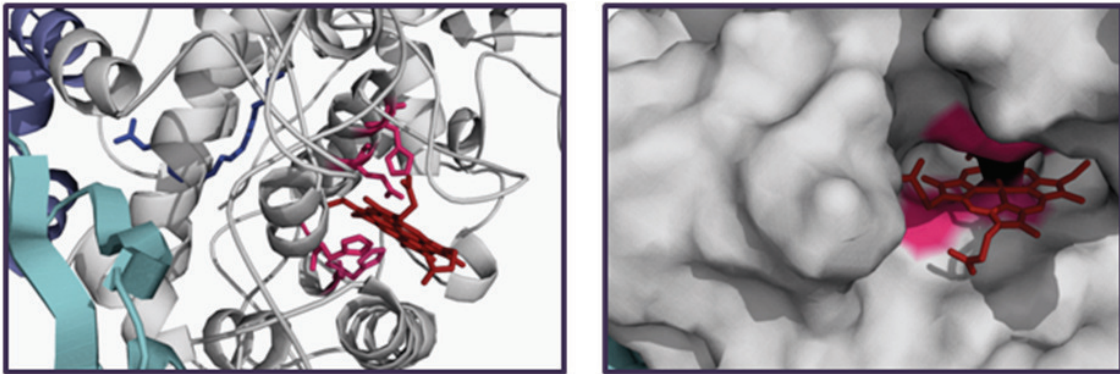
A**B**

Figura 8. Estructura de los sitios activos COX y POX. (A) La entrada al sitio activo COX comienza en la base del dominio de unión a membrana y continúa con un canal hidrofóbico que atraviesa el core de la proteína hasta el dominio catalítico. En la interfase entre los dominios catalítico y de unión a membrana existe un anillo o constricción que separa el “lobby” del sitio activo. La estructura de ambas isoformas de PGHS es muy similar, pero en PGHS-2 el cambio de los residuos Ile523 e His513 (en PGHS-1) a Val523 y Arg513 forma un bolsillo lateral hidrofóbico que aumenta el volumen del sitio activo COX en PGHS-2. (B) Opuesto al sitio COX en el dominio catalítico se encuentra el sitio activo POX, que yace en la base de una hendidura con una considerable porción del hemo expuesta al solvente. El ligando proximal al hemo es His388, que se encuentra unido por enlace de hidrógeno a His386. 5Å por encima del hemo se encuentra His207. Los tres residuos de His son necesarios para estabilizar la unión del hemo y son críticos para la actividad. Al igual que en otras peroxidasas, no hay un ligando proteico distal al hemo.

Las histidinas críticas se señalan en rosado, el hemo se señala en rojo, las hélices de entrada al sitio COX se señalan en violeta, el AA unido al sitio COX se señala en azul, el residuo crítico Tyr385 se señala en amarillo (PDB 1DIY).

correspondiente, formando un catión radical oxiferrilo derivado del hemo (compuesto I). A continuación, el compuesto I es reducido por un electrón proveniente del residuo tirosina (Tyr) crítico Tyr385, produciendo un radical tirosilo en la posición 385 y un compuesto oxiferrilo derivado del hemo (intermediario II). Finalmente, el radical tirosilo abstrae un hidrógeno del AA unido productivamente al sitio activo COX dando comienzo al ciclo de oxigenación e isomerización que se muestra en la figura 7. La actividad POX es inespecífica y puede reducir una variedad de hidroperóxidos. Una vez formado el primer radical tirosilo al

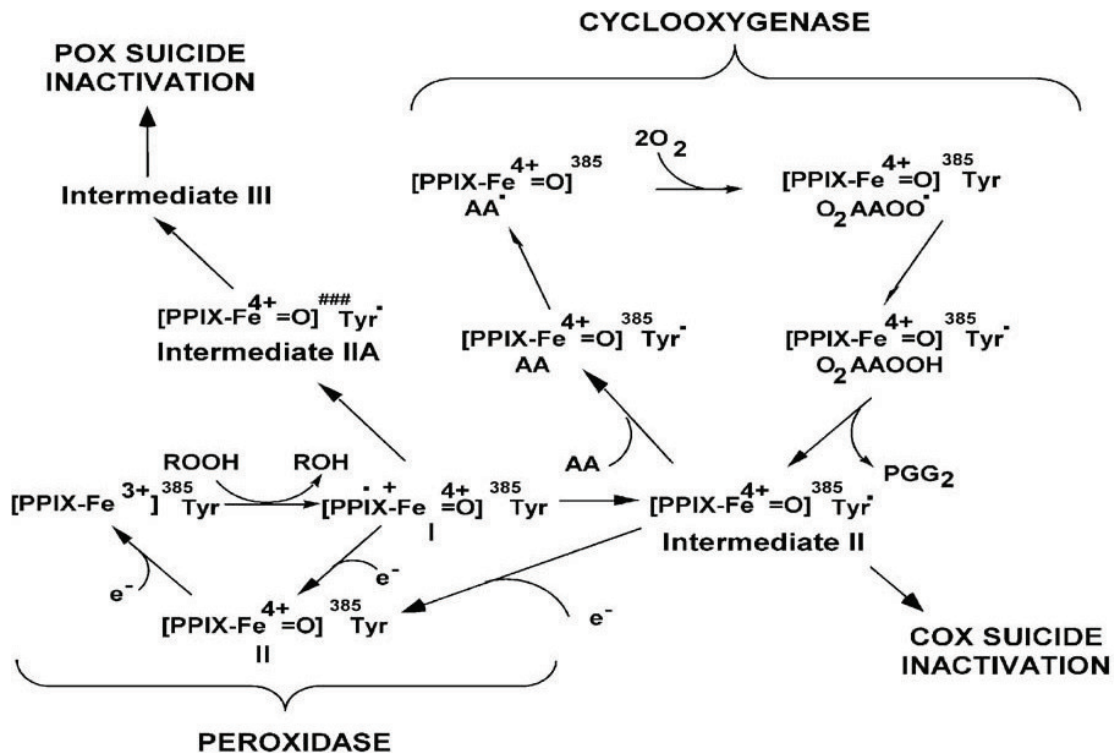


Figura 9. Mecanismo de acción de PGHS: actividades POX y COX. El mecanismo básico de la actividad POX consiste en la reducción de un hidroperóxido por el hemo en descanso para formar el alcohol correspondiente y compuesto I (radical catión oxiferrilo). Dos reducciones consecutivas del compuesto I por un electrón regeneran el hemo en descanso. El primer paso catalizado por la actividad COX en cada ciclo catalítico requiere la oxidación inicial del grupo hemo para formar el compuesto I, reducido a intermediario II (oxiferrilo del hemo) por el residuo crítico Tyr385 que se oxida a radical tirosilo. El radical tirosilo cataliza la abstracción de hidrógeno desde el AA, regenerando tirosina y formando el radical araquidonilo que comienza el ciclo de oxigenaciones y ciclaciones para formar PGG₂. Durante el resto del ciclo catalítico, las actividades ya no están acopladas y pueden funcionar de manera independiente.

(Figura extraída de Smith *et al.*, Prostaglandins & other lipid mediators, 2002, Vol. 68)

inicio del ciclo catalítico, otros hidroperóxidos presentes en el medio, particularmente el intermediario de reacción PGG₂, permiten que el ciclo COX continúe autocatalíticamente independientemente de la actividad POX [99, 116]. Esto quiere decir que el compuesto oxiferrilo derivado de hemo (intermediario II / compuesto II) puede ser reducido por 1 electrón proveniente de un co-sustrato reductor para regenerar el hemo en descanso (Fe³⁺-PPIX) (Figura 9) mientras el ciclo COX continúa formando AA• como intermediario de reacción y PGG₂ como producto final de reacción [114, 115].

El sitio activo COX es altamente específico para AA. El paso limitante en la bis-oxigenación de AA por PGHS es la abstracción de un átomo de hidrógeno bis-alílico en la posición C13 del AA para generar un radical pentadienil-araquidónico (Figuras 7 y 9). La elevada regioespecificidad de la abstracción de hidrógeno parece deberse a la orientación del AA unido al sitio activo COX. El AA adopta una forma de "L", con el C13 ocupando el

vértice de la “L” y estableciendo la mínima distancia posible con el residuo crítico de Tyr385. El AA[•], que inicialmente tiene el electrón desapareado centrado en el C13, se isomeriza a un radical centrado en el C11 (y en mucha menor medida centrado en C13 o C15). La adición de la primer molécula de O₂ forma el producto intermediario 11(R)-LOO[•], que se reorganiza formando un endoperóxido entre el C11 y el C9, que cicla dos veces consecutivas para dar un endoperóxido cíclico con un radical centrado en el C15 y en el C13. Una segunda molécula de O₂ es adicionada al C15, formando un endoperóxido dioxigenado con un radical peroxilo en la posición 15; el mismo abstrae un átomo de hidrógeno del residuo Tyr385 regenerando el radical tirosilo y formando la PGG₂. La PGG₂ se transporta hacia el sitio activo POX por un proceso aún desconocido donde es reducida al producto final, PGH₂ (Figura 9) [98, 116]. También se ha observado la formación de productos minoritarios diferentes al PGG₂ (11R-HETE, 15S-HETE y 15R-HETE, productos normales de la enzima lipoxigenasa), debido a que la adición de ambas moléculas de O₂ se puede dar en ocasiones en sitios diferentes al C11 y C15 [119].

Además de catalizar la formación del primer intermediario AA[•] en el ciclo catalítico, y de reducir los intermediarios de reacción PGG₂ al producto final PGH₂, la actividad POX parece ser la responsable de la “inactivación suicida” tan característica de PGHS [98]. El seguimiento cinético de la reacción entre PGHS y un sustrato peroxidásico (ej.: H₂O₂) muestra un período *lag* inicial, una fase rápida de reacción, y una caída gradual de la pendiente hasta que la actividad se vuelve nula. Lo mismo se observa al seguir la reacción por oximetría en presencia de AA. Esta rápida auto-inactivación (a tiempo 1-2 minutos de reacción) ocurre independientemente de la concentración o naturaleza del sustrato. Aparentemente depende de la formación descontrolada de radicales aminoácidos que producen una enzima inactiva, y probablemente representa un mecanismo regulatorio para limitar la cantidad de PG sintetizada *in vivo* [99].

Para ambas isoformas de PGHS la velocidad de recambio de la actividad COX es de ~3500 moles de AA por minuto por mol de dímero enzimático [120], y la constante de Michaelis-Menten (K_M) para el AA es de ~5 μM [121], igual que para el O₂ [122]. El sitio activo COX es significativamente más grande en la isoforma PGHS-2 debido a la sustitución de un residuo de valina por uno de isoleucina en la posición 253, lo cual abre en PGHS-2 el acceso a un bolsillo hidrofóbico inaccesible en PGHS-1. Esta diferencia estructural explica la diferencia en especificidades del sitio COX: PGHS-1 es altamente específica para AA, mientras que PGHS-2 también acepta como sustrato COX al 2-araquidonil-glicerol (2-AG) para formar el producto 2-PGG₂-glicerol. 2-AG es un canabinoide endógeno que media señales anti-inflamatorias a través de los receptores canabinoides, y señales pro-inflamatorias a través de los metabolitos formados por acción de PGHS-2 [123-125].

2.3.3 Interacción de PGHS con especies reactivas de nitrógeno

El $\cdot\text{NO}$ y las ERN modulan la actividad PGHS *in vivo* [126, 127], pero existe una discrepancia en la literatura respecto al efecto de esta modulación, donde se ha reportado que el $\cdot\text{NO}$ inhibe [128, 129] y activa a PGHS [101, 130-134]. El $\cdot\text{NO}$ podría inhibir a la enzima formando un complejo hierro-nitrosilo [128, 135, 136]. También se ha propuesto la reacción del $\cdot\text{NO}$ con el radical tirosilo crítico para la actividad enzimática [129]. La reacción de $\cdot\text{NO}$ con los radicales intermediarios de la reacción COX podría formar nuevos compuestos nitrogenados que cortan el ciclo catalítico de la enzima [135, 136]. El rol del peroxinitrito está mejor determinado. A flujos bajos activa a PGHS ya que oxida por dos electrones al hemo dando lugar a la formación de compuesto I y NO_2^- [128, 137]. A concentraciones más elevadas, el peroxinitrito inactiva a la enzima en paralelo con la formación de 3-nitro tirosina [138].

2.3.4 Farmacología de PGHS

Durante años se utilizaron compuestos originalmente derivados de plantas para aliviar los síntomas asociados con enfermedades inflamatorias y para calmar el dolor (todos contenían salicilatos), pero no fue hasta 1971 que J.R. Vane asoció los efectos anti-inflamatorios de AINES con la inhibición de PGHS [139]. Al trabajo original de Vane siguió un explosivo desarrollo y crecimiento del área, acompañado por miles de trabajos publicados. Debido al uso tan expandido de los AINES, la regulación de PGHS tiene una enorme relevancia farmacológica. El canal de ingreso al sitio activo COX desde la superficie de la enzima (el "lobby"), tiene un anillo o constricción formada por tres residuos (Arg120, Tyr355 y Glu524) que debe expandirse para permitir el ingreso de moléculas al fondo del canal, donde se une el AA. La mayoría de los AINES interaccionan de manera no covalente con los residuos que conforman el anillo, bloqueando la entrada del AA de manera competitiva [98, 140]. Una excepción a este mecanismo general es el ácido acetilsalicílico (AAS), que inactiva a PGHS por unión covalente al residuo Ser530, que aparentemente juega un rol importante en el control de la estereoespecificidad de la oxigenación en el C15 de AA durante la formación de PGG_2 [141].

En 1991 se descubrió la existencia de una isoforma inducible de PGHS, denominada PGHS-2, a la que se adjudica un rol fundamentalmente pro-inflamatorio [142]. Surgió en la siguiente década un renovado interés por el desarrollo de inhibidores PGHS, buscando generar drogas selectivas para PGHS-2 que conserven las propiedades analgésicas de los AINES (asociada a la inhibición de PGHS-2) sin presentar toxicidad gástrica (asociada a la inhibición de PGHS-1, que cumple roles protectores en la mucosa). Para el desarrollo de drogas selectivas se aprovecha la diferencia estructural que existe entre los sitios COX de ambas isoformas [140, 142, 143]. La hipótesis de inhibición selectiva de PGHS-2 fue validada en modelos animales y en pruebas clínicas con humanos, confirmando una toxicidad gastrointestinal reducida. En el año 1999, ya se encontraba disponible en el mercado la primera generación de inhibidores selectivos de PGHS-2 (celecoxib y rofecoxib). A pesar de que mostraron una prevención moderada en el desarrollo de adenocarcinomas, la administración crónica de inhibidores selectivos de PGHS-2 se correlacionó con un aumento

en la incidencia de eventos cardiovasculares, por lo que fueron retirados del mercado norteamericano en el año 2005 [144]. Desde entonces a la actualidad la hipótesis de PGHS-2, desarrollada con tanto entusiasmo en la década de 1990, ha sido muy cuestionada. El papel de PGHS-2 en múltiples enfermedades y en la patogénesis de la inflamación se encuentra cada vez mejor caracterizado, pero hoy también sabemos que PGHS-2 cumple roles fisiológicos en varios tejidos, por lo cual a pesar de seguir siendo un blanco farmacológico de interés, su modulación farmacológica sin efectos adversos representa un desafío.

Las plaquetas representan uno de los blancos farmacológicos de AINES más importantes [145]. Las plaquetas son células sanguíneas circulantes que normalmente no interactúan con la pared vascular. Cuando aparece una injuria en el endotelio, da inicio una rápida y compleja interacción entre las plaquetas y las estructuras sub-endorreliales expuestas. Esta interacción está mediada por receptores celulares presentes en la superficie de plaquetas y células endoreliales y por proteínas adhesivas como el fibrinógeno o el factor de von Willebrand (vWF), resultando en la adhesión de las plaquetas a la pared vascular y la agregación de las plaquetas entre sí. Esta función fisiológica constituye la primer línea de defensa contra el sangrado, pero también contribuye a la formación patológica de trombos cuando hay un aumento del factor tisular y de proteínas reactivas de fase aguda como el fibrinógeno [146, 147]. La inhibición de PGHS-1 en plaquetas es la base molecular de la cardioprotección que brinda la administración crónica de bajas dosis de AAS, ya que el TxA₂ contribuye a los episodios trombóticos agudos así como a los eventos pro-aterogénicos de tipo crónico [148, 149]. El TxA₂ es un agonista débil que amplifica las señales de activación de otros agonistas y no es crítico para la activación plaquetaria, ya que es necesario inhibir el 95% de la formación de TxA₂ para ver una influencia *in vivo* [150]. Igualmente, la administración crónica de AAS disminuye la activación plaquetaria debido a un efecto acumulativo: la Ser530 está irreversiblemente modificada por AAS y las plaquetas no pueden expresar nueva proteína ya que son anucleadas [150].

La trombina expuesta en una lesión endoreliial induce la adhesión y agregación plaquetaria en un proceso no afectado por el AAS [105, 151]. Esto se conoce como el fenómeno de “resistencia al AAS” y se presenta en algunos pacientes de manera aparentemente aleatoria, atribuible a diversas causas. En algunos casos se ha logrado revertir la resistencia a AAS aumentando la dosis, pero la incertidumbre que este fenómeno produce en el tratamiento de enfermedades pro-trombóticas promueven el creciente interés por nuevas drogas antiplaquetarias más eficientes, que no presenten resistencia en los pacientes, y que además no interfieran con la hemostasia primaria (se evidencia por el aumento en el tiempo de sangría) [149].

2.4 Antecedentes a este trabajo de investigación

La nitración de AA a NO₂AA otorga a este ácido graso efectos anti-inflamatorios que han sido demostrados por nuestro grupo. Entre ellos se encuentran la inhibición de la expresión de NOS2 a través de mecanismos dependientes de PPAR-γ e independientes de •NO, la inducción de la expresión de la enzima HO-1, la inhibición en la activación del NFκB, la capacidad de liberar •NO con efectos vasorelajantes, y la regulación negativa del perfil inflamatorio en macrófagos [20, 27, 38, 71, 87, 152]. Trostchansky *et al.* reportaron en el año 2007 [153] que existe una interacción entre las especies reactivas •NO y peroxinitrito con PGHS, y plantearon que en condiciones de estrés nitro-oxidativo podría ser posible la nitración de AA catalizada por la actividad COX de la enzima. En este contexto comienza este trabajo de investigación en el año 2008 con el objetivo de evaluar si hay un efecto de NO₂AA sobre la actividad PGHS y si es posible la síntesis catalítica del nitroalqueno por acción de la enzima.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto de NO₂AA sobre el metabolismo normal del AA *in vitro* y en células, con énfasis en la vía enzimática de PGHS, y explorar potenciales vías de regulación que involucren la producción *in vivo* de NO₂AA.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Mejorar los procedimientos de síntesis y purificación de NO₂AA y de los isómeros nitrados del AA, realizando cambios en el protocolo que permitan aumentar el rendimiento de formación de NO₂AA y aplicando métodos de separación preparativos.
- 2) Caracterizar la interacción de NO₂AA con las enzimas PGHS-1 y PGHS-2, determinando si existe un efecto sobre la actividad enzimática capaz de modular la formación del producto de reacción, que es sustrato para la posterior síntesis de eicosanoides.
- 3) Estudiar los efectos de NO₂AA sobre el metabolismo del AA en un modelo celular, evaluando los efectos del nitroalqueno sobre la actividad PGHS, la síntesis de eicosanoides, y la interacción con otros blancos.
- 4) Evaluar si es posible formar productos nitrogenados derivados de AA por acción catalítica de PGHS en presencia de especies reactivas de nitrógeno, aplicando una variedad de metodologías al estudio de la interacción de PGHS con peroxinitrito, NO₂⁻ y [•]NO durante el recambio enzimático.

4. METODOLOGÍA

4.1 Síntesis de NO₂AA

Optimización del rendimiento de síntesis

Para aumentar el rendimiento de síntesis de NO₂AA modificamos una técnica previamente descrita para la nitración de AGIs por NO₂⁻ en medio ácido [60, 71, 154, 155]. El AA (150 mg, Nu-Check Prep, Elysian, MN) se incubó con NaNO₂ (Sigma Chemicals, relación n:n 1:1) en un vial de vidrio con hexano (4 mL) a temperatura ambiente. La solución se barboteó con argón por 15 minutos para disminuir la tensión de O₂ y se selló con un septo de goma. Se inició la reacción por adición de 10 µL H₂SO₄ concentrado y se incubó 30 minutos bajo agitación antes de agregar nuevamente NaNO₂ y H₂SO₄. A los 30 minutos se detuvo la reacción por adición de acetato de etilo (v/v 1:1) y NaCl saturado (mezcla:NaCl v/v 1:2). La fase hidrofílica se lavó al menos una vez con acetato de etilo y el volumen obtenido se secó con Na₂SO₄ anhidro (0.5 gr) y se evaporó en ambiente de N₂ hasta obtener un aceite amarillento. La mezcla obtenida (aceite) se analizó por TLC (cromatografía en capa fina) analítica (Analtech) utilizando hexano:dietiléter:acético (80:20:0.1) como fase móvil y anisaldehído como revelador, o por espectrometría de masa (MS). Todos los solventes utilizados son calidad HPLC.

Purificación a gran escala

Para la purificación a gran escala de NO₂AA a partir de la mezcla de reacción empaquetamos una columna de vidrio de 26 x 5 cm con sílica y la equilibramos en hexano. La alta capacidad de la columna permitió sembrar en una única vez el aceite obtenido a partir de diez síntesis. Tras la siembra del aceite, la fase estacionaria fue lavada con hexano (30 mL) y a continuación pasamos por goteo la fase móvil, hexano:dietiléter (80:20, 150 mL; y 70:30 para las fracciones siguientes). Analizamos todas las fracciones colectadas (de 7 mL cada una) por TLC analítica. Las fracciones con NO₂AA puro fueron evaporadas en ambiente de N₂, resuspendidas en metanol, y analizadas y cuantificadas por LC-MS/MS [71].

Análisis y cuantificación

Los estudios de MS se realizaron con un triple cuadrupolo equipado con trampa de iones (QTRAP 2000, Applied Biosystems/MDS SCIEX) (Figura 10A), con una fuente de ionización por electrospray a presión atmosférica (ESI-MS). Para la identificación de NO₂AA y el análisis de la mezcla de reacción utilizamos los siguientes modos de escaneo: *i*) Q1 scan: en este modo se analizan las relaciones masa/carga (*m/z*) de todos los productos presentes en la solución en el rango de *m/z* seleccionado; *ii*) enhanced product ion scan (EPI): este modo se utiliza para aumentar la sensibilidad y generar un patrón característico de

fragmentación; se selecciona el ion a analizar en Q1 y se fragmenta en Q2 mediante disociación activada por colisión (CAD). Los iones hijos resultantes se atrapan y acumulan en la trampa de iones (Q3) y luego se liberan para su detección; *iii*) multiple reaction monitoring (MRM) scan: este modo permite escanear una o más transiciones de iones con alta sensibilidad para su cuantificación. En este modo se selecciona uno o más iones parentales en Q1 y se selecciona en Q3 la m/z específica del fragmento hijo seleccionado [156]. Las muestras ingresaron al analizador como eluato de un HPLC acoplado al espectrómetro (MRM), o se inyectaron directamente en la fuente a un flujo de 10 μ L/min (Q1, EPI). La cuantificación de NO₂AA se realizó por LC MS/MS en modo MRM buscando la transición m/z 348/301, característica de la pérdida neutra del grupo -NO₂, o 348/46, que proporciona mayor sensibilidad. Siempre se verificó que no hubiera contaminación con AA (m/z 303/259) ni con otras especies derivadas de la reacción en medio ácido, como pueden ser especies di-nitradas, u oxidadas. La curva de calibración se construyó para cada cuantificación con AA (estándar externo) y AAd8 (estándar interno) obtenidos de Cayman Chemicals [71].

Purificación de isómeros posicionales

De acuerdo a reportes previos de nuestro laboratorio [71], la nitración de AA genera una mezcla de isómeros posicionales que pueden ser separados por HPLC; basados en este reporte pretendimos escalar de forma preparativa la purificación de cada isómero. Utilizamos para ello una columna C18 semi-preparativa (5 μ m, 10mm x 25cm, Ultrasphere ODS, Beckman Coulter Chromatography) con un sistema gradiente entre A (agua/ácido fórmico 0.05%) y B (acetonitrilo/ácido fórmico 0.05 %) en las siguientes condiciones: 35 % B (0 a 10 min), 100 % B (10 a 35 min), 35 % B (35 a 45 min) [71] a un flujo de 2 mL/min. Inyectamos hasta 1 mg de NO₂AA puro por corrida y las bandas con máximo de absorbancia a 274 nm fueron colectadas a la salida del HPLC en hexano/isopropanol/ácido acético para realizar una extracción lipídica por hexano. Identificamos los isómeros presentes en cada banda colectada por Q1 scan operando en el modo de ionización positivo en presencia de acetato de litio 5 mM. En presencia de litio, se bloquea una carga positiva en el grupo carboxilo del nitroalqueno lo que favorece la fragmentación de la molécula a través del enlace insaturado C-C donde se encuentra el grupo -NO₂, generando fragmentos de m/z característica para cada isómero posicional posible [71].

4.2 Modulación de PGHS por NO₂AA

Para realizar los experimentos que se detallan a continuación se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂), N,N,N',N'-tetrametil-fenilenediamina (TMPD), base TRIZMA, fosfato de sodio, y fenol de Sigma Chemicals; PGE₂d4 de Cayman Chemicals. Los

nitroalquenos NO₂OA y NO₂LA son una donación del Dr. Bruce Freeman (University of Pittsburgh, USA).

Purificación de PGHS

PGHS-1 fue purificada como apoenzima (aPGHS-1) a partir de vesículas seminales de oveja [157] y PGHS-2 recombinante de origen murino se expresó por recombinación homóloga en un sistema de células de insecto sf9 [158]. La concentración de la enzima fue determinada por el método del ácido bicinconínico (BCA) y por espectrofotometría ($\epsilon_{280} = 95,580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Ambas enzimas fueron donadas por el Dr. L.J. Marnett (University of Vanderbilt, USA). La mutagénesis dirigida de PGHS-2 para generar mutantes en el sitio activo COX (R120A, Y355F o S530A) y POX (H207A, H388F, H386A) se realizó en el marco de una pasantía de investigación en el laboratorio del Dr. Marnett, de acuerdo a métodos publicados [159, 160].

Actividad enzimática

aPGHS-1 y 2 se reconstituyeron con 1.5 equivalentes de hemo (Fe^{3+} -PPIX) por 30 minutos a 4 °C previo a cada ensayo ($\epsilon_{411} = 123 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [98]. Estudiamos la actividad POX por espectrofotometría (Shimadzu UV240U) utilizando el ensayo del N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamina (TMPD) a 25 °C en un amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4 ($\epsilon_{611} = 12 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [98]. Las mezclas de reacción de 400 μL contenían PGHS-1 (20 nM) o 2 (25 nM), TMPD (250 μM) y H₂O₂ (300 μM), a menos que se especifique diferente. En todos los casos determinamos la oxidación no enzimática del TMPD. La actividad POX se expresa como mol TMPDox/min de reacción/mg de proteína y corresponde a medidas de velocidad inicial. La actividad COX se estudió por oximetría y la actividad total por LC MS/MS. El consumo de O₂ se evaluó utilizando un oxímetro (OROBOROS O2k) a 37 °C en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4. La mezcla de reacción de 2 mL contenía PGHS-1 (25 nM) o 2 (100 nM), fenol (500 μM) y AA (15 μM), a menos que se especifique diferente. La actividad se expresa como mol O₂ consumido/min de reacción/mg de proteína y corresponde a medidas de velocidad inicial. La formación del producto de decaimiento por hidrólisis de la reacción (PGE₂, m/z 351/271) se cuantificó por LC MS/MS (Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra, o QTRAP 2000, Applied Biosystems/MDS SCIEX) como índice de actividad enzimática total en el modo de ionización negativo utilizando PGE₂*d4* (con cuatro átomos de deuterio) como estandar interno (m/z 355/275). Las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4, y contenían PGHS-2 (25 nM) y AA (5 μM) en un volumen de 200 μL . Se detuvieron a los 30 segundos por extracción con acetato de etilo suplementado con PGE₂*d4* (300 pmol), y las fases hidrofóbicas se secaron (Labconco) y reconstituyeron en metanol 50% para su análisis por LC MS/MS. Para resolver el PGE₂ formado, utilizamos una columna C18 (5cm x 1mm, 5 μ) con un sistema de elución compuesto por un gradiente de acetonitrilo

en agua (5% a 95% en 6 min) a un flujo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para las mutantes de PGHS-2 con actividad reducida o parcialmente inactivadas ajustamos las concentraciones de sustrato y enzima o el tiempo de reacción hasta obtener una actividad de al menos 5% respecto a la proteína nativa. La mutante en His388 no tuvo actividad POX detectable.

Inhibición de la actividad

Los inhibidores se agregaron en metanol a las mezclas de reacción (inferior a 1% v/v) junto con el sustrato o se preincubaron con PGHS por tiempos variables. Para establecer si el NO_2AA compite con el AA por el sitio activo COX, la actividad se determinó por oximetría a concentración de sustrato saturante (150 μM), cercano al K_M (15 μM), o intermedia (30 μM y 70 μM), con NO_2AA hasta 110 μM . Para determinar el modelo cinético de inhibición las isoformas PGHS-1 o 2 se preincubaron con una concentración fija de NO_2AA (0.2 a 10 μM) por tiempos de preincubación crecientes (0 a 300 seg), y se determinó la actividad POX. Obtuvimos relaciones de actividad enzimática vs. tiempo de preincubación que ajustamos a una exponencial de orden 1 para obtener los valores de k_{obs} . Para determinar la reversibilidad de la inhibición incubamos apo- y holo- PGHS-1 y 2 (3.5 μM) con NO_2AA (1 mM) o indometacina (1 mM) por 10 minutos, filtramos las muestras por ultracentrifugación (Micro Bio-Spin), reconstituimos con 1.5 equivalentes de hemo, y determinamos las actividades POX y COX. Para hPGHS también determinamos la actividad enzimática previo al filtrado. Para descartar un rol de NO_2AA como co-sustrato reductor de PGHS, la enzima (25 nM) se preincubó con vehículo (metanol) o NO_2AA (5 y 20 μM), y se inició la reacción con 15-HpETE (20 μM) en presencia u ausencia de fenol (500 μM). A los cinco minutos se determinó la reducción de 15-HpETE por el ensayo de FOX, que se basa en la oxidación de iones ferroso a férrico catalizada por hidroperóxidos en condiciones ácidas, en presencia del indicador de ión férrico naranja de xilenol [161, 162].

Cambios en el hemo

Evaluamos el efecto de NO_2AA sobre el ambiente del hemo de varias maneras. *i)* La eficiencia de unión de hemo a aPGHS tratada con NO_2AA o indometacina se estudió por espectrofotometría a 411 nm. La muestra fue filtrada (Micro Bio-Spin) para eliminar el exceso de inhibidor previo a la adición del hemo y la eficiencia de unión se expresó como $\text{Abs}_{280}/\text{Abs}_{411}$. En todos los casos se consideró la dilución de la proteína por el filtrado. *ii)* Titulamos aPGHS (2 μM) preincubada por 10 minutos con vehículo o con NO_2AA (10 y 35 μM) con alícuotas de hemo (0.2 μM) y registramos cada vez la Abs_{411} . *iii)* Cuantificamos el hemo presente en holoPGHS (hPGHS) tratada con vehículo o NO_2AA por el ensayo de piridina hemocromo [163]. hPGHS (5 μM) se incubó con NO_2AA (50 μM) por 10 minutos, se filtró para remover inhibidor y hemo en exceso, y se agregó a 70 μL de muestra: 2 μL de KOH 5 M, 30 μL de piridina, y ditionito suficiente para reducir hemicromos a hemocromos

de piridina. A los dos minutos registramos el espectro en el visible que tuvo un máximo de absorbancia a 556 nm. Construimos una curva de calibración (Abs_{556} vs [hemo]) utilizando un estándar de hemo (0 a 20 μ M) y determinamos el valor $\epsilon_{556}=34.53 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. iv) Estudiamos los cambios espectrales (350 a 550 nm) de Fe^{2+} -PPIX-PGHS (15.6 μ M) en presencia de NO_2AA (150 μ M). Fe^{2+} -PPIX-PGHS se obtuvo por reducción con ditionito. El amortiguador fue extensamente degaseado en argón, y la cuvetta se selló con un septo de goma para enlentecer la re-oxidación del hemo ferroso a férrico durante el registro de los espectros (60 minutos). El hemo ferroso unido a PGHS tuvo un máximo de absorbancia a 428 nm, y el hemo ferroso libre tuvo un máximo de absorbancia a 412 nm. v) Evaluamos la modificación de hemo libre por NO_2AA (10x) por MS (en Q1) y por el método de piridina hemocromo.

Proteólisis por tripsina

Apo- o holo- PGHS-1 (2 μ M) se incubó a 25 °C por cinco minutos en tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con NO_2AA (400 μ M) o indometacina (500 μ M). Incubamos la proteína con tripsina (3.1 μ M) a 25 °C y detuvimos la reacción a los 30 segundos por incubación con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (1.5 mM) durante cinco minutos a 4 °C [164]. Desnaturalizamos alícuotas de PGHS-1 (2 μ M) calentando tres minutos a 95 °C en buffer de la muestra con SDS y corrimos las muestras por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%. La tinción se realizó con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Análisis proteómico

Para el análisis por MALDI-TOF (Bruker Daltonics Autoflex MALDI/TOF Proteomics Analyzer) apo y holo PGHS-2 (entera) se preincubó en amortiguador tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con NO_2AA (10X) por hasta 4 horas. Para desalar las muestras evaluamos diferentes protocolos obteniendo señal proteica cuando intercambiamos el amortiguador por 0.1% TFA/10% acetonitrilo. Analizamos muestras nativas y desnaturalizadas con tris-2-carboxietilfosfina (TCEP). La matriz utilizada fue ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) (20 mg/mL) con ácido sinapínico (20 mg/mL). Para el análisis por LC MS/MS de PGHS proteolizada utilizamos un equipo Thermo LTQ (Thermo Electron, San Jose, CA) equipado con una fuente de micro-electrospray. El gradiente de solventes empleado fue agua/0.1% ácido fórmico y acetonitrilo/0.1% ácido fórmico, en una columna capilar de sílica (100 μ m x 11 cm) empaquetada con C18 o C4 (Phenomenex, Torrance, CA). Las muestras (apo y holo PGHS-2 tratadas con vehículo o NO_2AA) se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA), se redujeron con TCEP, y se alquilaron y digirieron con tripsina o quimotripsina, a pH 7.0 o 9.0. También se analizaron muestras que no fueron reducidas/alquiladas. Evaluamos la nitroalquilación peptídica por análisis de los datos con Scaffold Proteome Software.

Estos experimentos se realizaron en el laboratorio Caprioli y en el centro de

espectrometría de masa de la Universidad de Vanderbilt, USA, en el marco de una pasantía de investigación en el laboratorio del Dr. L.J. Marnett.

Docking molecular

Ensayamos computacionalmente la capacidad de AA y varios nitroalquenos (9-NO₂OA, y 9-, 12-, 14- y 15-NO₂AA) de unirse a PGHS-2, utilizando SurflexDock [165] [166] [167], contenido en el paquete de modelado molecular Sybyl18.1 [168]. Previo al docking, todos los compuestos se optimizaron *in vacuo* considerando el efecto de las moléculas de agua, como se ha reportado antes [169]. El docking de los nitroalquenos se realizó en los sitios activos COX y POX de PGHS-2 (PDB 3HS5). Utilizando este cristal como complejo de referencia, se generó un protomol, una representación computacional del potencial sitio de unión a donde los ligandos putativos son alineados. La construcción se basó en residuos proteicos presentes en los sitios COX y POX de PGHS-2. El protomol de SurflexDock utiliza fragmentos CH₄, C=O y NH para dirigir la interacción inicial de los ligandos durante el proceso de docking. El docking de cada ligando putativo brindó hasta 20 orientaciones posibles, que se expresan con un índice de afinidad, -log₁₀ (Kd). El método SurflexDock permitió seleccionar la orientación con mayor afinidad a partir de múltiples posibilidades para un ligando.

4.3 Impacto de NO₂AA sobre plaquetas humanas

En los experimentos que se detallan a continuación se utilizaron los siguientes reactivos de Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI): 12-HETEd₈, AAd₈, una mezcla de eicosanoides para LC-MS (PGD₂, PGE₂, 6k-PGF_{1α}, PGF_{2α} y TxB₂), e indometacina. Los reactivos PMA, trombina de plasma bovino, 12-(2-Cianoetil)-6,7,12,13-terahidro-13-metil-5-oxo-5H-indol[2,3-a]pirrolo[3,4-c]carbazole (gö 6976), GF109203X (GF10), y 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ), y el anticuerpo anti- α -tubulina son de Sigma-Aldrich. El 2-(4-carboxifenilo)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido (carboxiPTIO) fue comprado en Dojindo Laboratories (Japan). Los anticuerpos anti-PKC y anti-P-selectina son de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos anti-Erk1/2 (donación del Dr. José Boggia) y anti-pErk1/2 son de Cell Signaling Technology. Los anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos del infrarrojo son de Li-Cor Biosciences. El indicador de Ca²⁺ Fluo-3 AM (donación de la Dra. Florencia Irigoien) es de Molecular Probes. Todos los solventes utilizados fueron calidad HPLC. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes, utilizando plaquetas purificadas de diferentes donantes. Los valores se expresan como el error estándar de la media \pm SEM (n=3). Para comparar varios grupos realizamos el análisis de varianza ANOVA

con el método de Student-Newman-Keuls (S-N-K) para varianzas homogéneas. La diferencia de medias se consideró significativa a $p < 0.05$.

Purificación de plaquetas lavadas

Las plaquetas se aislaron de plasma fresco de voluntarios sanos libre de AAS por al menos dos semanas. La sangre entera (25 a 50 mL) se colectó por punción venosa utilizando una solución de acetato-citrato-glucosa (ACD) como anticoagulante (sangre:ACD, 1:1,9 v/v), siguiendo un protocolo aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina, Universidad de la República (Exp. N° 071140-000258-12). El plasma rico en plaquetas se obtuvo por centrifugación de la sangre entera a 250g por 10 minutos a temperatura ambiente. Las plaquetas se purificaron del plasma en una segunda centrifugación a 900g por 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet obtenido se lavó a 800g por 10 minutos a temperatura ambiente, en 2 mL de solución Tyrode`s (134 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 2.9 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 1.0 MgCl₂, 10 mM Hepes, 5 mM glucosa, pH 7.4) con ACD (Tyrode`s:ACD 9:1 v/v). Las plaquetas lavadas obtenidas se contaron con una cámara de Neubauer y se utilizaron en las cinco horas siguientes. Fue crítico evitar movimientos bruscos de las muestras y cambios en la temperatura a lo largo de todo el procedimiento, para evitar la agregación no deseada de las plaquetas. Para confirmar un efecto de NO₂AA independiente de PGHS-1, el plasma rico en plaquetas se incubó por 10 minutos con AAS (100 µM) y luego se continuó la purificación como se detalla arriba.

Incorporación de NO₂AA

Para determinar la fracción efectiva de NO₂AA que ingresa a las plaquetas en suspensión (o permanece en la membrana) luego de dos minutos de preincubación en solución Tyrode`s a 37 °C bajo agitación suave, incubamos 300 pmol de NO₂AA con 4x10⁸ plaquetas/mL, y bajamos las plaquetas por centrifugación (15,000g, 30 segundos) a diferentes tiempos (0 a 2 minutos), separamos el sobrenadante, agregamos AAd8 como estándar interno y realizamos una extracción orgánica con acetato de etilo. Cuantificamos el NO₂AA en el sobrenadante a diferentes tiempos de preincubación por LC MS/MS.

Formación de productos derivados de AA

Estudiamos por MS el destino metabólico de AA en plaquetas activadas. Plaquetas lavadas (2x10⁸/mL) fueron activadas con trombina (0.2 U/mL) en presencia de Ca²⁺ (1 mM) y metanol o NO₂AA (2 min), en solución Tyrode`s a 37°C bajo agitación suave. A los 30 minutos, agregamos 12-HETEd8 (30 ng) a las muestras y realizamos una extracción lipídica con hexano. Para separar los lípidos en la mezcla obtenida utilizamos una columna cromatográfica C18 ODS (5 µm, 150 x 4.6 mm, Waters Ltd.) con un sistema gradiente compuesto por A=H₂O/acetonitrilo/acético (75:25:0.1 v/v) y B=metanol/acetonitrilo/acético

(60:40:0.1 v/v), que alcanzó 90% de B (desde 50%) en 40 minutos a un flujo de 0.5 mL/min. Los productos se analizaron por MRM operando en el modo de ionización negativo (Applied Biosystems Q-Trap 2000), considerando las siguientes transiciones: m/z 319/179 (15-HETE), m/z 369/169 (TxB₂) and m/z 327/184.1 (12-HETE-*d8*) [170].

Agregación

La agregación plaquetaria se estudió por transmitancia de luz a 700 nm a través de cubetas de plástico de 2 mL de volumen, a 37 °C y bajo agitación continua (espectrofotómetro Varian-Cary UV-vis). Las plaquetas (1×10^8 /mL) se diluyeron a 2 mL en solución Tyrode's y evaluamos la agregación inducida por trombina (0.02, 0.05, o 0.5 U/mL), PMA (100 nM), AA (50 μM), o ADP (38 μM). Las plaquetas en Tyrode's se preincubaron por dos minutos con Ca²⁺ (1 mM) , y por un minuto con inhibidor o vehículo, antes de agregar el agonista. La incubación con ODQ (4 μM) se efectuó por 20 minutos, y la incubación con carboxiPTIO (1 mM) por 10 minutos. La oxi-hemoglobina (oxiHb) se purificó de sangre fresca [171], determinando espectrofotométricamente un estado redox de al menos 98% reducida, y se agregó (50 μM) simultáneamente con el NO₂AA. Para descartar la modulación de trombina por NO₂AA, preincubamos trombina (0.05 U/mL) con NO₂AA (1 μM) y *i*) agregamos la mezcla a una suspensión de plaquetas (1×10^8 /mL), o *ii*) agregamos la suspensión de plaquetas a la mezcla trombina-NO₂AA. Posteriormente registramos la agregación plaquetaria.

Degranulación y movilización de Ca²⁺

Estudiamos la exposición de P-selectina en la cara externa de la membrana plaquetaria y el aumento en la concentración intracelular de Ca²⁺ por citometría de flujo (BD FACSCalibur). Para evaluar los efectos de NO₂AA sobre la degranulación, preincubamos plaquetas lavadas (1×10^6 /mL) en solución Tyrode's con Ca²⁺ (1 mM) por dos minutos antes de la adición de trombina (0.05 o 0.5 U/mL). Los inhibidores se agregaron a la suspensión de plaquetas un minuto antes del agonista. A los 15 minutos agregamos el anticuerpo de ratón anti-P-selectina humana conjugado a fluoresceína tiocianato (FITC, $\lambda_{exc}=495$ nm y $\lambda_{em}=521$ nm), e incubamos a 4 °C por 30 minutos. Como control isotópico utilizamos IgG1κ de ratón conjugado a FITC. Lavamos y fijamos las muestras con formaldehído 1.25% en PBS frío. Para evaluar si el NO₂AA afecta la movilización intracelular de Ca²⁺ cargamos plaquetas lavadas (1×10^8 /mL) con la sonda fluorescente de unión a Ca²⁺ Fluo-3/AM (3 μM) [172] por incubación a 37°C por 30 minutos. A continuación lavamos las plaquetas (800g, 10 minutos a 22 °C) y las resuspendimos en Tyrode's:ACD (9:1 v/v) a una concentración de 1×10^8 /mL. Para cada condición registramos un cinético de la fluorescencia basal del Fluo-3/AM en la suspensión de plaquetas durante 10 segundos, interrumpimos brevemente el aspirado de las muestras por el citómetro para agregar la trombina (0.05, 0.2 o 0.5 U/mL) y resumimos

el registro, obteniendo histogramas cada 5 segundos durante 2 minutos. El vehículo o inhibidor se agregó 1 minuto antes que la trombina. Los resultados se expresan como porcentaje de la población definida como M1.

Translocación de proteína quinasa C (PKC)

Evaluamos la translocación a membrana de α PKC por inmunofluorescencia y microscopía confocal [173]. Plaquetas lavadas (4×10^8 /mL) a 37 °C en solución Tyrode's con Ca^{2+} (1 mM, 2 min) fueron activadas con trombina (0.05 U/mL) en presencia de metanol o NO_2AA (10 μM , 1 min). A los tres minutos, la suspensión de plaquetas se centrifugó a 10,000 g por 30 seg y se fijó con 2% formaldehído-PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Lavamos las plaquetas fijadas con PBS y permeabilizamos con 0.5% Tween20-PBS con 1% BSA. Incubamos 12 horas a 4 °C con los anticuerpos primarios de conejo (anti- α PKC) y de ratón (anti- α -tubulina) (dilución 1/100). A continuación, resuspendimos las muestras en 0.5% Tween-20-PBS e incubamos por una hora con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y ratón conjugados a Alexa488 y R-ficoeritrina, respectivamente (dilución 1/500). Finalmente, montamos las muestras en placas y obtuvimos las imágenes con un microscopio Zeiss LSM510 (disponible en la unidad de biología celular del Institut Pasteur, Montevideo) utilizando un objetivo de inmersión X60.

Fosforilación de Erk2 por inmunoensayo

Para los estudios de fosforilación preincubamos plaquetas (1.8×10^8 /mL) en solución Tyrode's con Ca^{2+} (1 mM, 2 min) y activamos con trombina (0.5 U/mL). Dosis menores de trombina no inducen la fosforilación de Erk2 *in vitro* [174, 175]. Los inhibidores (10 μM) se agregaron un minuto previo a la trombina. Las plaquetas tratadas fueron lisadas a los 90 y 180 segundos con amortiguador desnaturante (con SDS) a 95°C por cinco minutos, y corrimos las muestras por electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida 12%. Transferimos a membrana de nitrocelulosa, bloqueamos en PBS con 5% BSA/0.1% Tween-20 por una hora, e incubamos con los anti-cuerpos primarios anti-Erk1/2 (dilución 1/500) y anti-pErk1/2 (dilución 1/1000) por 12 horas a 4 °C. Lavamos extensivamente con Tween-20 0.1% en PBS, e incubamos la membrana con los anticuerpos secundarios cabra anti-ratón IR Dye680 y cabra anti-conejo IR Dye800 (dilución 1/15,000) por 30 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes fueron obtenidas utilizando escáner infrarojo (Odyssey Infrared Imaging System, de Li-Cor, Lincoln, NE). Se determinó el cociente pErk1/2 sobre Erk1/2 mediante análisis en el programa ImageJ (NIH, USA).

4.4 Impacto de NO_2AA sobre la actividad PGHS-2 en macrófagos

Utilizamos una línea de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC-TIB-67, USA) mantenida por pasaje en DMEM con L-glutamina (4 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 mg/mL) y suplementada con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor. Los

macrófagos fueron plaqueados e incubados a 37°C en una atmósfera de 5 % CO₂ [87]. Para evaluar la actividad POX dependiente de AA, activamos a J774A.1 en placas multipocillo (1x10⁶ cél/pocillo) con LPS (8 mg/mL) por 16 o 20 horas, en presencia de NO₂AA o indometacina (1 mM). Homogeneizamos las células y realizamos el ensayo fluorimétrico de amplex red [176] (Invitrogen-Molecular Probes, CA, USA) para determinar la actividad PGHS-2. El ensayo se basa en el desarrollo de color en el homogenato de macrófagos acoplado a la conversión de PGG₂ a PGH₂ en presencia de *i*) amplex red (50 μM, 30 minutos), que actúa como sustrato peroxidásico y se oxida formando el fluoróforo resorufina (λ_{ex}=560nm, λ_{em}=585nm), y *ii*) AA exógeno (100 μM), que permite determinar la actividad de peroxidasas cuyo sustrato es AA. Determinamos el impacto de NO₂AA sobre la expresión de PGHS-2 por inmunocitoquímica en macrófagos J774A.1 estimulados con LPS/INFγ (18 horas) en presencia o ausencia de NO₂AA (10 μM) y AA (10 μM) utilizando un anticuerpo contra PGHS-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc). La tinción nuclear se realizó con DAPI.

4.5 Nitración catalítica de AA

Para los estudios de la nitración enzimática del AA se utilizó peroxinitrito sintetizado a partir de NaNO₂ y H₂O₂ en un atrapador de flujo detenido [30]. El H₂O₂ residual se eliminó con MnO₂ y el NO₂⁻ remanente fue menor a 20%. La concentración de peroxinitrito se determinó espectrofotométricamente (ε₃₀₂=1.67 mM⁻¹cm⁻¹). Las soluciones, en NaOH 10%, permanecieron estables durante el tiempo de los experimentos. Para disminuir la tensión de O₂ se barboteó extensivamente el amortiguador (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4) con argón, se selló con un septo de goma, y se utilizó de inmediato. De lo contrario utilizamos amortiguador equilibrado en aire. Las mezclas de reacción de 120 μL contenían PGHS-1 o 2 (2 μM), AA (500 μM) y fenol (500 μM) en concentraciones variables. El vehículo (NaOH 10%) o peroxinitrito se administró en flujos de 0.1 a 1 μM/min inmediatamente después de la adición de AA. A tiempos variables (30 segundos a 3 minutos) la reacción se detuvo por extracción orgánica con acetato de etilo y se analizaron los productos lipídicos por TLC analítica, HPLC y MS. Estudiamos la capacidad de PGHS-2 de oxidar NO₂⁻ a [•]NO₂ por la actividad POX de la enzima [177] incubando PGHS-2 (2 μM) con AA (50 μM) en un amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4, suplementado con NaNO₂ (1 a 100 μM). La reacción transcurrió a temperatura ambiente bajo agitación. Transcurrido 1 o 5 minutos detuvimos la reacción con *i*) buffer de la muestra, para determinar la presencia de 3-nitrotirosina por inmunoensayo, o *ii*) acetato de etilo, para evaluar la formación de lípidos nitrados por MS y TLC analítica. Para el inmunoensayo por Western Blot corrimos la muestra por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, transferimos a membrana de nitrocelulosa, bloqueamos con leche en polvo (5% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente, incubamos con los anticuerpos primarios anti-PGHS-2 y policlonal de conejo anti-3-nitrotirosina desarrollado en nuestro laboratorio [178] en 5% leche / 0.1% Tween-20 en PBS durante 8 horas a 4 °C, lavamos en Tween-20 0.1% en PBS, e incubamos por 30 minutos con los anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón IR Dye680 y anti-conejo IR Dye800 (dilución 1/15,000). Las imágenes fueron obtenidas como previamente. La

formación de productos nitrogenados derivados de AA durante la reacción de PGHS en presencia de $\cdot\text{NO}$ se realizó en colaboración con el Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, USA. El sistema de reacción estuvo constituido por PGHS (5000 U/ml), α -(4-Piridil-1-oxido)-*N-tert*-butilnitrona POBN (100 mM, spin trap), y hemina (50 μM) en amortiguador Tris-HCl, pH 8.0. PGHS se preincubó por 5 min con hemina a 37°C y 600 rpm, y la reacción se inició por adición del agente reductor hidroquinona (5 mM) junto a AA (2 mM). La reacción se detuvo a los 30 min con acetonitrilo, y se realizó el análisis por offline electron spin resonance (ESR) acoplado a LC/MS. Para evaluar el efecto de NO_2AA o $\cdot\text{NO}$ en la oxidación de AA catalizada por PGHS, se introdujo el dador de $\cdot\text{NO}$ NOC 12 (1 mM) o NO_2AA (10 - 100 μM) a la mezcla de reacción.

4.6 Extracciones orgánicas

Bligh and Dyer

Consiste en el agregado de 2.2 volúmenes de metanol por volumen de muestra seguido de agitación. En el caso de estar trabajando con sílica (ej.: purificación de NO_2AA por TLC preparativa), se agrega primero una parte de agua y a continuación se deja reposar con el metanol por 5 minutos. Luego se agrega 1 volumen de diclorometano y se agita vigorosamente hasta obtener una sola fase. Si no se obtiene una sola fase, se agregan pequeños volúmenes de metanol hasta obtenerla. En caso de ser necesario, en este momento se agrega una cantidad conocida de estándar interno. Finalmente se rompe la monofase con el agregado de 1 volumen de H_2O y luego otro de diclorometano, siempre seguido de agitación vigorosa. Se centrifuga a 800 rpm por 10 minutos y se separa la fase orgánica (la inferior). En el caso de trabajar con sílica, hay que asegurarse que la sílica quede entre las dos fases o en el fondo del tubo.

Hexano

Los lípidos se extraen con una mezcla de hexano/isopropanol/acético 1M (30:20:2 v/v) en una relación muestra:solvente de 1:2.5 (v/v). Si es necesario, se agrega el estándar interno en una cantidad conocida y se agita vigorosamente. Se agregan 2.5 partes de hexano y se centrifuga durante cinco minutos a 1,500 rpm, para facilitar la separación de las fases. Se toma la fase hexano (la superior) y la fase acuosa se vuelve a lavar con 2.5 partes de hexano. La muestra se evapora y resuspende en el solvente seleccionado.

Acetato de etilo

Se utilizó para preparar muestras para análisis por MS. Consiste en agregar a la muestra 1 parte (v/v) de acetato de etilo frío con ácido acético 0.1 % y el estándar interno en cantidad conocida. Se separan las fases por agitación vigorosa y se toma la fase orgánica (la superior), se evapora y se resuspende en el solvente seleccionado.

Cuando estudiamos la incorporación de NO_2AA a plaquetas, la extracción por acetato de etilo resultó un 80% más eficiente en la recuperación del nitroalqueno desde el sobrenadante, comparado con la extracción por hexano.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Síntesis de NO₂AA

La síntesis de NO₂AA fue puesta a punto en nuestro laboratorio por el Dr. Andrés Trostchansky [71]. Se realiza por incubación de AA con nitrito de sodio (NaNO₂) en condiciones ácidas, que favorecen la formación de [•]NO₂ [33, 60, 154]. Obtenemos una mezcla relativamente compleja de productos: derivados isomerizados (trans-AA es el principal producto de la reacción), oxidados, y/o nitro-alquenos, nitro-alcanos, di-nitro alquenos/alcanos, y nitro-hidroxi derivados [154, 155]. El NO₂AA se purifica a partir de la extracción lipídica de la mezcla por TLC preparativa, y se analiza y cuantifica por LC MS/MS [71] utilizando un espectrómetro de masa triple cuadrupolo con trampa de iones equipado con una fuente de ionización por electrospray a presión atmosférica (QTRAP 2000, Applied Biosystems/MDS SCIEX) (Figura 10A). El AA se concentra y resuelve por LC y tiene un patrón de fragmentación característico que permite confirmar su identidad en el modo MRM (multiple reaction monitoring) siguiendo la pérdida neutra del grupo -NO₂ (*m/z* 348/301; *m/z* 348/46) (Figura 10B). Para la cuantificación construimos curvas de calibración como se muestra en la figura 10C.

5.1.1 Optimización del rendimiento de reacción

La síntesis ácida de NO₂AA tal como se detalla en [71] tiene un rendimiento de formación de producto menor al 10%, de la cual se obtienen aproximadamente 0.5 mg de NO₂AA a partir de 75 mg iniciales de AA. Uno de los objetivos de este trabajo fue optimizar las condiciones de trabajo para aumentar el rendimiento de formación de NO₂AA. Tal como se discutió en la introducción, el [•]NO₂ es un iniciador importante de la oxidación lipídica, y la prevalencia de las reacciones de nitrógenación por sobre las de oxidación de los radicales lipídicos formados depende principalmente de la concentración de O₂ en el medio de reacción [155, 179]. En este sentido el primer cambio en el protocolo de síntesis fue disminuir la tensión de O₂ en el medio de reacción. Para ello barboteamos la mezcla de AA y NO₂⁻ extensamente con Argón, y la sellamos con un septo de goma previo a la adición del ácido. También evaluamos el efecto del escalado (x2, x3 y x4), del solvente de reacción utilizado (hexano vs. acetonitrilo), y del ácido empleado (ácido clorhídrico concentrado vs. ácido sulfúrico concentrado). Cuando escalamos al doble (el volumen 2x, moles de reactivos 2x, y tiempo de reacción 2x) y utilizamos H₂SO₄ concentrado como ácido, logramos aumentar 5 veces la eficiencia de nitración de AA (Figura 11). Además, pusimos a punto una cromatografía en columna utilizando sílica como fase estacionaria para la purificación de

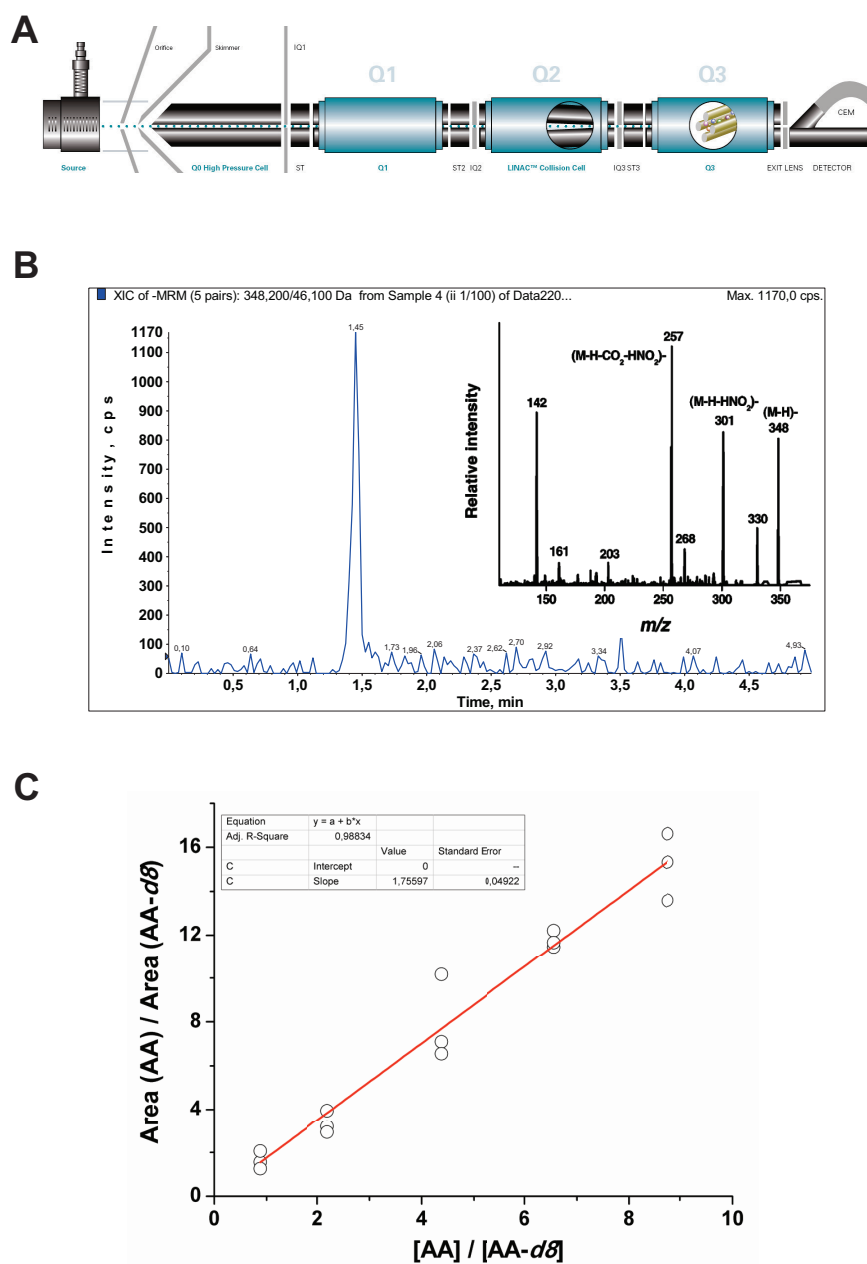


Figura 10. Análisis por MS de NO₂AA. (A) El control de pureza así como la cuantificación del NO₂AA se realizan por ESI-MS y LC-ESI-MS/MS utilizando un QTRAP2000. **(B)** El NO₂AA se detecta por LC MS/MS en el modo de ionización negativo por MRM siguiendo la pérdida neutra del grupo nitro (m/z 348/301). Inserto: para confirmar la identidad del producto se analiza en el modo EPI (enhanced product ion) seleccionando el ión parental (m/z 348) para obtener el patrón de fragmentación característico de NO₂AA, donde siempre están presentes los fragmentos m/z 301 y 257. **(C)** El producto puro se cuantifica utilizando AAd8 (m/z 311/267) como estándar interno y AA como estándar externo (m/z 303/259). Para construir la curva de calibración, se fija la concentración de estándar interno y se utilizan concentraciones crecientes de AA. Se grafica la relación de áreas para las transiciones adecuadas en función de la relación de concentración correspondiente, y se intrapolan las áreas obtenidas para el NO₂AA (m/z 348/301).

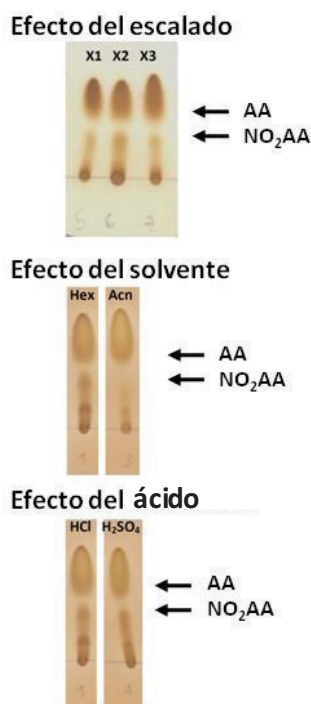


Figura 11. Optimización del rendimiento de síntesis de NO₂AA. El NO₂AA se sintetiza a partir de AA en hexano con NO₂⁻ en medio ácido. Se forman una serie de productos oxidados y nitrados, de donde se purifica posteriormente el NO₂AA por TLC o cromatografía en columna. Para aumentar el rendimiento de la reacción evaluamos por TLC analítica el efecto de: el escalado (x1, x2 y x3), el solvente de reacción (hexano vs. acetonitrilo), y el ácido utilizado (HCl 6N vs. ácido sulfúrico concentrado).

NO₂AA. Las dimensiones de la columna utilizada (26 x 3 cm) permiten una gran siembra de producto de reacción (hasta 1 g aproximadamente), por lo cual fue conveniente realizar y juntar varias síntesis en paralelo con las condiciones optimizadas. El uso de la columna permitió purificar todo el producto obtenido en una sola instancia y de manera muy económica respecto al uso de TLC preparativa. Por otra parte, estamos poniendo a punto la nitración de AA por nitroselenación, un método que ha sido reportado previamente en la síntesis de nitroalquenos, y que presenta la ventaja de obtener un isómero específico con un alto rendimiento [80]. Los experimentos a cargo de la Dra. Virginia López han permitido sintetizar una mezcla del isómero nitroalqueno 6-NO₂AA y del nitroalcano 5-NO₂AA.

Con los cambios introducidos en el protocolo de síntesis de NO₂AA aumentamos el rendimiento 5 veces y obtuvimos aproximadamente 200 mg de NO₂AA (versus los 0.5mg obtenidos con el protocolo anterior).

5.1.2 Análisis y purificación de isómeros posicionales de NO₂AA

El NO₂AA obtenido a partir de la purificación de la mezcla de reacción está constituido por una mezcla de isómeros posicionales, donde el grupo -NO₂ puede unirse a diferentes centros insaturados. Reportamos previamente la separación por RP-HPLC de 3 picos, donde se resuelven 2 isómeros (9- y 14- NO₂AA), mientras que los dos restantes co-eluyen (12- y 15- NO₂AA) [71], en un método que es bueno desde el punto de vista analítico pero muy ineficaz para la purificación y concentración de isómeros. Por tanto nos planteamos como objetivo analizar y purificar la mezcla isomérica obtenida a partir del nuevo protocolo de síntesis en medio ácido.

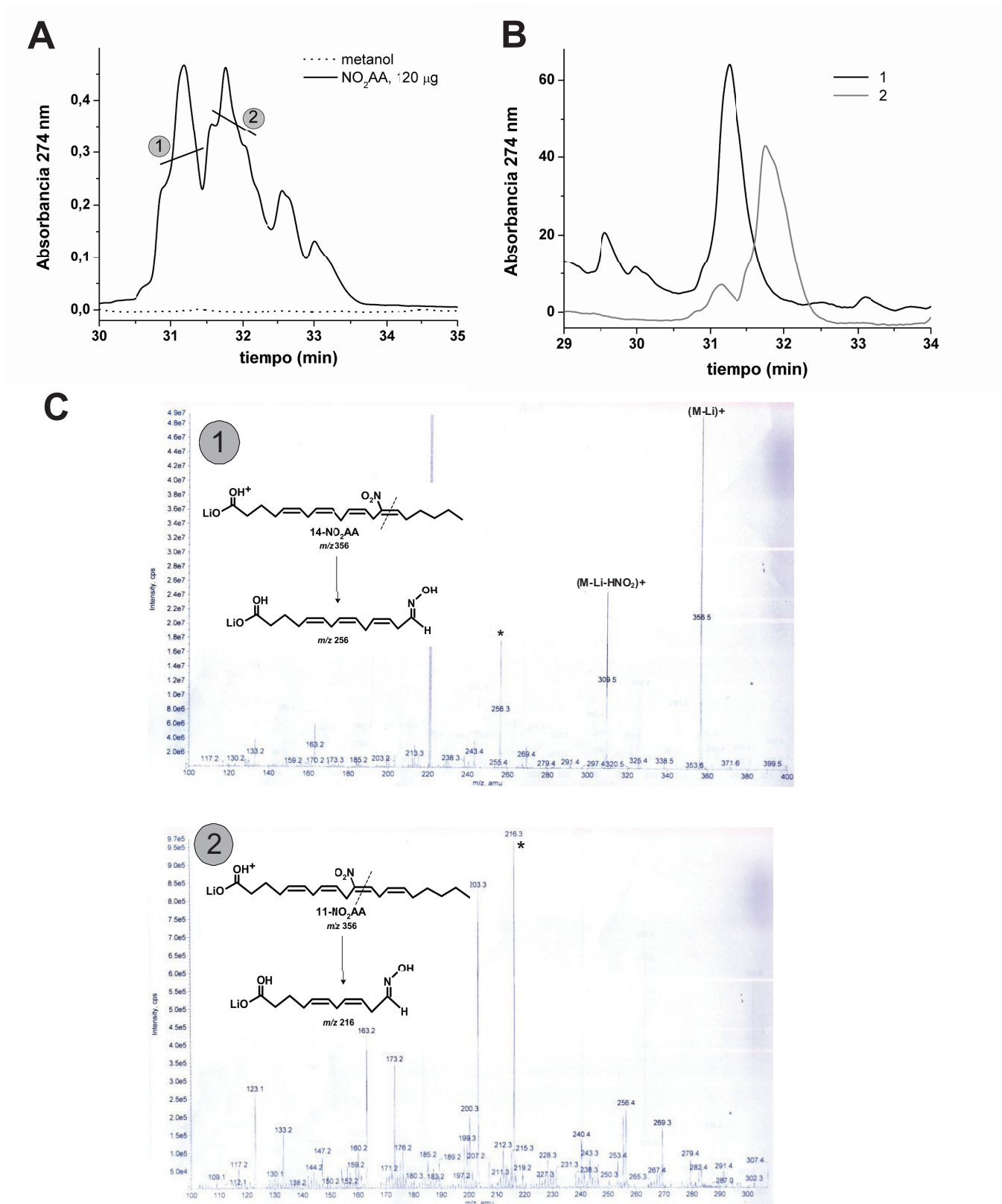


Figura 12. Análisis y purificación de isómeros posicionales de NO₂AA. (A) Los isómeros posicionales de NO₂AA se resuelven parcialmente por HPLC con detección en el UV (274 nm). Para su purificación se colectaron las bandas 1 y 2 y se extrajeron en hexano:isopropanol:acético (30:20:2). (B) Las muestras se reinyectaron en las mismas condiciones para confirmar la pureza. (C) Confirmamos la identidad de las muestras y determinamos la posición del grupo -NO₂ por estudios de MS/MS con Li²⁺ en el modo de ionización positiva.

El análisis de NO₂AA por HPLC en fase reversa (RP-HPLC) con detección a 274 nm permitió distinguir cuatro picos parcialmente resueltos, no presentes en el blanco de metanol (Figura 12A). Colectamos los picos a la salida del HPLC realizando una extracción con hexano, como se describe en la sección experimental. Cuando los picos colectados fueron re-inyectados observamos que sólo pudimos aislar a las especies 1 y 2 (Figura 12B), mientras que los otros picos no pudieron resolverse. Para identificar los isómeros presentes analizamos las muestras por MS fragmentando con litio, que bloquea la carga positiva en el extremo carboxilo y determina que los iones se fragmenten a través del doble enlace donde se encuentra el grupo -NO₂, siendo fácil predecir la *m/z* para los diferentes fragmentos esperados de acuerdo a las posiciones que puede adoptar el -NO₂ en la cadena [71]. Las especies 1 y 2 correspondieron a los isómeros 11- y 14-NO₂AA, respectivamente (Figura 12C) (la composición de la mezcla entera de NO₂AA fue de 6, 8, 9, 11 y 14-NO₂AA). Tras el análisis analítico de la mezcla isomérica, purificamos los isómeros 11 y 14-NO₂AA utilizando una columna C18 semi-preparativa, como se detalla en la metodología.

A pesar de haber perdido mucha muestra durante las etapas de la purificación de los isómeros (inyección, dilución en la columna, colección a la salida de la columna en solventes para la extracción orgánica, evaporación, etc) obtuvimos 2,8 mg de 11-NO₂AA y 4,6 mg de 14-NO₂AA puros. Contar con isómeros posicionales de NO₂AA en estado puro es fundamental para evaluar si los efectos biológicos descritos para el NO₂AA son característicos de un isómero en particular.

5.2 Modulación de la enzima PGHS por NO₂AA

El AA es el precursor, por vías enzimáticas y no enzimáticas, de una variada familia de lípidos bioactivos de gran importancia fisiológica como las PGs, tromboxanos, leucotrienos o mediadores de estrés oxidativo como los F₂-isoprostanos (Figura 6). Cuando se nitra, el AA adquiere una serie de actividades biológicas que lo posicionan como un potencial modulador redox *in vivo*. Los nitroalquenos se forman endógenamente [37, 38, 86, 180], y más recientemente se discute y proyecta su potencial farmacológico [27]. En este contexto era importante estudiar y determinar si el NO₂AA era capaz de modificar las vías de señalización habituales del AA, lo cual podría representar un mecanismo de modulación de los procesos inflamatorios vinculados al AA. Elegimos como centro de estudio a la enzima bi-funcional PGHS, que cataliza el paso limitante en la síntesis de prostanoïdes a partir de AA, se expresa en todos los tejidos, es un blanco farmacológico de gran relevancia en el tratamiento de muchas patologías, y es el principal destino del AA que es liberado al citosol celular por acción de la PLA₂.

5.2.1 Caracterización cinética de la inhibición de PGHS por NO₂AA

5.2.1.1 Determinación de las actividades POX y COX

La unión lábil del grupo hemo unido no covalentemente a PGHS se pierde durante la purificación de la enzima, por lo cual para los experimentos *in vitro* con PGHS-1 y 2 la apo-proteína fue reconstituída con Fe³⁺-PPIX, como se detalla en la sección experimental. Estudiamos la actividad POX por el ensayo del TMPD, ampliamente referenciado en la literatura [181]. En el ensayo se usa el cromóforo TMPD, que actúa como co-sustrato reductor cediendo electrones durante la regeneración del hemo a su forma activa (Fe³⁺-

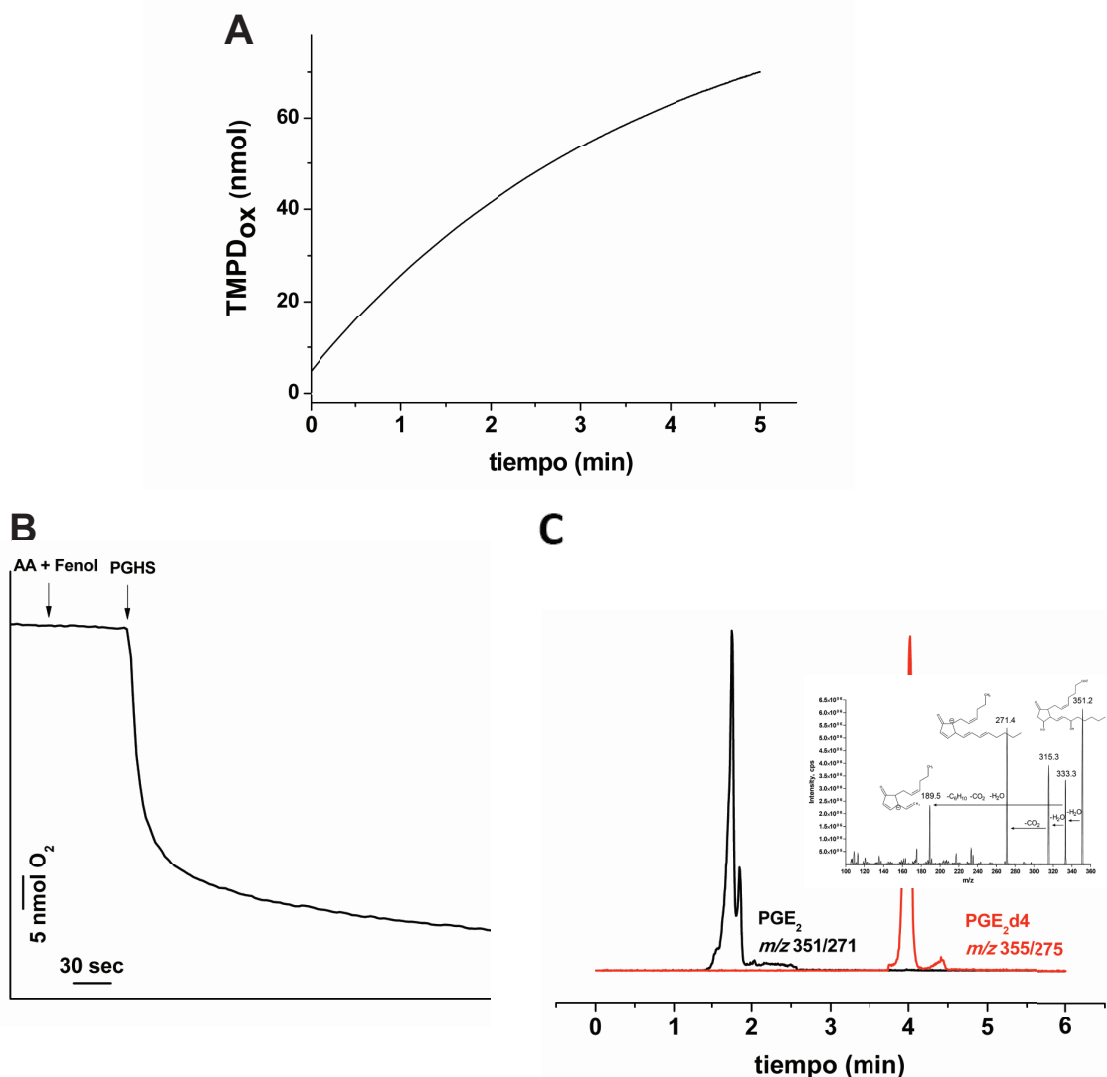


Figura 13. Determinación de la actividad enzimática de PGHS. La actividad enzimática en este trabajo se determinó por **(A)** el ensayo del TMPD (actividad POX), **(B)** oximetría (actividad COX), y **(C)** MS siguiendo la formación del producto de decaimiento de PGH₂, la prostglandina PGE₂ (actividad COX).

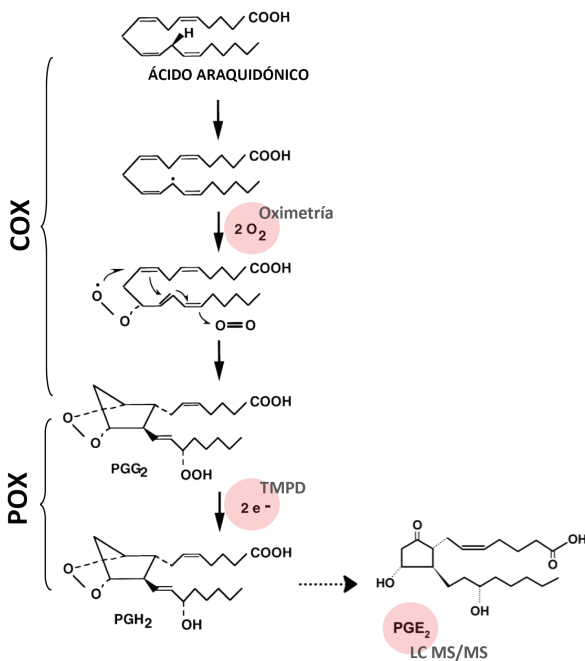


Figura 14. Determinación de la actividad enzimática de PGHS. El consumo de O₂ es una medida directa de la actividad COX, mientras que el TMPD es una medida indirecta de la actividad POX ya que el TMPD actúa como co-sustrato reductor cediendo electrones a los compuestos I y II durante la regeneración del hemo férrico, y oxidándose a un compuesto azul con máximo de absorbancia a 611nm. La formación de PGE₂ es una medida indirecta de la actividad COX, que proporciona mucha mayor sensibilidad respecto a la oximetría.

PPIX) (Figura 9). La oxidación del TMPD se acompaña de un cambio de color que se registra a 611nm por espectrofotometría en el visible (Figura 13A). La actividad COX fue estudiada por oximetría, lo cual también representa un método estándar, si bien no es el único, en el estudio de la actividad enzimática de PGHS (Figura 13B). Complementamos estos protocolos en el marco de una pasantía de investigación en el laboratorio del Dr. L.J. Marnett (Vanderbilt Institute of Chemical Biology, University of Vanderbilt - Medical School, TN, EEUU), que permitió poner a punto en nuestro laboratorio la determinación de la actividad COX por LC MS/MS, siguiendo la formación de PGE₂ (producto estable del decaimiento en medio acuoso de PGH₂). Debido a la presencia de un grupo ácido -COOH (carboxílico) libre en PGE₂, el ión [M-H]⁻ que se obtiene por ESI es muy abundante [170]. Su fragmentación característica produce el ión derivado de la pérdida de dos moléculas de agua y una molécula de -CO₂ (*m/z* 351/271) (Figura 13C). Por esta razón, una de las principales ventajas de este protocolo fue un gran

aumento en la sensibilidad respecto al uso de oximetría en la determinación de la actividad COX, y esto será relevante para nuestro trabajo, como se verá más adelante.

La figura 14 muestra el esquema general de reacciones catalizadas por PGHS y los intermediarios involucrados en los métodos de determinación de actividad enzimática utilizados por nosotros.

5.2.1.2 Efecto de la dosis

Primero evaluamos la modulación de la actividad enzimática en función de la concentración. ***El NO₂AA inhibió la actividad POX en ambas isoformas de la enzima*** (Figura 15A). La única referencia en la literatura a un inhibidor de la actividad POX en PGHS es para

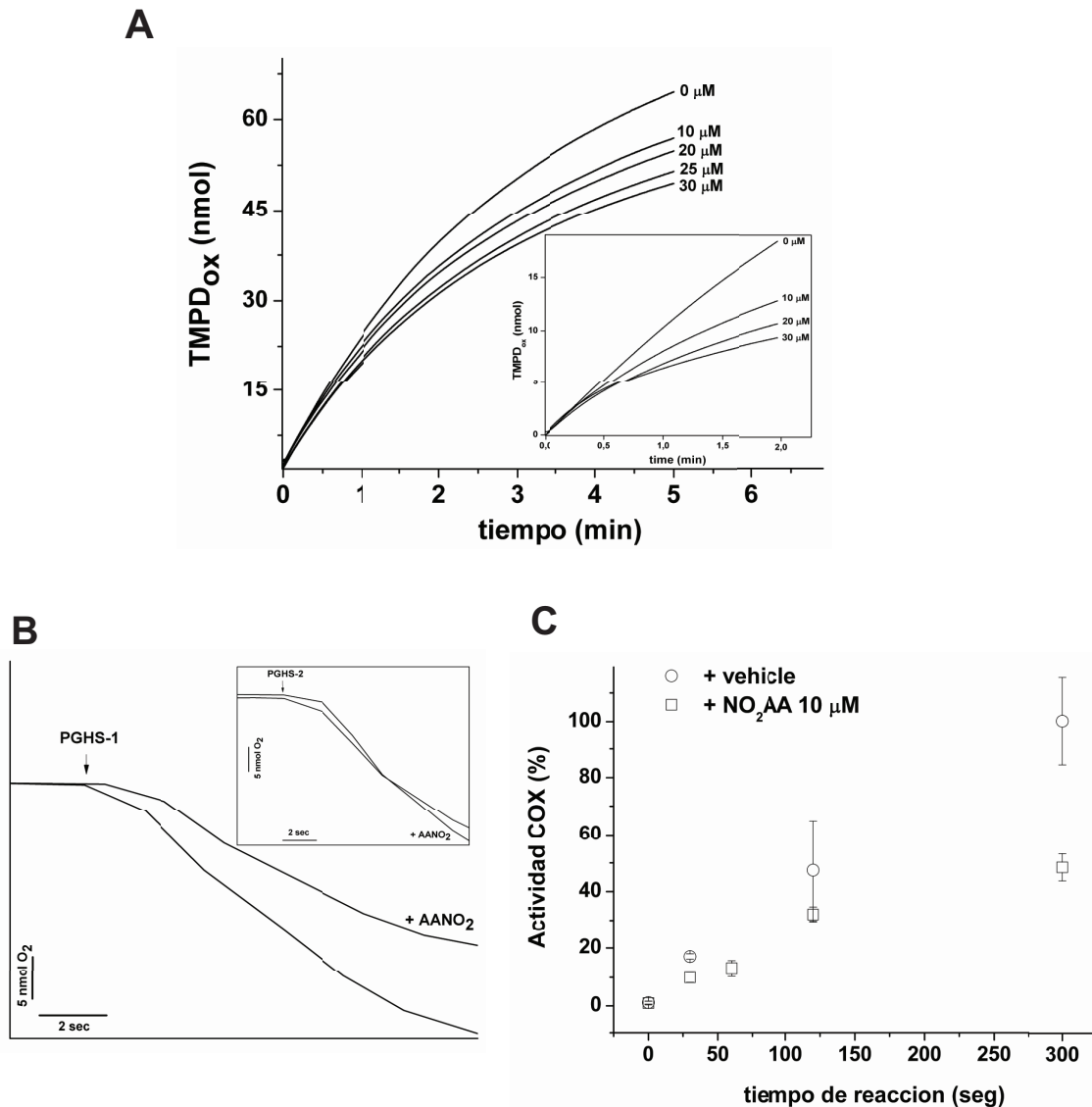


Figura 15. Efecto de la dosis de NO₂AA sobre la actividad enzimática de PGHS 1 y 2 (A) Inhibición dosis-dependiente de la actividad POX determinada por el ensayo del TMPD. PGHS-2 se muestra en el inserto. **(B)** Inhibición dosis dependiente de la actividad COX determinada por oximetría. PGHS-2 se muestra en el inserto. **(C)** Inhibición de la actividad COX de PGHS-2 por NO₂AA (10 μM) determinada por LC MS/MS. Los resultados corresponden a los promedios ± S.E., n=3, de experimentos por triplicado.

el resveratrol, un producto natural de origen vegetal que actúa como co-sustrato reductor durante el ciclo catalítico de la actividad POX (de PGHS-1), dando lugar a una forma no productiva de la enzima [182]. Los inhibidores de aplicación clínica (AINES e inhibidores específicos de PGHS-2) interaccionan con PGHS en el sitio activo COX, disminuyendo el consumo de O₂ sin afectar la actividad POX [140]. El NO₂AA disminuyó el consumo de O₂ selectivamente en PGHS-1, cuando evaluamos la actividad COX por oximetría (Figura 15B). Esto fue difícil de comprender dado que la actividad POX es crítica para dar inicio a la actividad COX y parecía poco probable que afectar a la primera no tuviera efectos sobre la

segunda. Los diferentes requerimientos de sustrato peroxidásico (20 nM para PGHS-1 vs. 2 nM para PGHS-2 para H₂O₂) hacen a PGHS-1 más susceptible a los inhibidores peroxidásicos [183], por lo cual es posible que la actividad COX de PGHS-2 sólo fuera sensible a concentraciones mayores de inhibidor POX. Alternativamente, es posible que el NO₂AA no afecte directamente la oxigenación de AA, sino que la inhibición de la actividad COX observada para la isoforma constitutiva responda exclusivamente a la inhibición de la actividad POX. En este caso un mecanismo de inhibición diferente o una potencia desigual del NO₂AA hacia las isoformas 1 y 2 de PGHS podría explicar que el nitroalqueno no tenga efectos sobre la actividad COX de PGHS-2. **La actividad enzimática total (determinada por LC MS/MS), mostró que el NO₂AA inhibe la formación de PGE₂ en ambas isoformas de PGHS (Figura 15C).**

Todos los ensayos en este trabajo fueron realizados utilizando muestras puras de NO₂AA compuestas por una mezcla de isómeros posicionales. Cuando evaluamos el efecto de isómeros puros de NO₂AA sobre la actividad POX observamos una inhibición del 30 al 50 %, comparable a la inhibición dada por la mezcla isomérica (Figura 16), mostrando que la inhibición de PGHS es independiente de la posición que ocupa el -NO₂ en la cadena

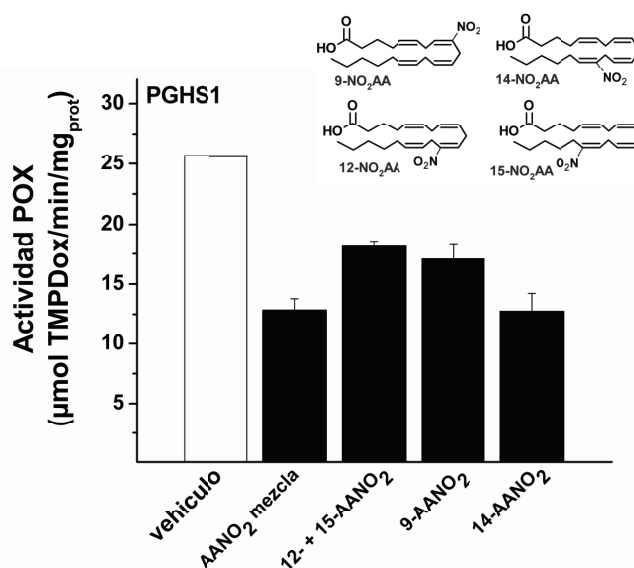


Figura 16. Efecto de los isómeros posicionales de NO₂AA sobre la actividad POX. La mezcla de NO₂AA que utilizamos en este trabajo está compuesta por una mezcla de isómeros posicionales. Aquí purificamos los isómeros de la mezcla por HPLC y evaluamos su efecto sobre la actividad POX de PGHS. El efecto sobre la actividad enzimática no mostró diferencias significativas entre los distintos isómeros. Los resultados corresponden a los promedios ± S.D., con n=3, de experimentos por triplicado.

hidrocarbonada del inhibidor. **Otros nitroalquenos (NO₂LA y NO₂OA) fueron evaluados, pero no tuvieron ningún efecto sobre la actividad POX de PGHS-1 o 2, mostrando que la inhibición de la enzima no es genérica a los nitroalquenos sino específica para el NO₂AA.**

5.2.1.3 Modelo cinético de inhibición

Muchos de los inhibidores reportados inhiben a PGHS (actividad COX) de manera tiempo-dependiente [99, 140]. PGHS preincubada con NO_2AA previo al inicio de la reacción mostró una actividad POX (Figura 17A) y COX (Figura 17B) reducida indicando que el tiempo es un factor clave en la inhibición de PGHS mediada por NO_2AA . La disminución en la velocidad inicial de la reacción concomitante al aumento en el tiempo de preincubación

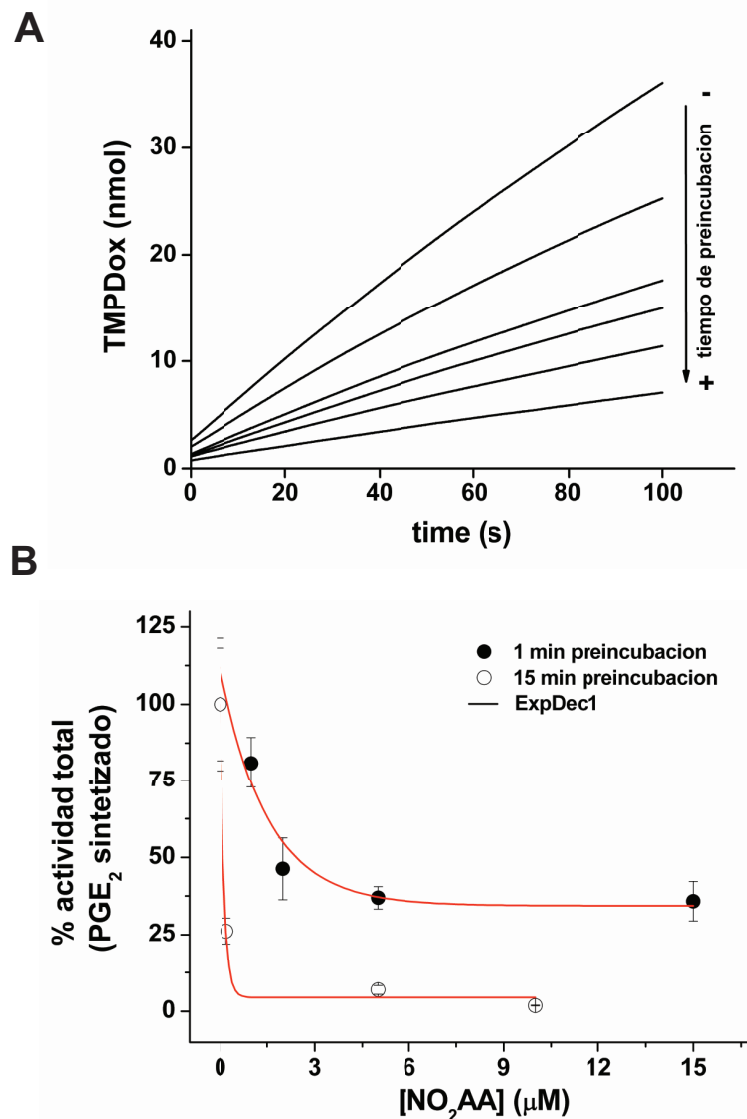
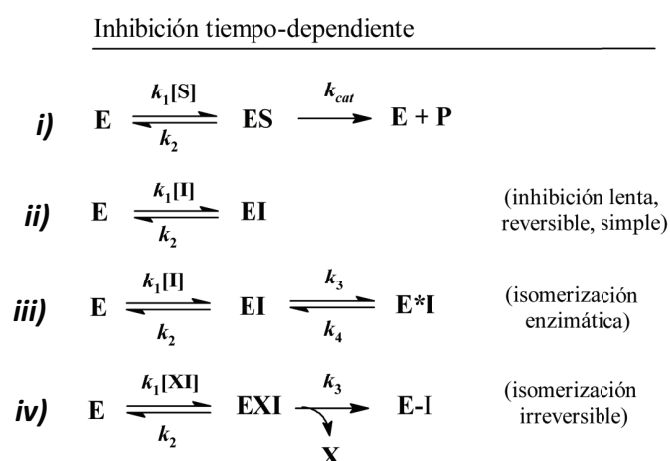


Figura 17. Efecto del tiempo en la inhibición de PGHS. (A) Gráficos primarios de la actividad POX de PGHS-1 (20 nM) para diferentes tiempos de preincubación PGHS- NO_2AA , determinada por el ensayo del TMPD. Los resultados que se muestran son representativos de PGHS-1 y 5 μM NO_2AA **(B)** Actividad COX de PGHS-2 en presencia de dosis crecientes de NO_2AA , preincubado con la enzima durante 1 o 15 minutos previo a la determinación de PGE₂, por MS/MS. Los resultados corresponden a los promedios \pm S.E., con $n=3$, de experimentos por duplicado.

enzima-sustrato (Figura 17A) reflejó que la interacción enzima-inhibidor (E-I) tiene la misma escala temporal que el recambio (o turnover) de la enzima [184]. Existen al menos tres modelos de interacción E-I con ésta cinética de unión lenta característica de un inhibidor tiempo-dependiente (Esquema 2). Para caracterizar cinéticamente la inhibición, es clave conocer la relación entre las constantes observadas de inhibición (k_{obs}) y la concentración del inhibidor. Aquí determinamos cada k_{obs} para PGHS-1 (Figura 18) y PGHS-2 (Figura 19) ajustando exponencialmente en orden 1 la actividad POX remanente en función del tiempo de preincubación con una concentración fija de NO₂AA (Figuras 18 y 19, inserto). Representamos las constantes obtenidas en función de la concentración de NO₂AA para determinar cuál de los modelos ilustrados en el esquema 2 se ajusta a la interacción PGHS-NO₂AA (Figura 20). Antes de realizar el ajuste matemático ya se pudo determinar que la interacción no corresponde a una reacción bimolecular simple (Esquema 2, modelo ii), ya que no es lineal la relación entre k_{obs} y [NO₂AA]. Por el contrario, las k_{obs} mostraron una relación hiperbólica con la concentración de NO₂AA en ambas isoformas de la enzima



Esquema 2. Modelos cinéticos de inhibición tiempo-dependiente. **(i)** Reacción enzimática en ausencia de inhibidor. **(ii)** Inhibición simple, reacción bimolecular entre la enzima (E) y el inhibidor (I). La potencia y reversibilidad está dada por los valores de k_1 (k_{on}) y k_2 (k_{off}). Alternativamente, se puede establecer una interacción entre la enzima y el inhibidor formando un complejo (EI) en una primera reacción, seguido de una segunda reacción donde la enzima sufre una modificación **(iii)** reversible o “isomerización enzimática” o **(iv)** irreversible. La caracterización cinética permite determinar el paso limitante (k_{on} puede corresponder a k_1 o k_3) y la reversibilidad de la inhibición (valor de k_4).

(Adaptado de Copeland, R. A. (2000) *Enzymes- Chapter 8*, 2nd Edition edn.)

(Figura 20), representativo de un inhibidor que actúa en dos pasos; se establece un primer equilibrio de unión entre enzima e inhibidor (con una constante de equilibrio determinada por k_1 y k_2 en los modelos iii y iv del esquema 2), seguido de una modificación de la enzima que resulta en una inhibición reversible (modelo iii, Esquema 2) o irreversible (modelo iv, Esquema 2) [184]. Los gráficos de k_{obs} vs. [NO₂AA] se ajustaron mejor a las ecuaciones para el modelo de inhibición tiempo-dependiente en dos pasos (Esquema 3) y obtuvimos los

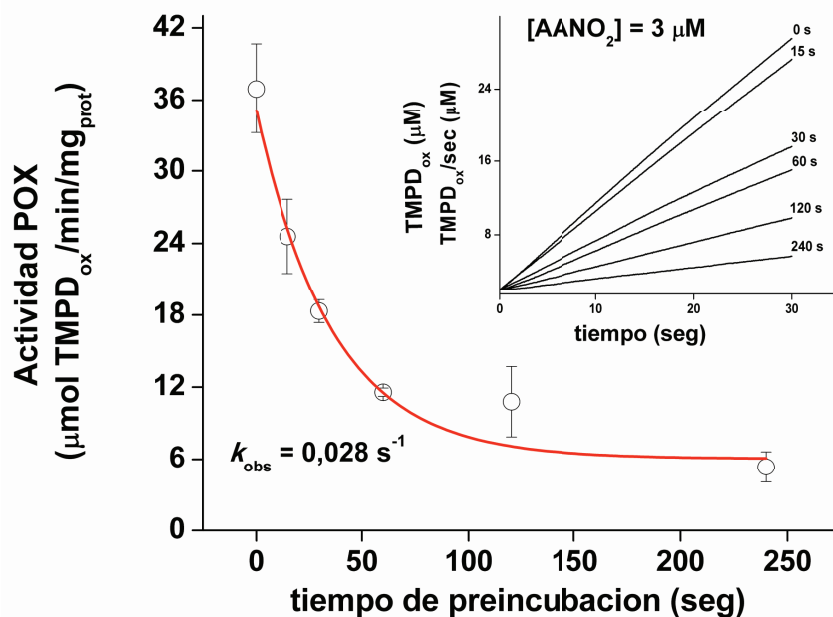
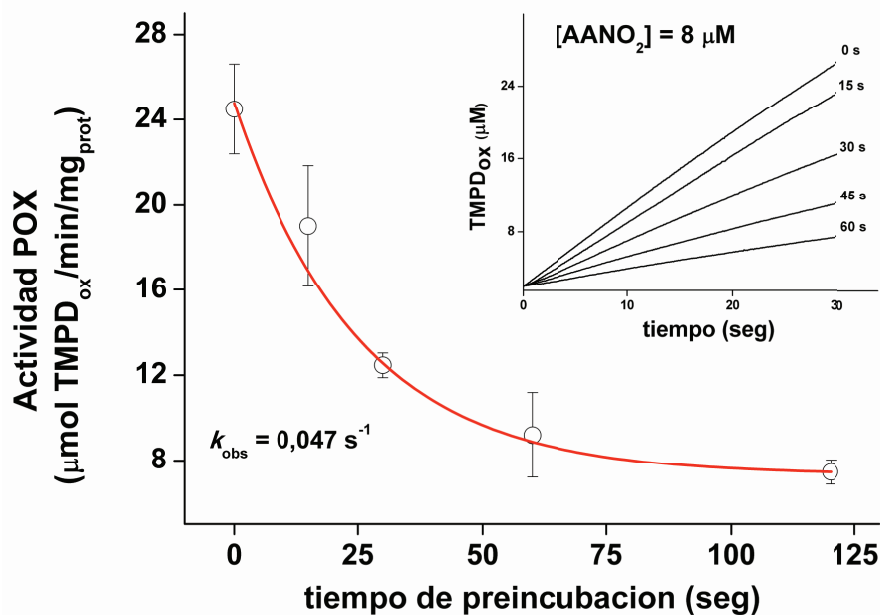
A**B**

Figura 18. Determinación de k_{obs} para la inhibición de la actividad POX en PGHS-1. Se muestran resultados representativos para la enzima inhibida con NO_2AA (A) $3 \mu M$ y (B) $8 \mu M$. A partir de los datos primarios de $TMPD_{ox}$ para tiempos de preincubación con concentraciones crecientes de NO_2AA crecientes (inserto) calculamos la actividad específica POX (velocidad inicial, 30 segundos) y representamos gráficamente la actividad POX remanente para tiempos de preincubación crecientes. Ajustamos los datos a una exponencial de orden 1 para obtener los valores de k_{obs} . Los resultados corresponden a los promedios \pm S.D., $n=3$, de experimentos al menos triplicados.