



Tesis de Doctorado en Química  
Facultad de Química – PEDECIBA Química

---

**FORMACIÓN Y REACCIONES DE  
PEROXINITRITO EN MITOCONDRIAS:  
ESTUDIOS CON SONDAS, DAÑO  
OXIDATIVO Y PROTECCIÓN POR  
MANGANESO PORFIRINAS**

---

Valeria Valez Medina

Orientador: Dr. Rafael Radi, Co-orientadora: Dra. Adriana Cassina

Centro de Investigaciones Biomédicas – CEINBIO  
Departamento de Bioquímica -Facultad de Medicina  
Universidad de la República

Montevideo, marzo de 2013



Dedicado a Matías, por todos estos años de aguante con mi carrera;  
a Joaco por haberle quitado tiempo para esta tesis.

A los dos GRACIAS, son mi fuente interminable de motivación y mi mayor éxito.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>HISTORIA Y TEORÍA DEL ORIGEN DE LA MITOCONDRIA</b>	<b>2</b>
2.1.1	HISTORIA	2
2.1.2	ORIGEN DE LA MITOCONDRIA	4
<b>2.2</b>	<b>MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL</b>	<b>5</b>
2.2.1	DINÁMICA MITOCONDRIAL	7
2.2.2	FUNCIÓN MITOCONDRIAL: GENERACIÓN DE ATP	8
<b>2.3</b>	<b>FORMACIÓN DE MITOCONDRIAL DE SUPERÓXIDO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO</b>	<b>10</b>
2.3.1	RADICAL SUPERÓXIDO	10
2.3.2	PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	16
2.3.3	BLANCOS MITOCONDRIALES DEL RADICAL SUPERÓXIDO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	17
<b>2.4</b>	<b>PEROXINITRITO. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y SU ROL EN LA PATOLOGÍA</b>	<b>19</b>
2.4.1	PEROXINITRITO Y NITRACIÓN MITOCONDRIAL	19
2.4.2	BLANCOS DE PEROXINITRITO EN LA MITOCONDRIA	20
2.4.3	OXIDACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL POR PEROXINITRITO	26
2.4.4	EVIDENCIAS DE LA PARTICIPACIÓN DEL PEROXINITRITO EN LA PATOLOGÍA HUMANA	27
<b>2.5</b>	<b>PROTECCIÓN ANTIOXIDANTE EN LA MITOCONDRIA</b>	<b>28</b>
2.5.1	PROTECCIÓN ENDÓGENA	28
2.5.2	PROTECCIÓN EXÓGENA: FARMACOLOGÍA DIRIGIDA A LA MITOCONDRIA	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIALES</b>	<b>36</b>

<b>4.2</b>	<b>EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS DE CORAZÓN DE RATA</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES (PSM)</b>	<b>38</b>
<b>4.4</b>	<b>SÍNTESIS DE PEROXINITRITO</b>	<b>38</b>
<b>4.5</b>	<b>ÓXIDO NÍTRICO, PREPARACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y UTILIZACIÓN</b>	<b>38</b>
<b>4.6</b>	<b>MEDIDAS DE QUIMIOLUMINISCENCIA</b>	<b>39</b>
<b>4.7</b>	<b>MEDIDA DE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO EN PSM</b>	<b>40</b>
<b>4.8</b>	<b>MEDIDAS DE FLUORESCENCIA PARA LA DETECCIÓN DE ONOO<sup>-</sup>, DHR-123 Y CBA</b>	<b>41</b>
<b>4.9</b>	<b>DETECCIÓN INMUNOQUÍMICA DE NITROTIROSINAS PROTEICAS Y DE ADUCTOS PROTEÍNA-DMPO</b>	<b>42</b>
<b>4.10</b>	<b>INCORPORACIÓN DEL BTBE EN MITOCONDRIAS Y SU EXTRACCIÓN</b>	<b>43</b>
<b>4.11</b>	<b>ANÁLISIS POR HPLC DEL BTBE</b>	<b>44</b>
<b>4.12</b>	<b>CUANTIFICACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO (MDA) POR TBARS PARA ESTIMAR LIPOPEROXIDACIÓN</b>	<b>44</b>
<b>4.13</b>	<b>MEDIDA SIMULTÁNEA DEL NIVEL DE OXÍGENO Y LA REDUCCIÓN DE PORFIRINAS DE MANGANESO POR LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO</b>	<b>45</b>
<b>4.14</b>	<b>INACTIVACIÓN DEL COMPLEJO I DEPENDIENTE DE ONOO<sup>-</sup> : EFECTO ANTIOXIDANTE DE LAS PORFIRINAS DE MANGANESO</b>	<b>46</b>
<b>4.15</b>	<b>CULTIVO CELULAR</b>	<b>46</b>
<b>4.16</b>	<b>MICROSCOPÍA CON FONCAL RAMAN</b>	<b>47</b>
<b>4.17</b>	<b>PROCEDIMIENTOS GENERALES</b>	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>48</b>
<b>5.1</b>	<b>DETECTAR LA FORMACIÓN DE ONOO<sup>-</sup> EN PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES MEDIANTE SONDAS QUIMIOLUMINISCENTES, FLUORESCENTES E INMUNOQUÍMICAS</b>	<b>48</b>
<b>5.1.1</b>	<b>EVIDENCIA DE LA FORMACIÓN DE PEROXINITRITO EN PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES EXPUESTAS A NO</b>	<b>48</b>
<b>5.1.2</b>	<b>OXIDACIÓN PROTEICA INDUCIDA POR PEROXINITRITO EN PSM</b>	<b>57</b>
<b>5.2</b>	<b>LOCALIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DE ONOO<sup>-</sup> A TRAVÉS DEL USO DE UNA SONDA HIDROFÓBICA ANÁLOGO DE TIROSINA (BTBE)</b>	<b>59</b>
<b>5.3</b>	<b>ESTUDIAR LA INCORPORACIÓN, REDUCCIÓN Y CAPACIDAD REDOX DE LAS MNP EN MITOCONDRIAS AISLADAS INTACTAS Y PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES FRENTE A LA FORMACIÓN MITOCONDRIAL DE</b>	

<b>ONOO<sup>-</sup> Y OXIDANTES EXÓGENOS Y EVALUAR SU EFECTO PROTECTOR FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO</b>	
<b>MITOCONDRIAL.</b>	<b>65</b>
5.3.1 EFECTO ANTIOXIDANTE DE LAS MNP EN PSM EXPUESTAS A FLUJOS DE ONOO <sup>-</sup> AUTÉNTICO	68
5.3.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MNP EN CÉLULAS ENDOTELIALES SOMETIDAS A ESTRÉS NITROXIDATIVO A PARTIR DE FLUJOS DE ONOO <sup>-</sup> EXÓGENOS CON SIN-1.	73
5.3.3 DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE MNP A CÉLULAS ENDOTELIALES EN CULTIVO MEDIANTE MICROSCOPÍA CONFOCAL RAMAN RESONANTE	74
<b>6 DISCUSIÓN</b>	<b>78</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b>	<b>88</b>
<b>8 AGRADECIMIENTOS</b>	<b>89</b>
<b>9 REFERENCIAS</b>	<b>90</b>

## 1 RESUMEN

La formación de peroxinitrito en la mitocondria está favorecida por el suministro constante de radical superóxido a partir de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la difusión de óxido nítrico que alcanza a este organelo. La mayor parte de este trabajo fue realizado en un modelo de partículas submitocondriales (PSM), en presencia de succinato y un dador de óxido nítrico, el NOC-7, de forma tal de estudiar la formación y cuantificar al peroxinitrito formado por una multiplicidad de métodos incluyendo fluorescencia, quimioluminiscencia y análisis inmunoquímicos. Mientras que todas las sondas que fueron evaluadas revelaron niveles casi estequiométricos de peroxinitrito respecto a sus radicales precursores, el ácido cumarin borónico (un compuesto que reacciona directamente con peroxinitrito) fue el que mostró un perfil de oxidación más consistente en las PSM formando radical superóxido, en función del flujo de óxido nítrico. Un resultado interesante surgió de los estudios inmunoquímicos que verificaron la generación de radicales proteicos en PSM inducida por peroxinitrito. En otro tipo de enfoque, utilizamos un análogo hidrofóbico de tirosina (N-t-BOC L-tirosina *tert*-butil éster, BTBE) pre-incorporado en mitocondrias y PSM, el cual se nitra y oxida por peroxinitrito. En las PSM conteniendo BTBE y formando radical superóxido, la exposición a flujos de óxido nítrico, causó la oxidación y posterior dimerización de la sonda en conexión con procesos de lipoperoxidación. Las PSM suplementadas con sustratos respiratorios redujeron a las Mn(III)porfirinas (MnP) a Mn(II)P, a niveles de oxígeno fisiológicamente relevantes (3-30  $\mu\text{M}$ ); a continuación, las Mn(II)P fueron capaces de reducir al peroxinitrito a nitrito y proteger las PSM de la inhibición del consumo de oxígeno por complejo I, de la formación de radicales proteicos y de la nitración de proteínas de membrana. La pre-incubación de MnP en células endoteliales en cultivo protegió de la nitración de tirosinas proteicas mediada por peroxinitrito a partir de exposición a SIN-1. A través de microscopía confocal Raman Resonante detectamos directamente a las MnP dentro de las células, tanto en forma reducida como oxidada; el predominio observado de la forma reducida es totalmente consistente con su rol citoprotector en procesos nitroxidativos. Globalmente, los datos apoyan la formación de peroxinitrito en mitocondrias sometidas a flujos óxido nítrico y demuestran que las MnP pueden participar de un ciclo catalítico redox a nivel mitocondrial para neutralizar el daño oxidativo dependiente de peroxinitrito.

## 2 INTRODUCCION

### 2.1 Historia y teoría del origen de la mitocondria

#### 2.1.1 Historia

Las primeras observaciones de estructuras intracelulares que probablemente representaran a la mitocondria fueron en los años 1840, apenas unos años después del descubrimiento del núcleo celular. Sin embargo, Richard Altmann en 1890 fue el primero en reconocer estas estructuras a las que él llamó “bioblastos” y concluyó en ese entonces que eran “organismos primarios” viviendo dentro de las células que llevaban a cabo funciones vitales [1]. El nombre de mitocondrion fue introducido en 1898 y se originaba a partir del griego “mitos” que significa hilo, o filamento y “chondros” gránulo, en referencia a la apariencia de estas estructuras durante la espermatogénesis [2]. Pocos años más tarde, se encontró que un colorante redox llamado Janus Green B servía para teñir específicamente a la mitocondria [3]. Es interesante que a pesar del interés de Michaelis, L. por los procesos biológicos redox, en ese momento no relacionara este hallazgo con un posible rol de la mitocondria en las oxidaciones celulares. Tomó 50 años más, demostrar que este teñido específico con Janus Green B, era debido a la capacidad de la mitocondria de oxidar el colorante reducido por la citocromo c oxidasa [4].

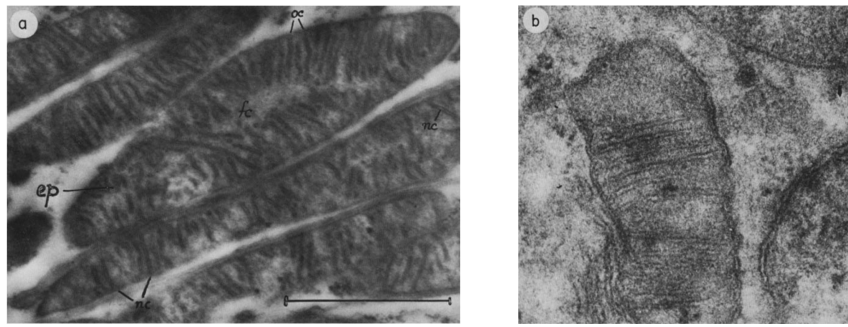
En 1912 se llega a la conclusión que la mitocondria sirve como “una expresión estructural de las sustancias reductoras en cuestión en la respiración celular”, siendo el punto clave de la historia de la mitocondria, donde se asocia a este organelo con las enzimas de la cadena respiratoria [5]. Sin embargo, esta proposición, como muchas otras que siguieron en los siguientes 20 años, estaba basada casi exclusivamente en observaciones morfológicas, sin evidencia química directa. En 1925, Keilin describe los citocromos, un descubrimiento que lleva a la definición de la cadena respiratoria como una secuencia de catalizadores [6].

En 1934, se aisló por primera vez una fracción que contenía estructuras en forma de bastones a partir de homogenizado de hígado de cobayos en solución salina mediante centrifugación a 2000 rpm [7]. Este método ofrece la primera oportunidad de un análisis bioquímico sobre una fracción citoplásmica aislada y mostró un camino para identificar a la mitocondria con el sitio de la respiración celular. Durante la segunda mitad de 1930, se hicieron considerables avances en la elucidación de las vías de reacción y vías energéticas del metabolismo aeróbico: se formula el ciclo de Krebs [8], se presentan las primeras observaciones que llevan a demostrar la fosforilación aeróbica, se deduce a partir de experimentos en tejido muscular que se forma dos moléculas de ATP por átomo de oxígeno consumido. Indicando este resultado que la fosforilación probablemente ocurre acoplada a la cadena respiración.

En 1949, Kennedy y Lehninger demostraron la oxidación aeróbica de los metabolitos del ciclo del ácido cítrico y de los lípidos acompañada de la formación de ATP a partir de fosfato inorgánico y ADP en mitocondria aislada de hígado de rata preparada en sacarosa 0.88M [9]. A pesar de que se hicieron muchos avances a partir de la mitocondria aislada y de la demostración del control respiratorio mitocondrial, todavía no se conocía detalladamente las características ultraestructurales de la mitocondria, en particular, faltaba describir el rol de las membranas en la transducción de la energía.

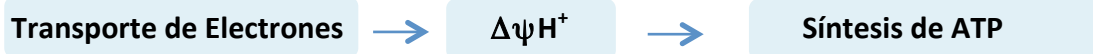
Las primeras micrografías electrónicas de alta resolución fueron publicadas en 1952-1953 por Palade y Sjöstrand [10, 11]. Palade observó que la mitocondria está rodeada por una membrana, la cual está plegada formando crestas dentro de la mitocondria. Las micrografías de Sjöstrand revelaron que la mitocondria estaba rodeada por una doble membrana y que dentro de la mitocondria también había doble membranas formando divisiones (Fig. 1). Luego se confirmó que la membrana limitante era doble y que las crestas correspondían a la membrana interna plegada hacia adentro. Recién en 1964, se publica la primera micrografía de alta resolución de la mitocondria [12].





*Figura 1. Primeras micrografías electrónicas de mitocondrias de riñón. a) micrografía de Palade, b) de Sjöstrand. Extraído de [10, 11].*

Entre 1961 y 1966, Peter Mitchell propone la teoría quimiosmótica que explica cómo a partir de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna y como esto se relaciona con la síntesis de ATP en la célula [13, 14]. Durante esos años la hipótesis quimiosmótica de Mitchell fue gran tema de debate, y algunos aspectos lo siguen siendo hasta el día de hoy. De todos modos, la idea básica de la hipótesis era:



y fue ampliamente aceptada por la mitad de los años 1970 como el “dogma central” de la bioenergética de membranas.

### 2.1.2 Origen de la mitocondria

La teoría endosimbiótica propuesta por Lynn Margulis en 1981 [15] a pesar de ser una de las teorías más aceptadas hasta el momento sobre el origen de la mitocondria, tiene dos puntos de vista principales que difieren en la suposición de la naturaleza del hospedero, en las capacidades de la mitocondria endosimbionte y el tipo de interacción ecológica que lleva a la simbiosis.

Uno de estos puntos de vista es más tradicional y postula que la célula que inicialmente fagocitó a la mitocondria era una célula nucleada anaeróbica (digamos casi un eucariota). Asume también que la mitocondria endosimbionte era aeróbica obligatoria, por lo que beneficiaba al hospedero anaeróbico en que podía detoxificar especies reactivas del oxígeno (ERO). Esta teoría plantea que el hospedero era ya un

eucariota, por lo que pone en discusión la ubicuidad de la mitocondria en este proceso evolutivo. Además, las ERO son tóxicas para los organismo anaeróbicos y la mayor parte de las ERO formadas in vivo se forman a partir de la mitocondria en la cadena de transporte electrónico, por lo que no representaría un efecto benéfico, sino que sería un escenario más oxidante aún. Por lo tanto esta perspectiva de la teoría endosimbiótica de la mitocondria requiere más datos para explicar la dependencia del oxígeno en los antepasados [16].

Una perspectiva alternativa de esta teoría postula que el hospedero que adquirió las mitocondrias era un procariota (una arqueobacteria *per sé*) [17]. Además vincula la idea de que la mitocondria ancestral era metabólicamente versátil, anaeróbica facultativa, podía vivir tanto en presencia, como en ausencia de O<sub>2</sub>. El beneficio para el hospedero procariota, pudo haber sido la producción de H<sub>2</sub> por la mitocondria como fuente de electrones y energía [18]. Debido a que esta perspectiva postula que los eucariotas evolucionaron a partir de la endosimbiosis mitocondrial de un huésped procariota, representa directamente la ubicuidad de las mitocondrias entre los linajes eucariotas.

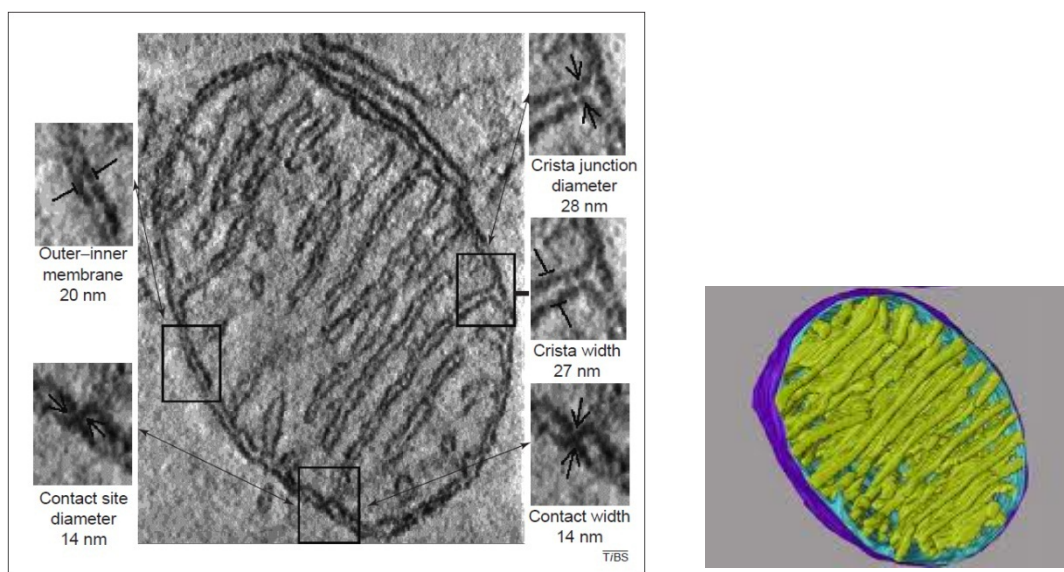
En suma, las mitocondrias surgieron una vez en la evolución, y su origen significó una endosimbiosis acompañada de transferencia de genes al hospedero. La existencia de una mitocondria anaeróbica es difícil de explicar con los conocimientos tradicionales, pero encaja muy bien con las nuevas teorías e hipótesis sobre la evolución mitocondrial.

## **2.2 Morfología y función mitocondrial**

Las mitocondrias no tienen un tamaño fijo, pero por ejemplo en hepatocitos y fibroblastos miden aproximadamente 3-4 µm de largo y 1 µm de diámetro, inicialmente se decía que se asemejaban a bacterias tanto por su forma como por su tamaño. El número de mitocondrias por célula, varía significativamente según el tipo celular, pudiéndose encontrar desde cientos a miles por sección celular. La morfología mitocondrial también depende del organismo, por ejemplo en el oocito humano se estiman unas 100.000 mitocondrias, mientras que en los espermatozoides son menos, pero adquieren formas elongadas que envuelven el axonema de la cola. Es por esto

que el número de mitocondrias no es el parámetro más relevante a ser considerado, como sí lo podría ser el volumen mitocondrial respecto al volumen celular [19].

Como se comentó antes, las primeras imágenes que se obtuvieron de la mitocondria donde se pudo observar por primera vez su morfología, surgieron de los trabajos de Palade y Sjostrand en el Rockefeller Institute [10, 11], ellos no solo confirmaron que la mitocondria era un organelo definido por membrana, sino que además reconocieron que estaba constituida por dos membranas, una externa y una interna que formaba crestas [20].



**Figura 2. Micrografías de la mitocondria.** A la derecha se muestra una sección de la mitocondria tomada por el tomógrafo 3D, se destacan varias características estructurales y se estiman dimensiones a partir de la tomografía completa de varias mitocondrias reconstruidas *in situ*, en tejido nervioso, tejido adiposo marrón y *Neurospora crassa* [21]. Izquierda, modelo computacional generado por el tomógrafo 3D a partir de secciones de la mitocondria. A la izquierda se muestra todo el modelo completo, en amarillo las crestas, en celeste la membrana interna, y en azul la membrana externa [22].

La variación en la forma de las crestas es notable, en general tienen apariencia lamelar, pero en la mayoría de los casos es muy difícil interpretar su forma si no se analizan varias secciones en conjunto como para obtener una imagen tridimensional aproximada (Fig. 2). Avances recientes en tomografía electrónica permitieron estudiar

objetos complejos en 3D, a partir de secciones de la mitocondria reconstruye una imagen 3D de alta resolución [22] (Fig. 2).

A partir de estos estudios se llegó a la conclusión de que las crestas están unidas a la membrana interna a través de conexiones en forma de tubos. Topológicamente, el espacio intermembrana (que es el espacio entre membrana interna y externa) se continúa dentro de la mitocondria, entre las crestas, pero se especula que estas conexiones podrían actuar como barreras separando el espacio intermembrana en dos compartimentos: intracrestas e intermembrana.

La membrana interna mitocondrial es más compleja tanto en estructura como en su función en comparación con la membrana externa. Por su parte, el espacio intermembrana contiene enzimas involucradas en la transferencia de energía, como la adenilato ciclasa, la creatina kinasa y la nucleósido bisfosfato kinasa. La membrana externa contiene aproximadamente 30 - 40% de lípidos y 60 -70% de proteínas. Es rica en porinas como el VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje) que permite el pasaje de partículas hasta 10 kDa con lo cual es muy permeable. La membrana interna está constituida en un 80% de proteínas, es rica en ácidos grasos insaturados y cardiolipina exclusiva de la mitocondria. Impide el paso de moléculas pequeñas entre el citosol y la matriz y mantiene el gradiente de protones que dirige la fosforilación oxidativa. En la membrana interna se localizan los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria y en la matriz mitocondrial, el material genético y las enzimas centrales del metabolismo oxidativo, a lo cual haremos referencia más adelante.

### **2.2.1 Dinámica mitocondrial**

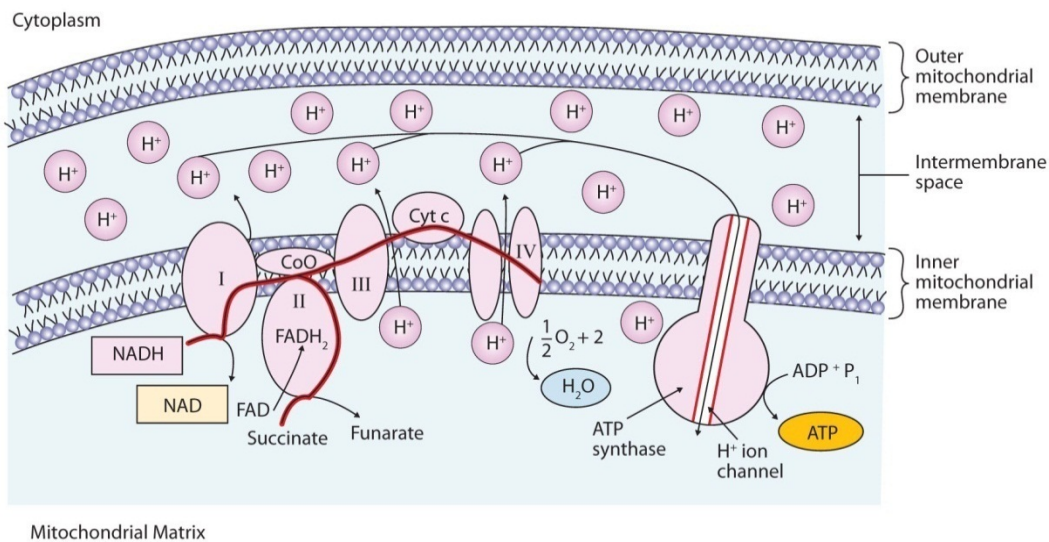
Las mitocondrias son organelos dinámicos, pueden existir como organelos únicos o formando redes y pueden moverse dentro de la célula a través de su interacción con el citoesqueleto. Un fenómeno interesante ocurre en las neuronas y axones, donde las mitocondrias son transportadas tanto en forma retrógrada como anterógrada a través de los axones, involucrando también una asociación con los microtúbulos [23]. En las micrografías se puede observar que dependiendo el estadio celular las mitocondrias pueden estar formando redes filamentosas (fusión), o pueden aparecer en forma punteada y separadas del resto (fisión). Las proteínas de fusión y fisión son las

responsables de los cambios morfológicos de las mitocondrias. La fisión mitocondrial parecería ser un evento esencial para la proliferación celular, debido a que la mitocondria debe dividirse para dar células hijas. El proceso de fisión en levadura por ejemplo requiere de un complejo enzimático localizado en la membrana externa y expuesta hacia el citosol, la Fis1 (fisina 1). Existen muchas proteínas identificadas que asisten a la fisión mitocondrial, algunas son la Dnm1 (dinamina) o la DRP1. A diferencia de los procesos de fusión más conocidos como la fusión de vesículas a la membrana citosólica, la fusión mitocondrial es bastante más compleja, requiere la fusión de dos membranas de diferente composición y rearreglo de las cretas mitocondriales. Algunas de las proteínas responsables de este proceso son la Mnf1 y Mnf2 en humanos, la OPA1 (actualmente llamada Mgm1) con actividad GTPasa siendo esta última esencial para que ocurra la fusión. El proceso de fusión mitocondrial es un mecanismo de desarrollo programado, ha sido caracterizado en muchos sistemas y en algunos organismos ha servido para promover la recombinación entre genomas mitocondriales [24].

### **2.2.2 Función mitocondrial: generación de ATP**

Por lejos la función principal de la mitocondria es la producción de energía celular, por esto es llamada “the powerhouse of the cell”, porque es el lugar donde ocurre la fosforilación oxidativa que produce ATP. En la membrana mitocondrial interna residen complejos multienzimáticos que van a catalizar la fosforilación oxidativa y por donde fluyen los electrones que provienen del catabolismo de macromoléculas hasta el último aceptor, el oxígeno (Fig. 3).

Como ya mencionamos, la etapa final de la oxidación de nutrientes (glúcidos, ácidos grasos, aminoácidos, entre otros) resulta en la formación de equivalentes de reducción, NADH y FADH<sub>2</sub>, en la matriz mitocondrial. La cadena de transporte electrónica (CTE) oxida estos cofactores reducidos transfiriendo los electrones en una serie de pasos hasta el O<sub>2</sub>, el aceptor final, capturando la energía libre de las reacciones para dirigir la síntesis de ATP.



**Figura 3. Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.** Se observan membranas externa e interna, que dan lugar al espacio intermembrana y matriz mitocondrial. Los complejos de la cadena de transporte electrónico están insertos en la membrana interna. Se indica en rojo el pasaje de electrones desde el complejo I a CoQ, complejo III, citocromo c y complejo IV hasta el O<sub>2</sub>. Una entrada alternativa de los electrones es a través del complejo II, CoQ, complejo III, citocromo c y complejo IV (extraído de [www.flatworldknowledge.com](http://www.flatworldknowledge.com)).

Durante esta remoción de electrones desde los cofactores, se bombean protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana formando un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna, que provee energía para la síntesis de ATP. Los transportadores que transfieren electrones desde el NADH al O<sub>2</sub>, tienen potenciales de reducción estándar en el rango de -0.32 V (correspondiente al NADH el más electronegativo) hasta +0.82 V el O<sub>2</sub> (el más electropositivo). Como se muestra en la Fig. 3, los transportadores de electrones de la mitocondria, no están ordenados de forma lineal, sino que están agrupados en 4 grandes complejos que catalizan diferentes reacciones del transporte en forma parcial (Complejos del I al IV).

Muy brevemente, como se observa en la Figura 3, el Complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona (UQ) o coenzima Q (CoQ); el Complejo II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa), transfiere electrones desde el succinato a la UQ; el Complejo III (o citocromo bc1, ubiquinol-citocromo c reductasa), transfiere electrones desde el

ubiquinol (UQH<sub>2</sub>, ubiquinona reducida) al citocromo c; y el Complejo IV (citocromo c oxidasa) que transfiere los electrones desde el citocromo c al O<sub>2</sub>. Otro complejo, la ATP sintasa o Complejo V, usa la energía del gradiente electroquímico para la síntesis de ATP. Los Complejos I al IV consisten en flavoproteínas, que tienen unido fuertemente FMN o FAD y pueden transferir electrones de a uno o de a dos, los citocromos contienen grupos hemo que transfieren un electrón al Fe<sup>+2</sup> del hemo, las proteínas de hierro-azufre que también tienen Fe o S y pueden transferir un electrón y el cobre del Complejo IV que contiene Cu que transfiere de a un electrón. La UQ puede participar en reacciones de uno o de dos electrones.

La transferencia de electrones a lo largo de los Complejos I al IV hacia el O<sub>2</sub>, es usada para translocar protones hacia el espacio intermembrana generando un gradiente de protones. Esto hace al espacio intermembrana acidificarse respecto a la matriz alcalina. Paralelamente, la cara externa de la membrana interna se carga positiva y la cara interna se torna más negativa, estableciendo un gradiente de carga. Este gradiente electroquímico impulsa la fosforilación del ADP para dar ATP a través del complejo V [25].

## **2.3 Formación de mitocondrial de superóxido y peróxido de hidrógeno**

### **2.3.1 Radical superóxido**

La respiración mitocondrial es la fuente celular más importante de especies reactivas del oxígeno (ERO) y el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) es el principal radical derivado del oxígeno molecular formado durante el transporte electrónico. En la cadena de transporte de electrones, el oxígeno molecular se reduce continuamente por cuatro electrones a agua en un mecanismo de reacción concertado a nivel de la citocromo oxidasa (citocromo aa3), pero una pequeña cantidad de oxígeno consumido por la célula (0.2-0.5%) se convierte normalmente a O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [26-28]. Los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, contienen varios centros redox (coenzimas reducidas o grupos prostéticos tales como flavinas o centros de hierro -azufre) donde los electrones pueden "fugar" reduciendo al oxígeno molecular por un electrón para producir O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Tabla I). En el complejo I y II, las fuentes primarias de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> son los sitios

de flavina reducidos; para el complejo III, la mayoría del  $O_2^{\bullet-}$  parece formarse como resultado de la auto-oxidación de ubiquinona radical ( $QH^{\bullet}$ ) tanto en lado exterior como en el interior de la membrana mitocondrial interna.

El  $O_2^{\bullet-}$  a partir de complejos enzimáticos en la mitocondria, y se forma en la membrana mitocondrial externa, en la matriz, y en ambos lados de la membrana mitocondrial interna (Tabla I) [29]. Las tasas de producción basales en las mitocondrias de mamíferos se estiman en el orden de 0,1 a 0,5  $\mu M/s$  [30]. En células de mamíferos, la concentración basal de  $O_2^{\bullet-}$  en el estado estacionario se mantiene en niveles relativamente bajos en el orden de 8-30 pM, debido a su eliminación por la superóxido dismutasa (SOD) [31], esta concentración puede aumentar rápidamente en diferentes condiciones patológicas, tales como hiperglicemia [30]. En términos generales, las concentraciones de  $O_2^{\bullet-}$  en el estado estacionario son aproximadamente de cinco a diez veces mayor en la mitocondria que en el citosol y el núcleo [32].

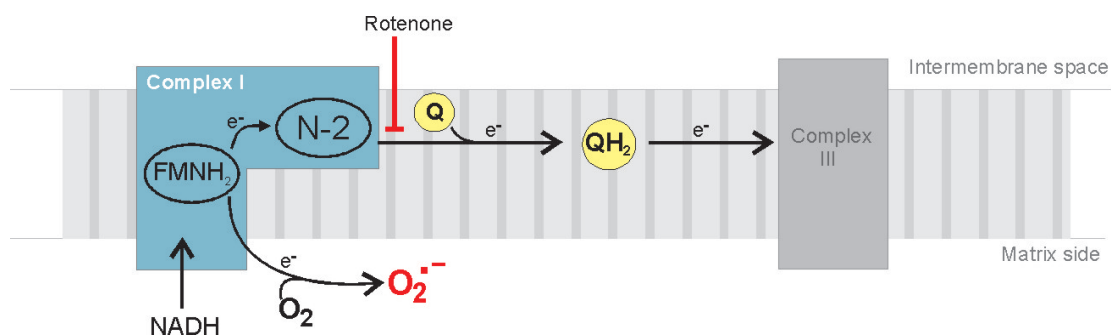
Complejo enzimático	Eflujo de superóxido	Cofactor responsable	Referencias
Complejo I	Matriz	FMNH <sub>2</sub> /FMNH <sup>•</sup>	[33, 34]
Complejo II	Matriz	Flavinas	[35, 36]
Complejo III	Matriz y espacio intermembrana	QH <sup>•</sup>	[37-40]
$\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa	Matriz mitocondrial	Subunidad E3 (dihidrolipoamida deshidrogenasa)	[41, 42]
$\alpha$ - glicerofosfato deshidrogenasa	Espacio intermembrana y citosol	-	[43, 44]

**Tabla I.** Producción de superóxido por complejos enzimáticos de la mitocondria.

El complejo I se compone de 45 polipéptidos y es el punto de entrada de los electrones a la cadena respiratoria a partir del NADH. Un cofactor mononucleótido de flavina (FMN) acepta electrones del NADH y los transfiere a través de una serie de centros Fe-S (hierro -azufre) a la proteína N-2 de hierro-azufre, que a su vez reduce la ubiquinona



a ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ). Mitocondrias aisladas en presencia de NADH producen  $\text{O}_2^{\bullet -}$  a partir de la reacción del oxígeno con la FMN totalmente reducida (Figura 4). La proporción de la FMN reducido se establece por la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ . De esta manera, la inhibición de la cadena de transporte de electrones por factores tales como el daño o la mutación de los transportadores de electrones, hipoxia e inhibidores (por ejemplo, rotenona) o un aumento de NADH debido a la baja demanda de ATP y subsiguientes tasas de respiración baja, aumentarán la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y conducirá a la formación de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  [45]. Por otra parte, el  $\text{O}_2^{\bullet -}$  también se puede formar en el complejo I durante el transporte reverso de electrones (RET), cuando el complejo II y el succinato son los responsables de la producción de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  a través de complejo I. A pesar de que este fenómeno se observa claramente en mitocondrias aisladas, su relevancia como fuente de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  *in vivo* aún es controversial [46].



**Figura 4. Sitio de producción de superóxido en el complejo I.** Entrada de electrones a través de NADH en el complejo I seguido por pasos secuenciales internos de transferencia de electrones que en última instancia, reducen a la ubiquinona (Q) a ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ). Se indica el sitio de la inhibición del complejo I por la rotenona. El superóxido se forma como resultado de la "fuga" de un electrón hacia el oxígeno molecular desde el sitio FMNH<sub>2</sub> del complejo I y es producido hacia la matriz. Tomado de [28].

El complejo III es otro sitio de producción de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  [40]. Este complejo es un dímero de monómeros idénticos, cada uno con 11 subunidades diferentes. El núcleo funcional se compone de citocromo b con dos hemo (b566 y b562), la Rieske Fe-S proteína con sus dos 2Fe-[2S], y centros de citocromo c1 con un hemo. El complejo III interactúa

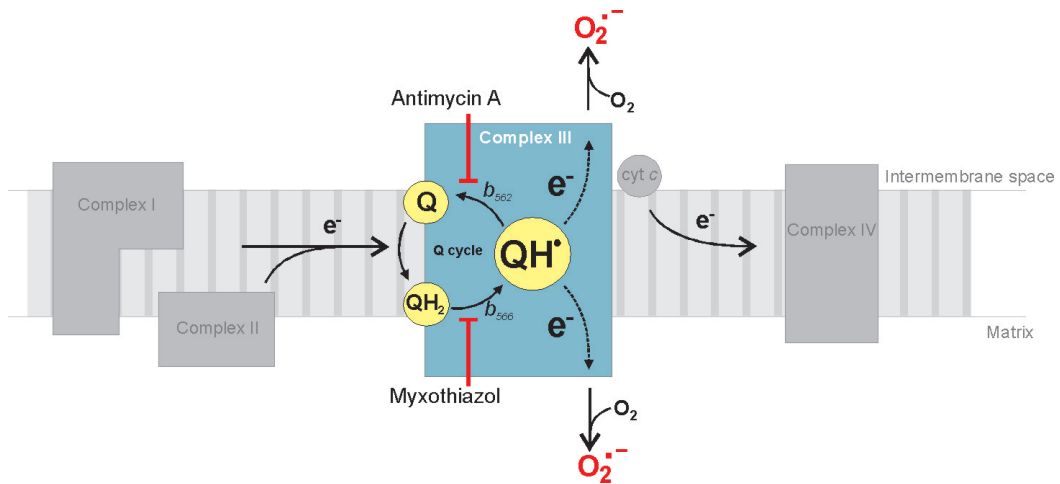
transitoriamente con ubiquinona (Q) durante el Q-ciclo (Fig. 5). Cuando se suministra ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ) y antimicina A, complejo III produce grandes cantidades de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  a partir de la reacción del oxígeno con  $\text{QH}^\bullet$ . La mayor parte del  $\text{O}_2^{\bullet -}$  producido por el complejo III se inhibe si el flujo de electrones entre el Rieske Fe-S proteína y el oxígeno es bloqueado (por ejemplo con mixotiazol). Este efecto inhibitor indica que el  $\text{O}_2^{\bullet -}$  debe ser producido como resultado de la auto-oxidación de  $\text{QH}^\bullet$  y productos intermedios producidos en el complejo III durante el Q-ciclo y no directamente por el  $\text{QH}_2$  [27].

Históricamente, el complejo I y III se pensó como la fuente más importante de especies reactivas del oxígeno (ERO) en la mitocondria, pero la evidencia emergente ha implicado a otras enzimas mitocondriales como capaces de producir ERO. En los últimos 10 años se han reportado algunas deshidrogenasas que podrían actuar como fuentes significantes de ERO en la mitocondria y han ganado reconocimiento como factores clave en la generación de estrés oxidativo contribuyendo en la patología de enfermedades neurodegenerativas o isquemia/ reperfusión [41]. La  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (que convierte el  $\alpha$ -cetoglutarato en succinil-CoA), una de las enzimas del ciclo de Krebs, es capaz de producir superóxido y peróxido de hidrógeno a partir de la subunidad E3 de la enzima (dihidrolipoamida deshidrogenasa), la cual es regulada por la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  (revisado en [47]). Está reportado que mutaciones en E3 se relaciona con enfermedades en humanos que muestra producción exacerbada de ERO. Otra deshidrogenasa que produce superóxido es la  $\alpha$ - glicerofosfato deshidrogenasa, localizada en la cara externa de la membrana interna mitocondrial. Está establecido que en mitocondrias de cerebro de mamíferos, la oxidación de  $\alpha$ - glicerofosfato produce ROS principalmente a través de dos vías: i) en el complejo III, por RET, transporte reverso de electrones, ii) y en la  $\alpha$ - glicerofosfato deshidrogenasa [48].

La velocidad de formación de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  por la cadena respiratoria es controlada principalmente por la ley de acción de masas (Ec. 1), aumentando cuando 1) la concentración de oxígeno aumenta o 2) modificaciones en el flujo electrones que aumentan las concentraciones de estado estacionario de intermedios radicales o cofactores reducidos (R, tal como  $\text{UQH}^\bullet$  y  $\text{FMNH}_2$  o  $\text{FMNH}^\bullet$ ) [49]:

$$\frac{d[O_2^{\cdot-}]}{dt} = k [O_2][R^{\cdot}] \quad (1)$$

*In vivo*, las mitocondrias están típicamente expuestas a bajas concentraciones de oxígeno que varían con los tejidos y el estado fisiológico. De hecho, la concentración de oxígeno mitocondrial *in vivo* en la mayoría de los tejidos se estima en el rango de 3-30  $\mu\text{M}$  [27].



**Figura 5. Sitios de formación de superóxido en el complejo III.** La reducción de la ubiquinona por dos electrones procedentes de los complejos I o II rinde ubiquinol, que, a su vez, evoluciona a ubisemiquinona radical por reducción de citocromo  $b_{562}$ .  $QH^{\cdot}$  puede llegar a ser totalmente oxidado mediante la transferencia de un electrón al citocromo  $b_{566}$  (completando el llamado "Q-ciclo") o al oxígeno molecular para producir  $O_2^{\cdot-}$ . Como  $QH^{\cdot}$  está presente en ambas caras de la membrana mitocondrial interna, el  $O_2^{\cdot-}$  se libera a la matriz mitocondrial y al espacio intermembrana. Los sitios de inhibición complejo III por antimicina A y mixothiazol están indicados; como se muestra, la antimicina A aumenta la formación de  $O_2^{\cdot-}$  a través de la estabilización de la ubisemiquinona radical fácilmente oxidable. Tomado de [28].

Sin embargo, en los pulmones, donde las concentraciones de oxígeno son elevadas, la producción de ROS puede ser mayor, tal como se expresa en la ec. (1); este fenómeno se incrementa dramáticamente durante la exposición hiperóxica del pulmón [50]. Por otra parte, mientras que el tejido en anoxia (ausencia total de oxígeno) impediría la formación de  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial, condiciones hipóxicas (bajas tensiones de oxígeno),

pueden contribuir a la formación de ROS debido a la persistencia de portadores de electrones mitocondriales reducidos [51].

La producción de  $O_2^{\bullet-}$  es dependiente del flujo de electrones y del estado redox de los complejos, este último está fuertemente regulado por la síntesis de ATP y la influencia de las proteínas desacoplantes (UCPs). Durante el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria, la energía se libera y se utiliza para generar un gradiente de  $[H^+]$  a través de la membrana mitocondrial interna. Este gradiente, a su vez, se disipa a través del complejo de la ATP sintasa (complejo V) conduciendo la síntesis de ATP [52]. En ausencia de ADP, el movimiento de  $[H^+]$  a través de la ATP sintasa cesa y el gradiente de  $[H^+]$  se acumula causando un flujo de electrones más lento, una cadena respiratoria más reducida (conocido como estado IV de la respiración), y como resultado la formación  $O_2^{\bullet-}$  se ve reforzada [26, 53]. En las últimas décadas, se describieron las UCPs, proteínas especializadas que promueven la disipación del gradiente  $[H^+]$ , y por lo tanto también el desacoplamiento del transporte de electrones a partir de la síntesis de ATP. Estas proteínas UCPs son miembros de la superfamilia de transportadores de aniones mitocondriales, y se localizan en la membrana mitocondrial interna. Mientras que el papel de la UCP1 en la termogénesis se identificó inicialmente en el tejido adiposo marrón (grasa parda), los otros miembros de la familia han estado implicados en la regulación de la producción de  $O_2^{\bullet-}$  dentro de la mitocondria, y por lo tanto en la disminución de ERO mediada por daño celular. El mecanismo por el cual las ERO interactúan con las UCPs no se entiende totalmente, pero existe fuerte evidencia que sugiere que la peroxidación lipídica inducida por ROS genera alquenos reactivos que son capaces de activar UCPs [54, 55].

En suma, en condiciones fisiológicas existe una producción de  $O_2^{\bullet-}$  pero en condiciones patológicas, las mitocondrias producen cantidades sustanciales de  $O_2^{\bullet-}$  cuando hay acumulación de NADH, un aumento en las concentraciones de oxígeno o cuando hay una gran fuerza motriz de protones. La formación de radical superóxido puede aumentar aún más en presencia de una afluencia masiva de calcio [56, 57] y de ciertos inhibidores, lo cual genera que los transportadores de electrones que le siguen al sitio de inhibición, estén completamente reducidos (por ejemplo,  $FMNH_2$ ) o parcialmente reducidos (por ejemplo  $QH^{\bullet}$ ,  $FMNH^{\bullet}$ ). Por otra parte, defectos en cualquiera de los componentes respiratorios, también pueden promover la generación de  $O_2^{\bullet-}$ , como se

observa en enfermedades como la enfermedad de Alzheimer (complejo IV) [58] y la enfermedad de Parkinson (complejo I) [59].

### 2.3.2 Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se forma principalmente en la mitocondria a partir de la dismutación del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (ec. 2):



En la mitocondria, esta reacción es catalizada por las SODs, y se describirá en detalle más adelante. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado en la mitocondria tiene muchos destinos posibles, puede oxidar componentes mitocondriales (tales como tioles y hierro hemo), o puede difundir a través de las membranas mitocondriales hacia otros compartimentos celulares. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el citosol, actúa como una molécula de señalización afectando varias funciones celulares tales como ciclo celular y las respuestas al estrés o generando un desequilibrio redox, que puede resultar en un estrés oxidativo [60]. Debido a que puede cruzar las biomembranas, los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden medirse fuera de la mitocondria, e incluso fuera de la célula y es posible estimar indirectamente los niveles de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  derivado de la mitocondria.

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado durante el transporte de electrones mitocondrial puede participar en la formación de radicales hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) a través de la reacción de Fenton. Debido a que el  $\text{OH}\cdot$  es una molécula muy reactiva, capaz de oxidar aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos, la necesidad de poseer un eficaz sistema de eliminación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es primordial. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede ser eliminado por enzimas mitocondriales, incluyendo las peroxirredoxinas (Prxs), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (sólo en el corazón [61] de rata y las mitocondrias de hígado) [62].

### 2.3.3 Blancos mitocondriales del radical superóxido y peróxido de hidrógeno

Las especies reactivas del oxígeno en la mitocondria pueden oxidar una amplia variedad de biomoléculas, afectando su actividad y estructura. Algunos de estos blancos son particularmente relevantes debido a su capacidad para propagar el daño oxidativo y promover la muerte celular.

La aconitasa (Aco) es una enzima mitocondrial con centros hierro-azufre [4Fe-4S] que cataliza la isomerización del citrato a isocitrato en el ciclo de Krebs y es un blanco específico de daño oxidativo durante el envejecimiento [63]. Como ha sido descrito hace varios años por Gardner y Fridovich [64], el centro Fe-S presente en el sitio activo es muy vulnerable a  $O_2^{\cdot-}$  y otras especies oxidantes. La exposición prolongada de las mitocondrias a oxidantes, resulta en la ruptura del cluster [4Fe-4S] a [3Fe-4S], lo que hace que la enzima se inactive. Actualmente, la medición de la inactivación de la Aco es uno de los métodos más sensibles para cuantificar la producción de  $O_2^{\cdot-}$  por las mitocondrias [30]. Esto último se logra teniendo en cuenta tanto la constante de velocidad para la reacción entre el  $O_2^{\cdot-}$  y Aco  $k = 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (para Aco de mitocondrias de corazón) y la constante de reactivación Aco  $k = 0,0014 \text{ s}^{-1}$ , que depende de la velocidad de re-ensamblaje del [4Fe-4S] y se ve facilitada por reductores de bajo peso molecular tales como GSH [31, 64].

La oxidación de la aconitasa por  $O_2^{\cdot-}$  resulta en la liberación de hierro libre en la mitocondria, lo cual puede propagar el daño oxidativo a través de la reacción de Fenton y reacciones de radicales de cadena, incluyendo la peroxidación lipídica mitocondrial. La peroxidación de lípidos puede ocurrir dentro de las membranas mitocondriales, resultando en la pérdida de integridad de la membrana y de función, junto con la formación de productos bioactivos y potencialmente tóxicos, tales como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal, que a su vez conducen a modificaciones covalentes de las proteínas mitocondriales (por ejemplo, aductos de proteínas con aldehídos electrófilos) [65].

La membrana mitocondrial interna contiene cardiolipina (CL), un fosfolípido exclusivamente mitocondrial que constituye alrededor del 25% de la composición total de fosfolípidos de mitocondrias de corazón. La CL contiene abundantes ácidos grasos insaturados que la hace susceptible al ataque de ROS y a la peroxidación lipídica. CL

interactúa con las proteínas de los complejos de la cadena de transporte de electrones, I, III, IV y V y con el translocador de nucleótido adenina (ANT); tales interacciones son necesarias para el funcionamiento correcto de estas enzimas [66]. En este sentido, está reportado que las interacciones con la CL facilitan la formación de supercomplejos, la optimizando la fosforilación oxidativa y que la peroxidación de CL por ROS genera pérdida de la actividad enzimática de los complejos I, II y IV, que puede ser restaurada por el tratamiento de la mitocondria disfuncional con liposomas exógenos conteniendo CL. La relevancia de la CL en la fisiología mitocondrial y señalización redox fue reforzada por la identificación de su interacción muy específica con el citocromo *c* [67].

El citocromo *c* es una pequeña proteína periférica de la membrana mitocondrial interna que lleva electrones entre los complejos III y IV de la cadena de transporte de electrones. El citocromo *c* es una proteína con un hemo hexa-coordinado con las posiciones quinta y sexta de coordinación de la hemo-Fe interactuando con una His-18 y Met-80. Es importante destacar que el citocromo *c* frente a factores fisicoquímicos o modificaciones químicas que conducen a la ruptura del enlace Fe-Met-80, aumenta la actividad peroxidática [68, 69] promoviendo la oxidación mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de una amplia gama de sustratos, incluyendo pequeñas moléculas, proteínas, residuos del mismo citocromo *c*, y ácidos grasos insaturados de la membrana mitocondrial [70]. Otras condiciones que también favorecen la actividad peroxidática del citocromo *c*, son las modificaciones en la unión con la cardiolipina o las modificaciones post-traduccionales oxidativas (tales como la nitración de tirosinas y/o la oxidación de metionina) [71]. Es importante destacar que la peroxidación de CL mediada por el citocromo *c* favorece la liberación de proteínas proapoptóticas al citosol [69].

Otro blanco de las ERO es el ADN mitocondrial (ADNmt); se produce principalmente la modificación oxidativa en la base guanina produciendo 8-oxoguanosina (8-oxoG), que se acumula aproximadamente 15 veces más en el ADN mitocondrial que en el ADN nuclear. Este aumento de la susceptibilidad al estrés oxidativo del ADNmt es probablemente debido a la falta de asociación con las histonas, la proximidad a las fuentes de ROS, y quizás lo más importante, la baja eficiencia de las vías de reparación que posee el ADNmt [72, 73].

## 2.4 Peroxinitrito. Propiedades bioquímicas y su rol en la patología

### 2.4.1 Peroxinitrito y nitración mitocondrial

Otra reacción muy relevante del  $\cdot\text{NO}$  en la mitocondria es su combinación con  $\text{O}_2^-$  para formar el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) un fuerte agente oxidante y nitrante, tal cual propuesto originalmente en [74-76]. Esta reacción está controlada por difusión, debido a su constante velocidad de segundo orden  $k = 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [77, 78].



En condiciones fisiológicas (donde el flujo de  $\text{O}_2^-$  es bajo), el óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) reacciona principalmente con metaloproteínas, particularmente la citocromo c oxidasa. Pero el aumento en la generación de radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) que se observa en situaciones patológicas puede desplazar significativamente la reactividad de  $\cdot\text{NO}$  hacia  $\text{O}_2^-$  porque la reacción se vuelve cinéticamente favorecida, de hecho, la mitocondria es reconocida como fuente intracelular clave de la formación de peroxinitrito, ya que la cadena de transporte de electrones permite la generación de  $\text{O}_2^-$  [79].

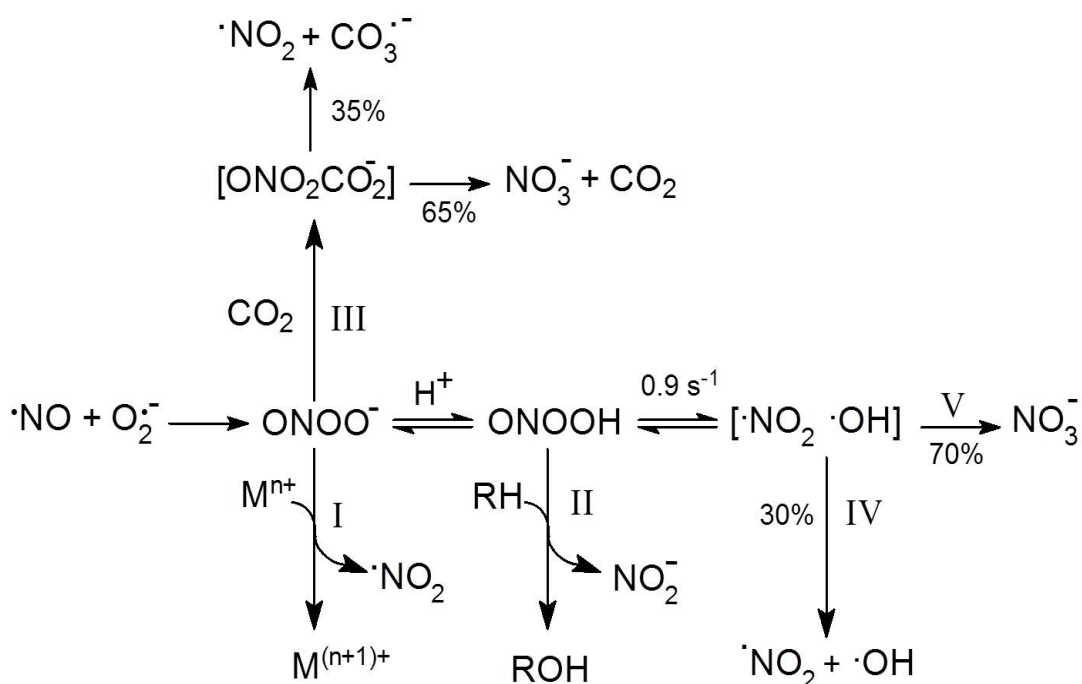
El peroxinitrito mitocondrial también puede favorecer la reacción secundaria del  $\cdot\text{NO}$  con la forma reducida de la ubiquinona,  $\text{QH}_2$  (ec. 4). Niveles constantes de  $\cdot\text{NO}$  oxidan a la  $\text{QH}_2$  a  $\text{QH}\cdot$  y  $\text{HNO}$  (nitroxilo). Mientras que el radical  $\text{QH}\cdot$  facilita la formación de  $\text{O}_2^-$  como se describe en la figura 5 (ec. 5), el  $\text{HNO}$  a su vez puede reaccionar con oxígeno molecular para formar  $\text{ONOO}^-$  (ec. 6) [80]:





## 2.4.2 Blancos de peroxinitrito en la mitocondria

Las reacciones de oxidación y nitración del peroxinitrito en la mitocondria se producen principalmente a través de dos vías diferentes (Fig. 6). El peroxinitrito puede reaccionar de forma directa, oxidando biomoléculas, como el grupo tiol del glutatión y metaloproteínas (reacciones I y II de la figura 6) [77]. Por otra parte, el peroxinitrito puede reaccionar con dióxido de carbono ( $k = 4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), que se forma en las mitocondrias en el ciclo de Krebs, dando lugar a los radicales carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) y  $\cdot\text{NO}_2$  (reacción III) [81, 82]. La otra vía de reacción es a través de los radicales que derivan del peroxinitrito que son fuertes agentes oxidantes y nitrantes (reacciones IV y V). Estas especies pueden participar en la nitración de tirosinas proteicas para producir 3-nitrotirosina, entre otras reacciones. La nitración de tirosinas proteicas es una modificación oxidativa estable que puede alterar la estructura y / o la función de proteínas.



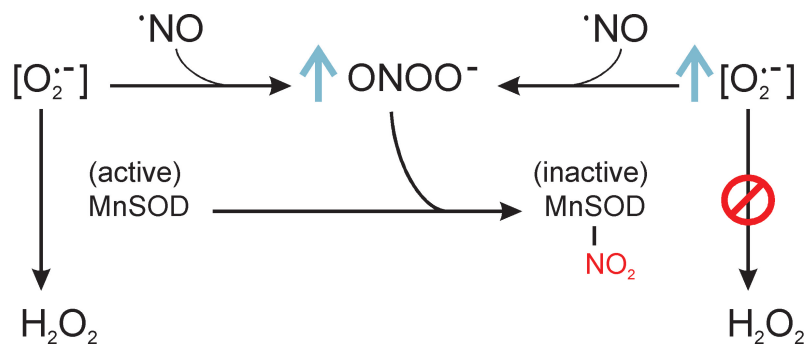
**Figura 6. Destinos del peroxinitrito.** El peroxinitrito puede reaccionar directamente con diversos blancos a través de oxidaciones por uno (con metales de transición, I) o por dos electrones (con tioles, II); con el  $\text{CO}_2$ , para formar el aducto nitrosoperoxocarboxilato (III) que se descompone para dar los radicales  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  y  $\cdot\text{NO}_2$ . El ácido peroxinitroso puede sufrir homólisis

para rendir los radicales  $\cdot\text{OH}$  y  $\cdot\text{NO}_2$  con un rendimiento del 30% (IV) o reorganizar para dar  $\text{NO}_3^-$  con rendimiento del 70% (V). Extraído de [78].

Es importante tener en cuenta que los procesos de oxidación mediados por peroxinitrito se producen con rendimientos más altos que la nitración de tirosinas. Esta última modificación se considera un biomarcador específico que denota la participación de especies derivadas del  $\cdot\text{NO}$ , durante el daño oxidativo mitocondrial. Los complejos de la cadena respiratoria, son entre otros, los blancos más relevantes del peroxinitrito en la mitocondria. Por lo tanto, el peroxinitrito estaría permanentemente inhibiendo a la NADH deshidrogenasa (complejo I) y succinato deshidrogenasa (complejo II) y mientras que el  $\cdot\text{NO}$  puede inhibir reversiblemente la citocromo c oxidasa (complejo IV), el peroxinitrito no tiene ningún efecto sobre este complejo [74-76]. La persistencia de la inhibición mediada por  $\cdot\text{NO}$  sobre la citocromo c oxidasa, estimula la formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y la consecuente formación de peroxinitrito, dando lugar a la oxidación y nitración de los complejos I y II en la cadena respiratoria [75]. Además, el peroxinitrito puede inactivar la ATP sintasa mitocondrial (complejo V) a través de la oxidación de los residuos de tirosina y tiol críticos que participan en la interacción  $\text{F}_1\text{F}_0$ , y por lo tanto contribuyen a la inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial [76].

También el peroxinitrito nitra al citocromo c, esta modificación postraduccional conduce a cambios conformacionales que implican una alteración en la coordinación del ligando del grupo hemo que deteriora su capacidad de transporte de electrones, resulta en una mayor actividad peroxidática y promueve la translocación de citocromo c al citosol (Fig. 8) [68, 83, 84]. Las consecuencias biológicas de este proceso quedan por ser establecidas. Por otra parte, el peroxinitrito también produce la ruptura del cluster [4Fe-4S] de la aconitasa generando una enzima inactiva con [3Fe-4S] (Fig. 8). El cluster Fe-S se oxida rápidamente por peroxinitrito en una reacción directa ( $k = 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) produciendo hierro libre que conduce a la inactivación enzimática. Además, los residuos tirosina en la enzima pueden nitrarse por radicales derivados del peroxinitrito, pero es la oxidación del cluster que determina la inactivación aconitasa [85]. La superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) cataliza la detoxificación del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en la matriz mitocondrial. El peroxinitrito inactiva MnSOD *in vivo* e *in vitro* [86],

reaccionando rápidamente con su centro metálico ( $k=1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) y conduciendo a la formación de especies reactivas que nitrán a la tirosina-34 en la proximidad del sitio activo (Fig. 7). La inactivación MnSOD promueve un ciclo vicioso que resulta a un aumento de la concentración en el estado estacionario del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  mitocondrial, que favorece la formación de más peroxinitrito, la nitración e inactivación de la MnSOD, y el daño oxidativo mitocondrial (Figs. 7 y 8) [87, 88].



*Figura 7. Inactivación de la MnSOD a través de la nitración mediada por peroxinitrito (modificado de [79]).*

La creatina quinasa mitocondrial (mt-CK) se encuentra en el espacio intermembrana, donde actúa como un amortiguador de energía, conectando la energía producida en las mitocondrias a la energía consumida en el citosol. El ATP producido en la matriz es transportado al espacio intermembrana por intercambio con ADP, a través de ANT. A su vez, mt-CK cataliza la formación de creatina fosfato a partir de creatina y ATP. Además, la mt-CK parece participar en la regulación de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) debido a sus interacciones con el canal de aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y ANT (Fig. 8) [89, 90]. El peroxinitrito inactiva Mt-CK por oxidación rápida de un tiol crítico en la proteína con  $k \sim 9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [91]. Este bajo  $\text{pK}_{\text{SH}}$  del residuo de cisteína favorece su reacción con la peroxinitrito, haciendo que el Mt-CK se vuelva un objetivo sensible y temprano de peroxinitrito en la mitocondria. Además de estas proteínas comentadas, existen muchas más que se detallan a continuación, las cuales han sido reportadas nitradas en diferentes modelos experimentales de enfermedad y diferentes patologías humanas (Tabla II).

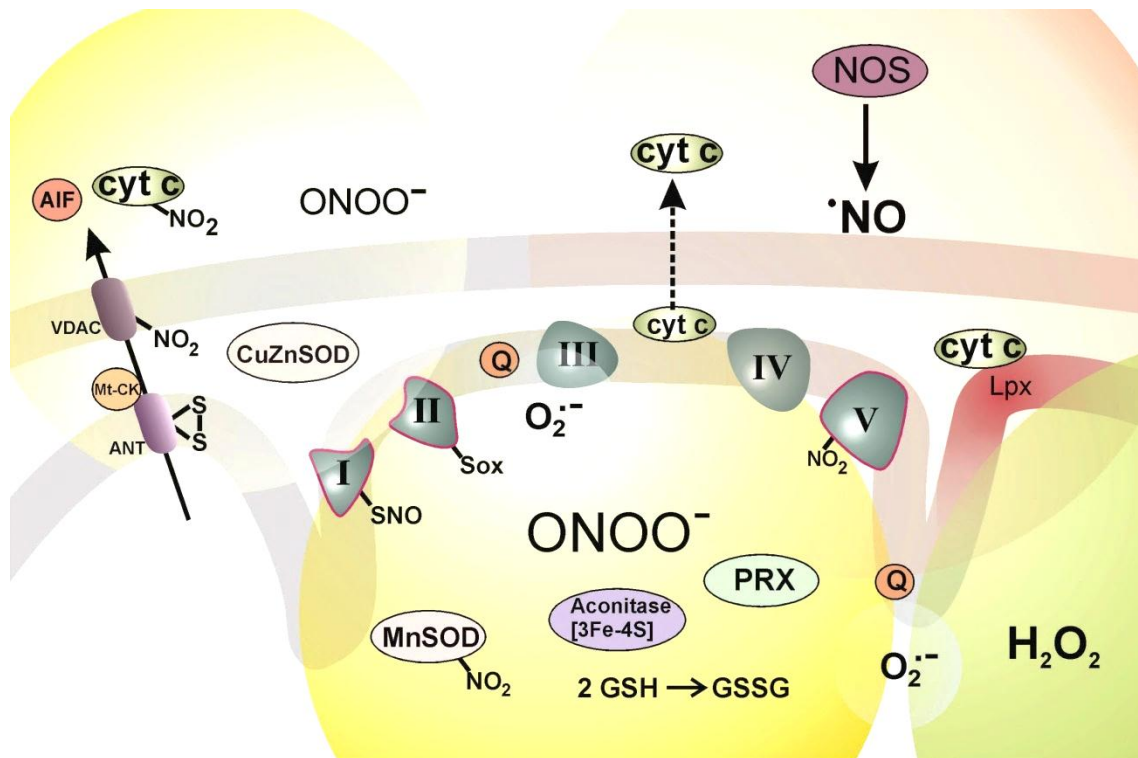
<b>Protein</b>	<b>Condition of detection</b>	<b>Identified Tyr</b>	<b>Modification of activity</b>
<b>-ketoacyl CoA tiolase</b>	Liver from a LPS treated rat		
<b>4-trimethylamene butylaldehyde dehydrogenase</b>	Liver from a LPS treated rat		
<b>Aconitase</b>	Lung from a LPS treated rat Liver from a LPS treated rat Hyperglycemic rat adipocytes Hyperglycemic beta-cells and rat islets	Tyr151 and Tyr472	Unchanged catalytic activity due to nitration
<b>Aldolase 1</b>	Parkinson's Disease Mouse brain	Tyr174	
<b>Aspartate aminotransferase</b>	Parkinson's Disease Mouse brain	Tyr67	
<b>ATPase</b>	Sporadic ALS human brain cells and peripheral blood cells	Tyr345 and Tyr368 of beta-subunit of F0F1	
<b>ATP synthase</b>	Liver from a LPS treated rat		
<b>Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar 1</b>	<i>In vitro</i> nitrated mouse brain		
<b>CPT-I</b>	Heart from a LPS treated rat		Decreased activity
<b>Creatine kinase</b>	Diabetic mouse heart Lung from a LPS treated rat [92][92][92][82][83] Parkinson's Disease Mouse brain	Tyr269 and Tyr274	Decreased activity
<b>Cytochrome c</b>	Cerebral cortex of rat's brain subjected to ischemia reperfusion Chronic allograft necropathy of rat kidney Ischemia reperfusion of rat kidney	Tyr74 and Tyr97	Increased peroxidases activity, inhibited electron transport and inability to activated the apoptosome
<b>D-beta-OH- butirate dehydrogenase</b>	Liver from a LPS treated rat		

<b>Protein (cont.)</b>	<b>Condition of detection (cont.)</b>	<b>Identified Tyr (cont.)</b>	<b>Modification of activity (cont.)</b>
<b>Glutamate dehydrogenase</b>	Liver from a LPS treated rat  Hyperglycemic beta-cells and rat islets	Tyr 262, Tyr401, Tyr471 and Tyr493	Decreased activity
<b>Glutamate-oxalacetate transaminase 2</b>	Liver from a LPS treated rat  Hyperglycemic beta-cells and rat islets		
<b>HMG-CoA synthetase</b>	Liver from a LPS treated rat		
<b>HSP60</b>	Hyperglycemic rat adipocytes Hyperglycemic beta-cells and rat islets		
<b>I-3-hydroxyacyl CoA Dehydrogenase</b>	Hyperglycemic beta-cells and rat islets		
<b>Malate Dehydrogenase</b>	Lung from a LPS treated rat  Hyperglycemic rat adipocytes Hyperglycemic beta-cells and rat islets		
<b>MnSOD</b>	Hyperglycemic rat islets  Cerebrospinal fluids of Patients with ALS, Alzheimer's and Parkinson's Disease Aged rat aorta Liver from a LPS treated rat Eye from a LPS treated rat Chronic allograft rejection of human kidney Chronic allograft nephropathy of rat kidney Ischemia reperfusion of rat kidney Kidney from angiotensin II infused rat	Tyr34 [93][93][93][83][84]	Inactivation of catalytic activity

<b>Protein (cont.)</b>	<b>Condition of detection (cont.)</b>	<b>Identified Tyr (cont.)</b>	<b>Modification of activity (cont.)</b>
<b>MnSOD</b>	Heart from Apo E <sup>-/-</sup> mouse Cigarette smoke exposed mouse heart Hyperglycemic beta-cells and rat islets	Tyr34	Inactivation of catalytic activity
<b>Panthotenate kinase</b>	Parkinson's Disease Mouse brain	Tyr320	
<b>Paraplegine</b>	Parkinson's Disease Mouse brain	Tyr505	
<b>Peroxiredoxin 3</b>	Diabetic mouse heart		
<b>SCOT</b>	Diabetic mouse heart Diabetic rat heart Kidney from a LPS treated rat		Decreased activity <i>[94][94][94][84][85]</i>
<b>Trifunctional protein</b>	Diabetic mouse heart Hyperglycemic rat adipocytes		
<b>Triose phosphate isomerase (mitochondrial)</b>	Parkinson's Disease Mouse brain	Tyr68 and Tyr209	
<b>VDAC-1</b>	Diabetic mouse heart Lung from a LPS treated rat Liver from a LPS treated rat		

Tabla II. Proteínas mitocondriales nitradas reportadas. Modificado de [95].

La presencia de proteínas mitocondriales nitradas apoya el concepto de la formación y reactividad de peroxinitrito en la mitocondria. Esta observación abre la posibilidad futura de incorporación de análogos de tirosina o péptidos conteniendo tirosina a mitocondrias, para entender los mecanismos e interferir con las consecuencias de la nitración proteica mitocondrial [96-98].



*Figura 8. Formación de peroxinitrito y blancos en la mitocondria. Se representan reacciones de oxidación y nitración promovidas por el peroxinitrito en proteínas mitocondriales críticas. Además, la peroxidación de CL como una parte importante del estrés oxidativo mitocondrial se indica en rojo (LPx) a la derecha de la figura. Estos procesos bioquímicos constituyen la base del daño nitrooxidativo en varios compartimentos mitocondriales., y puede dar lugar a disturbios en la respiración mitocondrial y en la bioenergética y/o liberación de componentes pro – apoptóticos al citosol. Extraído de [99].*

### 2.4.3 Oxidación del ADN mitocondrial por peroxinitrito

El peroxinitrito es capaz de reaccionar con el ADN mitocondrial, *in vitro* produciendo daño tanto la cadena principal de azúcar-fosfato como en las bases [100]. Este daño al esqueleto del ADN se inicia con la abstracción de un átomo de H de la desoxirribosa produciendo roturas de cadena simple. Entre las bases nucleotídicas, la guanina (G) y su producto de oxidación, 8-oxoG son los más reactivos frente a peroxinitrito. Los productos de degradación del peroxinitrito pueden nitrar a la guanina, a través de la formación de un radical intermediario,  $\cdot G$  que puede recombinarse con  $\cdot NO_2$  para producir 8-nitroguanine (8- $NO_2G$ ) y 5-nitro-4 guanidinohydantoin-(NI) [73]. El

peroxinitrito se forma dentro de la mitocondria y como se ha mencionado antes, el ADNmt es particularmente susceptible al estrés oxidativo debido principalmente a la falta de las histonas. Sin embargo, la contribución de peroxinitrito a modificaciones del ADN a nivel mitocondrial no se ha documentado en forma completa y queda por establecer.

#### **2.4.4 Evidencias de la participación del peroxinitrito en la patología humana**

En la literatura existe considerable evidencia bioquímica, patofisiológica y farmacológica de que el desbalance entre la producción celular de oxidantes y la disponibilidad de defensas antioxidantes, está asociado en el desarrollo de muchas enfermedades humanas, incluidas enfermedades cardíacas, neurológicas, procesos inflamatorios y cáncer, entre otros, donde las especies reactivas derivadas del óxido nítrico, en particular el peroxinitrito juega un rol importante [101, 102]. En la disfunción endotelial que se describe en la diabetes mellitus, se demostró que el  $\text{ONOO}^-$  tiene un rol patogénico muy claramente descrito en la literatura [103, 104]. La hiperglicemia, la principal característica de ambos tipos de diabetes (tipo 1 y 2), es capaz de desencadenar estrés oxidativo en la vasculatura, por un aumento en la formación de superóxido a través de varios mecanismos, como la disfunción mitocondrial, la activación de la NADPH oxidasa, el desacoplamiento de la eNOS, entre otros [101]. Este aumento en la formación de superóxido activa rutas de señalización que promueven la síntesis de  $\cdot\text{NO}$  (a través de la activación de NF- $\kappa\text{B}$  [105]) favoreciendo la formación de  $\text{ONOO}^-$ . Como mencionamos antes, el  $\text{ONOO}^-$  es capaz de promover disfunción vascular a través de nitración y oxidación proteica, oxidación de lípidos, inactivación de enzimas y disfunción mitocondrial. De hecho, hay reportes de que la activación de PARP-1 desencadenada por el daño en el ADN inducido por  $\text{ONOO}^-$ , es uno de los mecanismo clave involucrados en las complicaciones de la diabetes [106] y por otra parte, muchos estudios también demuestran aumento de marcadores de daño inducido por radicales libres (por ejemplo nitro-tirosina) en plasma de pacientes diabéticos [107].



## 2.5 Protección antioxidante en la mitocondria

### 2.5.1 Protección endógena

Todos los oxidantes mencionados se pueden formar en condiciones normales en las mitocondrias, pero en algunos estados de enfermedad esta producción aumenta. Varios sistemas endógenos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos protegen las mitocondrias de los efectos tóxicos de estas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Cabe destacar, a la MnSOD y las peroxidasas entre las enzimas antioxidantes las más importantes.

La MnSOD contiene manganeso como cofactor en su sitio activo y es responsable de catalizar la dismutación del  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$  en la matriz mitocondrial [108]. Se han reportado concentraciones de MnSOD de aproximadamente 10 mM en mitocondrias de hígado de rata [88]. En el espacio intermembrana, la concentración en el estado estacionario de  $O_2^-$  es controlado por la superóxido dismutasa Cu / Zn (CuZnSOD) [109].

El peróxido de hidrógeno se descompone en la mitocondria por la glutatión peroxidasa (GPx) y las peroxirredoxinas (Prx). Las isoformas, PRX III y Prx V, están presentes en la mitocondria y utilizan tioredoxina-2 como dador de electrones para reducir peróxidos orgánicos,  $H_2O_2$ , y peroxinitrito [110]. Además, en el corazón de rata, hígado y riñón, la catalasa mitocondrial media la dismutación de  $H_2O_2$  al oxígeno y al agua [61]. Los antioxidantes no enzimáticos presentes en las mitocondrias incluyen atrapadores de radicales hidrofílicos y lipofílicos: en la matriz se encuentran el ácido ascórbico y glutatión; dentro de las membranas,  $\alpha$ -tocoferol y ubiquinol que inhiben pasos de la cadena de propagación de la peroxidación lipídica. Además, el ubiquinol se ha demostrado que inhibe a la nitración de proteínas mitocondriales mediada por peroxinitrito [111]. Destacando la importancia de las defensas antioxidantes, la sobreexpresión de MnSOD mitocondrial y Prx protege contra la lesión del tejido y atenúa las modificaciones oxidativas en los componentes mitocondriales (por ejemplo, nitración de tirosinas proteicas) en diferentes modelos de enfermedad [112].

## 2.5.2 Protección exógena: Farmacología dirigida a la mitocondria

El reconocimiento de la mitocondria como centro de la bioenergética celular y organelo clave en la señalización oxidativa, en la apoptosis y estrés oxidativo, ha dado lugar al concepto de “farmacología dirigida a la mitocondria” [113]. Intrínsecamente, la farmacología antioxidante dirigida a la mitocondria se ha convertido en un área activa de investigación. Se han desarrollado varias estrategias para facilitar la captación activa y selectiva de moléculas por el compartimento mitocondrial, reduciendo así al mínimo la exposición del resto de la célula a altas dosis de antioxidantes exógenos y sus potenciales efectos adversos. Diferentes enfoques toman ventaja de características de la mitocondria que permiten el secuestro de antioxidantes activos dentro de estos organelos.

### 2.5.2.1 Mito Q

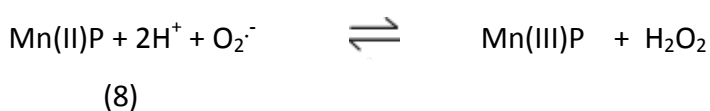
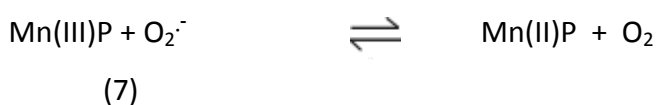
El mitoQ es un antioxidante dirigido a la mitocondria, que ha demostrado eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* y se encuentra actualmente en estudios de investigación clínica. El *MitoQ<sub>10</sub>* consiste en una molécula de la coenzima Q unida a un catión lipofílico trifenil fosfonio (TPP<sup>+</sup>), por una cadena de 10 carbonos saturada [114, 115]. Los cationes lipofílicos tienen dos características que los hacen eficaces en la liberación de antioxidantes u otras moléculas a las mitocondrias: pasan fácilmente a través de bicapas de fosfolípidos, debido a su alta hidrofobicidad, y se acumulan a causa de sus cargas positivas impulsadas por el potencial de membrana mitocondrial [116]. El *MitoQ<sub>10</sub>* es capaz de reaccionar con especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno e interrumpir la propagación de la peroxidación lipídica [117]. Este compuesto se está utilizando como un antioxidante dirigido a la mitocondria en muchos modelos de enfermedad en animales incluyendo, isquemia-reperfusión [118], disfunción inducida por la sepsis [119], y enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica [120]. Además del *MitoQ<sub>10</sub>*, existen otros compuestos que hacen uso de esta estrategia para ser dirigidos a la mitocondria (*SkQ1*, *mitoTEMPOL* [121], *mitoE* [122], entre otros) pero todos dependen de un potencial de membrana “normal” para acumularse. Por lo que es importante tener en cuenta que un exceso en la captación de cationes lipofílicos por la matriz, puede depolarizar la mitocondria [123, 124].

### 2.5.2.2 Péptidos SS

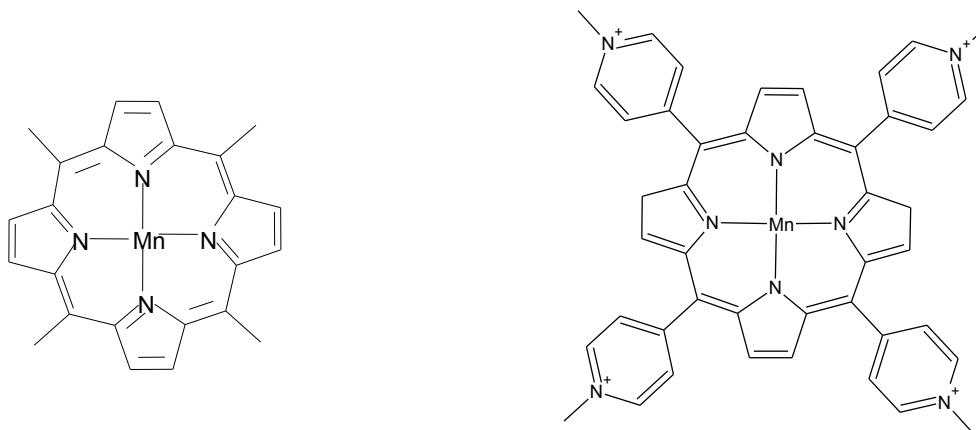
Otro ejemplo muy relevante de antioxidante dirigido a la mitocondria son los péptidos SS con actividad anti-apoptótica que se incorporan a la membrana interna mitocondrial, descubiertos de casualidad por Hazel H. Szeto y Peter W. Schiller [125]. Estudios iniciales demostraron que podían penetrar en una gran variedad de tipos celulares, podían atravesar la barrera hemato-encefálica y por microscopía confocal láser de un análogo del SS-02 que contenía un fluoróforo, observaron que tenía una distribución intracelular similar al Mitotracker TMRM, sugiriendo que el péptido se estaba dirigiendo a la mitocondria. Esta acumulación en la membrana interna (>85%) no depende del potencial mitocondrial, por lo que representa una ventaja cuando se trabaja con mitocondrias disfuncionales donde el potencial de membrana, en general, es bastante reducido. En este caso, las moléculas que contienen TPP<sup>+</sup> directamente no se incorporan en mitocondrias desacopladas y sí lo hacen los péptidos SS. Estos péptidos SS tienen actividad antioxidante intrínseca en la mitocondria, reduciendo la producción de ROS y la lipoperoxidación, debido a las tirosinas que contienen y también a la alta densidad electrónica en los anillos aromáticos [126, 127]. Por otra parte, también promueven la respiración mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado inhibidas (complejo I inhibido con MPP<sup>+</sup>) [128]. Una acción muy importante y directa de los péptidos SS sobre la cadena de transporte electrónico, es que inhiben el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) y el hinchamiento o swelling mitocondrial en mitocondrias aisladas tratadas con MPP<sup>+</sup>, reduciendo la liberación del citocromo c y su consecuente señalización para la apoptosis [98, 128]. La eficacia de estos péptidos SS ha sido evaluada in vivo en algunos modelos de enfermedad en animales y se observa que tienen alta eficacia reduciendo el estrés oxidativo mitocondrial [129]. Por lo que podrían intervenir directamente sobre los procesos de muerte celular, bloqueando el daño nitrooxidativo y evitando la alteración de la homeostasis mitocondrial.

### 2.5.2.3 Porfirinas de manganeso

Las porfirinas de manganeso (MnP) inicialmente fueron descritos como miméticos de la enzima superóxido dismutasa (SOD) por su capacidad de catalizar la dismutación del superóxido (Fridovich 1998) (Ec. 7 y 8). Sin embargo, la reactividad de estas moléculas es diversa y sus reacciones con otras especies reactivas biológicamente relevantes como peroxinitrito o sus radicales oxidantes derivados, como el radical carbonato, también han sido caracterizadas [130-132].



Los complejos porfirínicos constituyen el sitio activo en muchas proteínas críticas en los seres vivos y en la naturaleza (hemoglobina, mioglobina, citocromo c, familia de las P<sub>450</sub>, entre otras). Estos complejos son extremadamente estables y esta propiedad asegura la integridad del sitio que es donde las reacciones redox biológicamente relevantes ocurren (Fig. 9).



**Figura 9. Estructura de porfirinas de manganeso.** A la izquierda: estructura general de las porfirinas de manganeso. Derecha: Estructura de la MnTM-4-PyP. Fue la primera porfirina en que se estudió la actividad SOD. Extraído de [133].

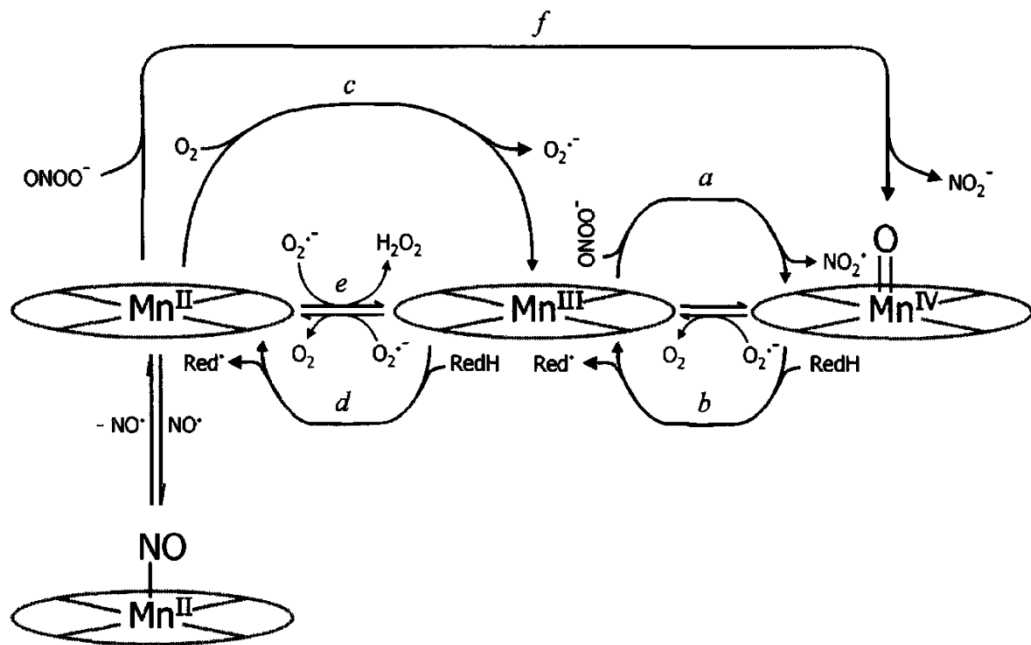
El manganeso de las porfirinas puede adoptar varios estados de oxidación *in vivo*, +2, +3, +4, +5, tanto aceptando como donando electrones y contribuyendo así a la

complejidad de su química biológicamente relevante. Las mismas propiedades cinéticas y termodinámicas que explican su actividad como SOD miméticos, les permiten reducir otras especies reactivas, como el  $\text{ONOO}^-$  [132], carbonato radical, ácido hipocloroso y radicales peroxilo entre otros. La reactividad con estas especies involucran la unión con el centro metálico preferentemente si este metal es deficiente en electrones ávido de unir ligandos donantes de electrones. Las porfirinas catiónicas como la Mn(III)*N*-alquillpiridil porfirina, pueden funcionar como atrapadores de peroxinitrito casi con la misma eficacia que lo hacen para superóxido.

El primer trabajo que describió la reactividad de las porfirinas con  $\text{ONOO}^-$  fue publicado en nuestro laboratorio por Ferrer-Sueta en el 1998 [130]. En ese trabajo se observó que en ausencia de reductores, el Mn en estado de oxidación +3 se une a  $\text{ONOO}^-$  y lo reduce por un electrón, formando radical  $\cdot\text{NO}_2$  y un complejo oxo-Mn (IV) (reacción *a*, Fig. 10). Por otra parte, se elucidaron las constantes de velocidad para la reacción con  $\text{ONOO}^-$  de una serie de isómeros de la MnTMPyP (manganeso (III) 5, 10, 15, 20 tetrakis (N-metilpiridil) porfirina) y estaban el orden de  $10^6$ - $10^7$   $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . El complejo oxo-Mn(IV) podía ser reducido nuevamente a Mn(III) por reductores de bajo peso molecular como el glutatión, ascorbato y urato, entre otros (reacción *b*, Fig. 10). Concentraciones muy bajas de MnTMPyP podían competir con  $\text{CO}_2$  por la reacción con  $\text{ONOO}^-$ , atrapando incluso una fracción del  $\text{ONOOCO}_2^-$  formado (producto de la reacción del  $\text{CO}_2$  con  $\text{ONOO}^-$ ). En conclusión, este ciclo que podría ocurrir con las porfirinas de oxidación por  $\text{ONOO}^-$  y re-reducción por reductores intracelulares, dejaba planteada una forma de redireccionar el potencial oxidativo del  $\text{ONOO}^-$ , protegiendo blancos celulares más críticos como las proteínas y los ácidos nucleicos [134].

Posteriormente Ferrer-Sueta describió la reactividad del  $\text{CO}_2$  con Mn(II)P [132]. Observó en un modelo celular que a bajas tensiones de oxígeno y presencia de componentes celulares como los reductores de bajo peso molecular, se favorecía la generación de Mn(II)P (reacción *d*, Fig. 10). En este estado de oxidación Mn(II), las porfirinas tienen mayor potencial antioxidante que en estado Mn(III) debido a que puede reaccionar y atrapar más rápidamente oxidantes radicalares como el  $\text{CO}_3^-$  (ca  $k = 10^9$   $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) y reducir oxidantes como el  $\text{ONOO}^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de reacciones que involucran transferencia de 2 electrones, por lo tanto llevando a productos inocuos para la célula y sin producir radicales secundarios como el  $\cdot\text{NO}_2$  (reacción *f*, Fig. 10).

A continuación, se estudió la reactividad de las Mn(II)P con  $\text{ONOO}^-$  en partículas submitocondriales (PSM) [135]. Las enzimas de la cadena respiratoria (complejo I y II), además de consumir el  $\text{O}_2$  del medio podían reducir a las porfirinas de Mn(III)P a Mn(II)P, manteniendo el ciclo redox y un estado estacionario de Mn(II). Otras flavoenzimas también reducen a las porfirinas como la xantino oxidasa o glucosa oxidasa. En estado de oxidación +2 la reacción con  $\text{ONOO}^-$  ocurre con una constante de velocidad del orden de  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (pH=7,25 y  $37^\circ\text{C}$ ), y produce Mn(IV) y  $\text{NO}_2^-$ . Este mecanismo desvía el carácter oxidante del  $\text{ONOO}^-$  y por lo tanto protege los componentes mitocondriales de la oxidación o inactivación por  $\text{ONOO}^-$  [135] (Fig. 10).



*Figura 10. Reacciones de las Porfirinas de manganeso con reductores biológicos y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno in vivo. La reacción b puede ser llevada a cabo por reductores de bajo peso molecular como, ascorbato o urato, la reacción d puede darse ser catalizada por glutatión, ascorbato y más interesante, flavoenzimas (dentro de las cuales están los complejos I y II de la mitocondria). Extraído de [131, 135].*

A pesar de esta virtud de las porfirinas de actuar como antioxidantes naturales, también pueden tener efectos pro-oxidantes importantes. Las Mn(II) porfirinas pueden unir oxígeno y reducirlo a superóxido o peróxido de hidrógeno. Y cuando las Mn(III) reducen al  $\text{ONOO}^-$  se produce  $\cdot\text{NO}_2$  que es un potente agente nitrante.

Para conocer más sobre los efectos que ejercían las porfirinas *in vivo* se desarrollaron técnicas que trataron de estudiar la acumulación de estos compuestos en los tejidos, células y compartimentos subcelulares. Algunos métodos fueron más eficaces que otros, pero los estudios con LCMS/MS mostraron ser los más rápidos y directos, siendo usado en estudios de farmacocinética [136]. Las porfirinas catiónicas están favorecidas a acumularse en la mitocondria gracias al potencial de membrana mitocondrial y se incrementa cuando el compuesto es más lipofílico, de hecho esa es la clave para el desarrollo de compuestos dirigidos a la mitocondria que se está explotando en la actualidad [116]. Es importante destacar que a concentraciones bajas de porfirinas del entorno de 5  $\mu\text{M}$  se demostró la protección del daño mediado por peroxinitrito [135, 137].

Actualmente el área está enfocada en cómo optimizar la incorporación de estos compuestos y sus acciones antioxidantes en la mitocondria para mejorar sus efectos farmacológicos en condiciones cuando se produce un aumento en la formación de peroxinitrito mitocondrial [138].

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Evaluación de sondas y moléculas con capacidad antioxidante para el estudio de la formación de peroxinitrito y su impacto en la función mitocondrial a través de procesos de nitración y oxidación proteica

### **3.2 Objetivos específicos**

- 3.2.1 Detectar la formación de peroxinitrito en partículas submitocondriales mediante sondas quimioluminiscentes, fluorescentes e inmunoquímicas.
- 3.2.2 Evaluar la química oxidativa del peroxinitrito en la membrana mitocondrial a través del uso de una sonda hidrofóbica análogo de tirosina (BTBE).
- 3.2.3 Estudiar la incorporación, reducción y actividad redox de las MnP en mitocondrias, partículas submitocondriales y células endoteliales, expuestas a peroxinitrito y su efecto protector frente al estrés nitrooxidativo mitocondrial.

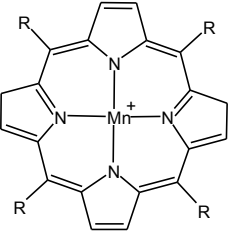
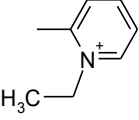
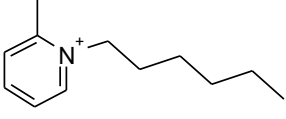
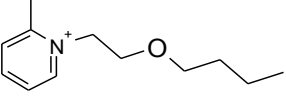


## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

Todos los reactivos fueron obtenidos de Fuentes comerciales estándar y usados como se recibieron excepto cuando se especifique lo contrario. Los compuestos quimioluminiscentes como el luminol y la celenterazina fueron obtenidos de Sigma y Calbiochem, respectivamente. La dihidrorodamina -123 (DHR) fue obtenida de Molecular Probes-Invitrogen (Eugene, OR). NOC-7 y 5,5-dimetil-1-pirrolin-N-óxido (DMPO) fue obtenida de Dojindo Laboratories. Los anticuerpos anti- aductos proteína –DMPO fueron gentilmente suministrados por Dr. Ronald P. Mason del National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC [139]. Ácido cumarina-7-borónico (CBA) fue sintetizado como se describe previamente en [140]. Citocromo c acetilado fue preparado como se describe previamente en [141]. El *N-t*-BOC-tert butil ester L-tirosina (BTBE), y los estándares para HPLC, 3-nitro *N-t*-BOC-tert butil ester L-tirosina (3NO<sub>2</sub>-BTBE), 3,3'-di- *N-t*-BOC-tert butil ester L-tirosina (diBTBE), fueron sintetizados y provistos a través de una colaboración por B. Kalyanaraman, del Medical College of Wisconsin, USA. El medio de cultivo para las células endoteliales bovinas (M199) y el suero fetal bovino (FBS) fueron obtenidos de GIBCO (Invitrogen, Grand Island, NY). El suero bovino suplementado con hierro fue obtenido de Hyclone (Logan UT). El medio M199 sin rojo fenol utilizado fue obtenido de Sigma (St. Louis, MO). Para los ensayos de citometría de flujo utilizamos Alexa Fluor 546-conjugado con Streptavidina de Molecular Probes-Invitrogen (Eugene, OR).

Las MnP usadas difieren en su estructura y propiedades fisicoquímicas y se listan en la tabla a continuación (Tabla III). La MnTE-2-PyP<sup>5+</sup>, Mn(III) Mn(III) tetrakis (2-*N*-etilpiridil) porfirina (5+) y MnTnHex-2-PyP<sup>5+</sup>, Mn(III) tetrakis (2-*N*-(*n*-hexil) piridil) porfirina (5+) y MnTnBuOE-2-PyP, Mn(III) tetrakis (2-*N*-butoxi-etilpiridil) porfirina (5+) [142].

Estructura General	Sustituyente (-R)	Abreviatura	Nombre
		Mn(III)TE-2-PyP	Manganeso (III) tetrakis (2-N-etilpiridil) porfirina (5+)
		Mn(III)THex-2-PyP	Manganeso (III) tetrakis (2-N-(n-hexil) piridil) porfirina (5+)
		Mn(III)TnBuOE-2-PyP	Manganeso (III) tetrakis (2-N-butoxietiletilpiridil) porfirina (5+)

*Tabla III. Porfirinas de manganeso utilizadas en esta tesis. Gentilmente cedidas por Dra. Inés Batinić-Haberle del Department of Radiation Oncology, Duke University Medical Center, USA.*

## 4.2 Extracción y purificación de mitocondrias de corazón de rata

Se trabaja con mitocondrias de corazón de ratas adultas, Wistar, machos de aproximadamente 300–350 g, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina. Los animales son anestesiados, con pentobarbital intraperitoneal, 40 mg/K, en dosis única. Luego se realiza una incisión torácica, seguida de la extracción rápida del corazón. Estos corazones se lavan extensivamente con medio de purificación y se cortan en trozos bien pequeños. Luego se pasan por un cortador de tejidos con el tamaño de corte calibrado. Los fragmentos de tejido se homogeneizan en un homogenizador de vidrio y teflón en el medio de purificación que contiene: 0.3 M de sacarosa, 5 mM Mops, 5 mM fosfato de potasio, 1 mM EGTA, 0,1% BSA. El homogeneizado se centrifuga a 1500 g y se descarta el pellet en donde quedan restos de tejido, células enteras y núcleos. El sobrenadante se centrifuga a 12000 g, y se obtiene un pellet que corresponde a la fracción enriquecida en mitocondrias. Este pellet se resuspende en un volumen mínimo de medio de purificación, y se miden proteínas por el método de Bradford, obteniéndose una concentración de 25-30 mg de proteínas/mL [143].

### **4.3 Preparación de partículas submitocondriales (PSM)**

Las PSM se preparan por sonicación, esto produce el efecto de invertir la orientación de la membrana interna mitocondrial. Se parte de las mitocondrias obtenidas mediante el procedimiento anterior. Una vez purificadas las mitocondrias y en una concentración de proteínas mitocondriales de 20 mg/mL, se procede a su congelado y descongelado tres veces. Luego se sonicán a 4°C a razón de 5 ciclos de 5 segundos. Luego se ultracentrifugan a 100.000 g por 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspende en el mínimo volumen y se guarda a -80°C para su posterior uso.

### **4.4 Síntesis de peroxinitrito**

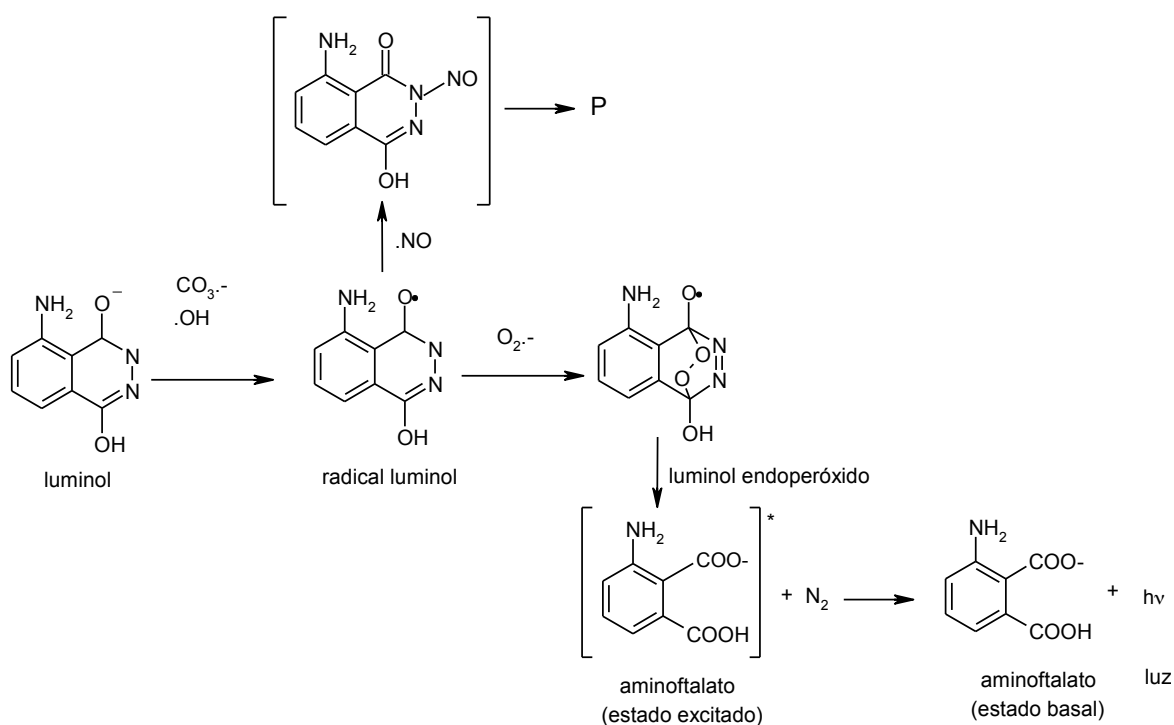
El peroxinitrito se sintetiza en nuestro laboratorio, a partir de un reactor de flujo detenido a partir de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), en condiciones ácidas. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanente de la síntesis fue eliminado por tratamiento de las soluciones de peroxinitrito con dióxido de manganeso. La concentración de peroxinitrito se determina diariamente por espectrofotometría a 302 nm ( $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). El porcentaje de nitrito fue siempre menor al 30% [144].

### **4.5 Óxido nítrico, preparación, cuantificación y utilización**

Las soluciones de óxido nítrico fueron preparadas a partir de burbujear lentamente  $^1\text{NO}$  gas por 10 minutos en una burbuja de vidrio conteniendo 5M NaOH, y atrapándolo en un tubo de vidrio de muestra con agua desionizada y desoxigenada. La concentración que se obtiene de esta forma está en el rango de 1.5 mM, cerca de los niveles de saturación a 25°C. Las soluciones stock de NOC-7 (1 a 10 mM) de Alexis fueron preparadas en 0.1 M de NaOH. Los flujos de  $^1\text{NO}$  fueron cuantificados siguiendo la oxidación de oxi-hemoglobina a meta-hemoglobina a 577 y 630 nm, de acuerdo con [145] (como ejemplo 1, 3, 6, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  corresponde a flujos lineales entre 5-8 min de 0.1, 0.3, 0.45, 0.7, 1.4, 2.4  $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$  a 37°C, respectivamente).

## 4.6 Medidas de quimioluminiscencia

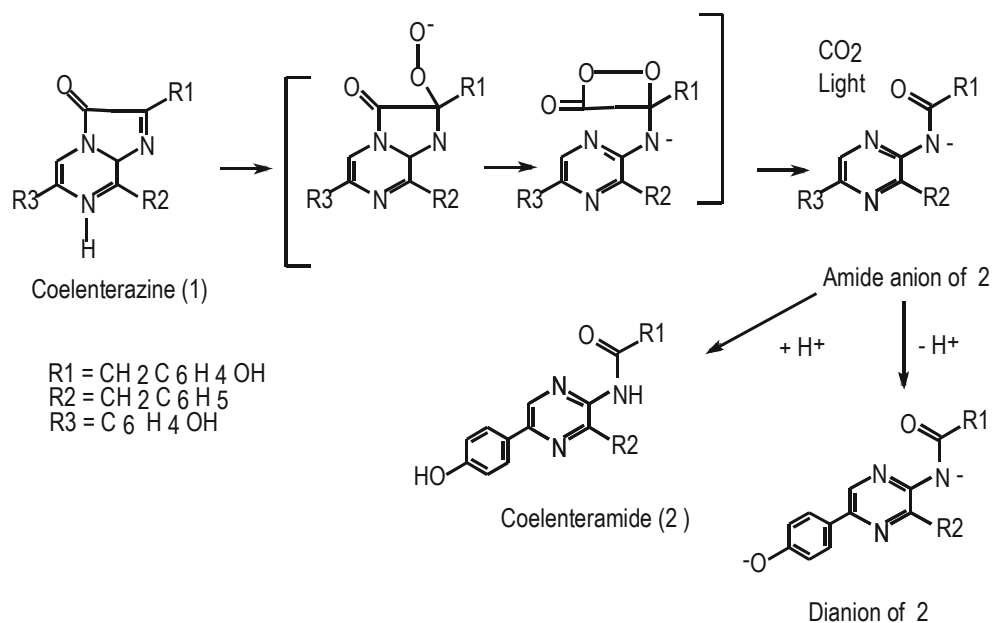
El luminol y la celenterazina fueron usadas como sondas quimioluminiscentes, ambos compuestos han sido usados para la detección de una amplia variedad de oxidantes, incluyendo ONOO y radicales del oxígeno formados en sistemas biológicos (como  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) [146-150] y llevan a la formación de especies excitadas a través de rutas que involucran intermediarios radicalares que decaen emitiendo luz.



**Figura 11. Quimioluminiscencia del luminol.** Se muestra que tanto el radical carbonato, como el  $\cdot\text{OH}$  pueden promover oxidaciones por un electrón del luminol para dar el luminol radical, que luego reacciona con  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para seguir la ruta luminiscente. Bajo condiciones de exceso de  $\cdot\text{NO}$ , el radical luminol rinde intermediarios y productos (P) que siguen una ruta oscura. Extraído de [78].

El luminol se prepara en solución stock de 1 mM en agua y se ajusta el pH a 8.0 con NaOH 1.0 N. La celenterazina se prepara en etanol y su concentración es determinada espectrofotométricamente a 427 nm ( $\epsilon=7400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La quimioluminiscencia fue monitoreada en un luminómetro *Thorn Emi photon counter*, equipado con un

fotomultiplicador. La reacción se lleva a cabo en tubo de reacción de 3-5 mL, a 37°C con agitación continua.



**Figura 12. Quimioluminiscencia de la celenterazina.** El mecanismo involucra una descarboxilación oxidativa con la consecuente apertura del anillo de imidazol, liberándose  $\text{CO}_2$  en simultáneo con la emisión de luz por la celenteramida a 470 nm. Extraído de [148].

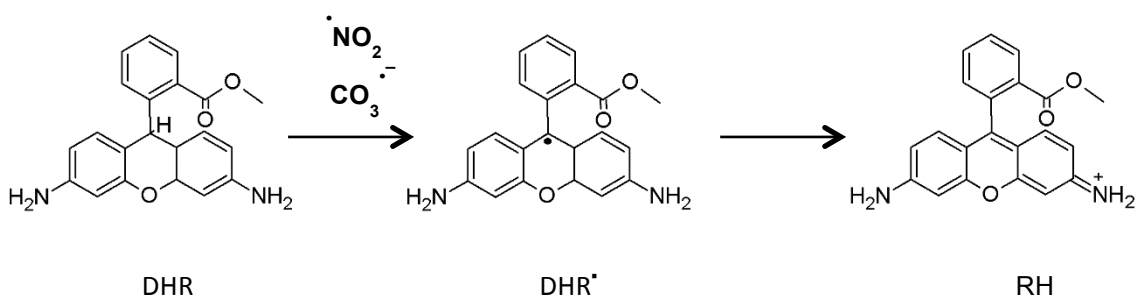
#### 4.7 Medida de la formación de superóxido en PSM

La formación de superóxido fue cuantificada por dos métodos independientes, 1) la reducción de citocromo c acetilado ( $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , [141]) y 2) la detección fluorimétrica de  $\text{H}_2\text{O}_2$  derivado de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  mediante la oxidación de Amplex Red [151]. Los flujos máximos fueron obtenidos cuando se suplementa a las PSM o mitocondrias con succinato o NADH (como sustratos respiratorios) y antimicina A (AA, como inhibidor) que inhibe a nivel del complejo III [40]. Se calibró cada uno de estos métodos de detección con el sistema xantina/ xantina oxidasa y glucosa/ glucosa oxidasa, como se describe en trabajos previos [146, 152].

## 4.8 Medidas de fluorescencia para la detección de $\text{ONOO}^-$ , DHR-123 y

### CBA

La oxidación de DHR-123 a rodamina (RH), fue utilizada para evaluar la formación de  $\text{ONOO}^-$  en PSM bajo diferentes condiciones experimentales (con sustratos respiratorios, AA y NOC-7) [79], [146]. La RH se obtiene luego de dos oxidaciones secuenciales por un electrón de la DHR-123 por parte de los derivados radicalares del  $\text{ONOO}^-$  (por lo que también hay radicales intermediarios de la DHR-123 involucrados) [153].

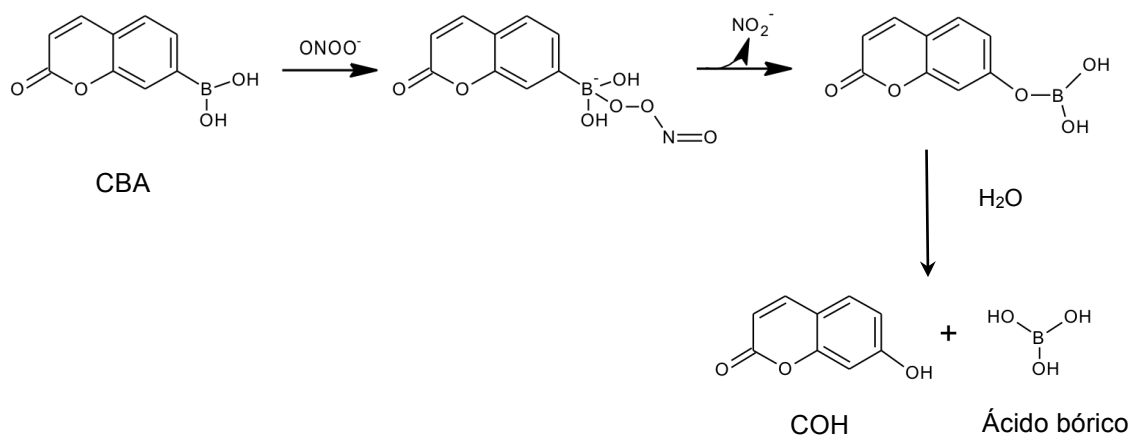


*Figura 13. Fluorescencia de la DHR-123. La DHR ha sido muy utilizada para la detección de oxidantes y especies reactivas. La rodamina, el producto oxidado es fluorescente ( $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ). Los radicales derivados del  $\text{ONOO}^-$  pueden catalizar la formación de Rodamina a través de oxidaciones consecutivas por un electrón que tienen como intermediario a un radical de la DHR [153].*

La formación de RH después de exponer a diferentes condiciones, es seguida a través de un fluorímetro de placas (Fluostar, BMG Lab Technologies, Germany) con agitación continua orbital a  $37^\circ\text{C}$  por 20 minutos, con  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ . La pendiente representa la velocidad de oxidación de DHR-123 y fue determinada en los primeros 3-5 minutos.

La formación de  $\text{ONOO}^-$  fue evaluada también con CBA. El CBA reacciona de manera rápida y directa con  $\text{ONOO}^-$  ( $k = 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) rindiendo el producto hidroxilado, 7-hidroxicoumarina (COH) que puede ser seguido a  $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$  [140] en un lector fluorescente de placas como el que comentamos antes y en las mismas

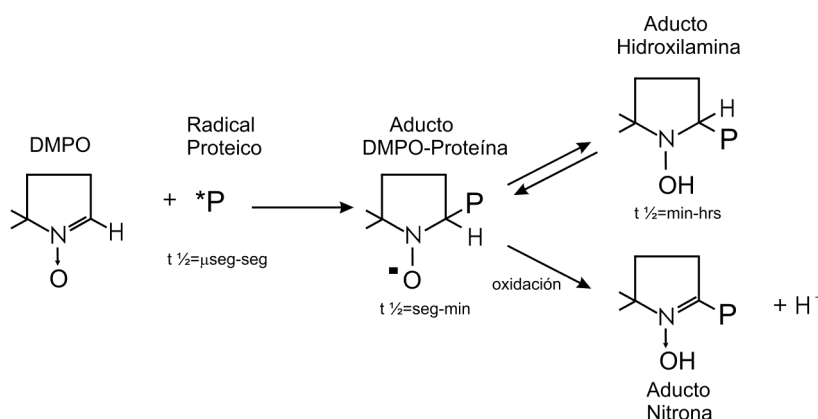
condiciones, agitación continua orbital a 37°C por 20 minutos, con filtros a  $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ . La pendiente también representa la velocidad de oxidación de CBA en los primeros 3-5 minutos.



*Figura 14. Oxidación de CBA por  $\text{ONOO}^-$ : El ácido coumarin-7- borónico (CBA), reacciona de manera directa y rápida con  $\text{ONOO}^-$ , oxidándose a un intermediario que libera nitrito y se deshidrata formando 7-hidroxycumarina (COH) y ácido bórico [140].*

#### 4.9 Detección inmunoquímica de nitrotirosinas proteicas y de aductos proteína-DMPO

Las muestras proteicas (30-40  $\mu\text{g}$ ) fueron separadas en geles de poliacrilamida 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa toda la noche a 100 mA y 4°C con agitación continua. La detección de 3-nitrotirosina (1:2000) fue llevada a cabo con un anticuerpo específico policlonal anti-nitrotirosina sintetizado en nuestro laboratorio como se describió previamente en [154]. Para la detección de aductos proteína-DMPO se utiliza un anticuerpo policlonoal específico anti-aductos proteína con DMPO 1:5000.

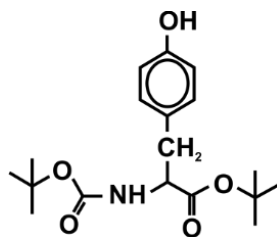


**Figura 15. Detección inmunoquímica de radicales proteicos con DMPO.** El DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolin N-óxido) reacciona con un radical proteico (\*P) y para formar el aducto DMPO-proteína radical que es inestable (intermediario que da la señal de EPR), este aducto decae rápidamente oxidándose y dando lugar a un aducto nitrona estable que es detectado por el anticuerpo específico [139].

#### 4.10 Incorporación del BTBE en mitocondrias y su extracción

Debido a que la mayoría de los procesos de nitración y oxidación por  $\text{ONOO}^-$  en la mitocondria, tienen lugar en el entorno hidrofóbico (en la membrana mitocondrial interna), utilizamos una sonda hidrofóbica análogo de tirsoina, el *N-t*-BOC-L-tirosina *tert*-butil éster (BTBE), que es estable y ha sido eficientemente incorporado en liposomas de fosfatidilcolina en nuestro laboratorio [155]. De esta manera, se ha podido estudiar los factores fisicoquímicos y bioquímicos, que controlan la nitración de tirosinas dependiente de  $\text{ONOO}^-$  en bicapas lipídicas. El BTBE preparado en DMSO se incorpora a la máxima concentración de proteínas mitocondriales obtenida en la purificación. El porcentaje de BTBE incorporado será el cuantificado luego de dos lavados de la fracción mitocondrial. El BTBE y sus productos derivados (nitro-BTBE y di-BTBE) se extraen de las mitocondrias con cloroformo, metanol y NaCl 5M en las siguientes proporciones: 1:2:4:0,4 (muestra:metanol:cloroformo:NaCl). Se centrifugan las muestras a 10000 g por 10 minutos, y se descarta la fase acuosa. La fase clorofórmica que contiene el BTBE extraído, se evapora con Argón. Luego se resuspenden en una mezcla 85%metanol y 15%KPi 15 mM, pH 3. Modificado de [96].

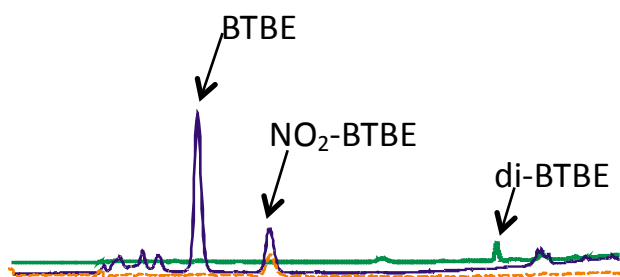




**Figura 16. BTBE.** Estructura del BTBE, N-t-BOC-L-tirosina tert- butil ester.

#### 4.11 Análisis por HPLC del BTBE

El BTBE, y sus productos de oxidación, nitro-BTBE, di-BTBE se separan en un sistema de High Performance Liquid Chromatography (HPLC), equipado con un detector UV-vis y otro fluorescente, en una columna de fase reversa con fases móviles como se detalla en [155]. En la figura XX se muestra un cromatograma típico de productos del BTBE:



**Figura 17. Cromatograma de RP-HPLC representativo de los productos del BTBE luego de la adición de ONOO<sup>-</sup> (1 mM) en liposomas.** Luego de la extracción orgánica, los productos se separan por RP-HPLC. Se muestra la elución del BTBE, 3-nitro-BTBE y di-BTBE. El BTBE absorbe en el UV-Vis a 280 nm, el nitro-BTBE absorbe además a 360 nm, el di-BTBE se detecta fluorimétricamente a 294 y 401 nm (longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente). Extraído de [155].

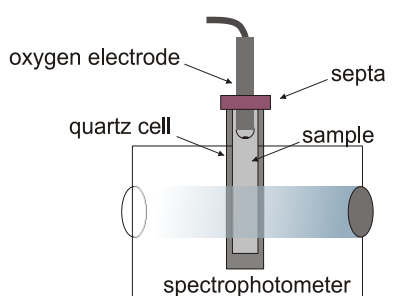
#### 4.12 Cuantificación de malondialdehído (MDA) por TBARs para estimar lipoperoxidación

El MDA, uno de los productos de la lipoperoxidación, fue cuantificado a través de TBARs (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico) a 532 nm ( $\epsilon = 150,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) como se describió previamente en [156]. La curva de calibración y medidas del contenido de MDA fueron realizadas con cantidades conocidas de MDA obtenidas por

hidrólisis del 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) en 20% ácido acético y SDS 8.1%. Para prevenir la peroxidación de lípidos durante el ensayo se agrega BHT 2.5% (hidroxitolueno butilado).

#### 4.13 Medida simultánea del nivel de oxígeno y la reducción de porfirinas de manganeso por la cadena de transporte electrónico

La reducción de Mn(II) porfirinas por PSM fue seguida por espectrofotometría en un espectrofotómetro Cary 50 UV-Vis y los niveles de oxígeno fueron medidos con un electrodo de oxígeno de Clark. A la mezcla de reacción conteniendo MnP (1-5  $\mu$ M), PSM (0.1 -0.5 mg/mL), succinato (1.5 mM) o NADH (1 mM) en buffer de homogeneización o buffer isotónico pH 7.4, fue incubada a 37 °C y su espectro UV-Vis tiempo –dependiente fue monitoreado entre 350 a 600 nm o a 439 y 454 nm para seguir directamente el proceso de reducción de las MnP. Los niveles de oxígeno fueron medidos con un electrodo de oxígeno inserto en la cuveta del espectrofotómetro (Fig. 18). Esta cuveta es cuidadosamente sellada con un septo de goma, para prevenir que se de intercambio de oxígeno con el ambiente. Así se miden en simultáneo la reducción y el consumo de oxígeno mitocondrial. Se realizaron experimentos control para validar este *setup* con flavoenzimas como glucosa oxidasa o xantina oxidasa, que reducían la porfirina de Mn(III)P a Mn(II)P como ya se describió en [135].



*Figura 18. Setup de la medida simultánea del consumo de oxígeno y reducción por espectrofotometría de las PSM con MnP en presencia de sustratos respiratorios. Se inserta el electrodo de Clark en la cuveta del espectrofotómetro, sellada con un septo de goma que impide el intercambio de oxígeno.*

#### **4.14 Inactivación del complejo I dependiente de $\text{ONOO}^-$ : efecto antioxidante de las porfirinas de manganeso**

La respiración mitocondrial dependiente de complejo I fue monitoreada a través del consumo de oxígeno utilizando con respirómetro de alta resolución, Oroboros Oxygraph-2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) y midiendo la actividad NADH deshidrogenasa por espectrofotometría [76]. Estos experimentos fueron realizados a 37 °C con 0.1 mg/mL PSM, 1 mM NADH, 5  $\mu\text{M}$  MnP en PBS. Para las medidas de oxígeno, luego de que se estabiliza el respirómetro, se agregan las PSM, luego el NADH. La pendiente inicial de consumo de oxígeno representa la respiración control para cada condición. Una vez que se obtiene una pendiente medible, se inicia una infusión de  $\text{ONOO}^-$  de 50  $\mu\text{M}/\text{min}$  por 3 minutos mediante infusores acoplados al respirómetro. Cuando cesa la infusión, la cámara se abre para reoxigenar el sistema (hasta aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{O}_2$ ) y se vuelve a cerrar, se agrega NADH para evitar depleción del sustrato. Se obtiene entonces una segunda pendiente de consumo de oxígeno para este mismo sistema de reacción (Fig. 31A). Como se indica en algunos resultados, las muestras de estos experimentos son colectadas, ultracentrifugadas y analizadas por técnicas inmunoquímicas para detección de tirosinas nitradas o aductos DMPO-proteínas. Para las medidas de actividad, se usa un protocolo de exposición a  $\text{ONOO}^-$  similar a los anteriores, y luego de la infusión se diluye la muestra a 0.1 mg/mL, se agrega NADH (200  $\mu\text{M}$ ) y se sigue la reducción de ferricianuro (0.5 mM) en presencia de rotenona (5  $\mu\text{M}$ ) a 420 nm [76].

#### **4.15 Cultivo celular**

Células endoteliales aórticas bovinas (BAECs) se extrajeron a partir de una aorta bovina obtenida en un frigorífico local (Frigorífico Carlos Schneck) como se ha descrito previamente en [157]. Todos los experimentos se realizaron en cultivos de BAECs con un 95% de confluencia de los pasajes de 4 a 14. Para todos los experimentos que implican a las BAECs, el SBF se redujo al 0,5% (% vol / vol) 24 h antes del tratamiento con las condiciones diferentes experimentales.

#### **4.16 Microscopía confocal Raman**

La espectroscopía Raman analiza las vibraciones de una molécula después de la excitación con un haz de luz monocromática (láser). La luz dispersada por la muestra se recoge y se separa en diferentes energías lo que da un espectro Raman, que contiene abundante información sobre las propiedades químicas y físicas de la muestra. Utilizamos un microscopio confocal (Olympus BX40) adosado a un espectrómetro Raman de alta resolución espectral (Jobin Yvon XY-800), equipado con una red de difracción de 1800 l/mm, detector CCD refrigerado por N<sub>2</sub> líquido, slit y abertura confocal motorizadas y cámara de video. La radiación Rayleigh se realiza con filtros Notch o Edge. El microscopio cuenta con diferentes objetivos de alta apertura numérica. Se cuenta con diferentes láseres de excitación: Nd:YAG (Cobolt Samba) y argón con líneas de excitación entre el azul y el verde y un láser de kriptón que agrega líneas de excitación en el rojo y el violeta. Este procedimiento se realizó en el marco de una pasantía financiada por CEBEM en el Laboratorio del Dr. Daniel Murgida del Laboratorio de Biofísicoquímica, Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física/INQUIMAE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

#### **4.17 Procedimientos generales**

Todos los experimentos reportados aquí fueron reproducidos por lo menos 3 veces y los resultados mostrados corresponden a uno representativo de cada uno, a no ser que se indique lo contrario. Las gráficas y ajustes matemáticos de los datos experimentales se realizaron usando OriginPro 8 (OriginLab Corporation).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Detectar la formación de ONOO<sup>-</sup> en partículas submitocondriales mediante sondas quimioluminiscentes, fluorescentes e inmunoquímicas

#### 5.1.1 Evidencia de la formación de peroxinitrito en partículas submitocondriales expuestas a <sup>•</sup>NO

La oxidación de luminol produce un intermediario quimioluminiscente que permite la detección de peroxinitrito en sistemas biológicos con alta sensibilidad [78]. En efecto, la quimioluminiscencia de luminol (QLL) inducida tanto por O<sub>2</sub><sup>•-</sup> como por peroxinitrito se evaluó previamente en nuestro grupo [146, 147]; en esos trabajos se demostró que el peroxinitrito puro induce la QLL y que la QLL inducida por O<sub>2</sub><sup>•-</sup> inicialmente se inhibe frente a la adición de un exceso de <sup>•</sup>NO por la captura de los derivados radicalares del luminol, y luego es seguido de un característico “aumento abrupto” de la emisión de luz correspondiente con la QLL peroxinitrito-dependiente. En este trabajo, hemos analizado la QLL para establecer la formación de peroxinitrito por PSM.

En la figura 19, se evaluó la producción de peroxinitrito por las PSM (0,5 mg/mL) expuestas a <sup>•</sup>NO. Las PSM se incubaron con luminol durante 5 minutos bajo agitación continua a 37°C. Inicialmente, se añadió succinato y no se obtuvo emisión de luz. A continuación, se agregó antimicina A y la QLL fue estimulada. El radical superóxido favorece la oxidación del luminol a un endoperóxido del luminol inestable, que decae emitiendo luz [78]. El flujo máximo de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por parte de las PSM se estimó en 1.9 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, que se traduce en un rango de 1 a 1.4 μM/min en el sistema bajo estudio (0.5 – 0.75 mg/ml). La adición de un bolo de <sup>•</sup>NO (6 μM) a la suspensión, mostró una inhibición transitoria de la QLL, seguido por un aumento abrupto (overshoot) en la emisión de luz indicativo a la formación de peroxinitrito [146] por las PSM, que se estabiliza a valores de QLL mayores que el inicial dependiente de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, esto es debido a que se estimula la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mitocondrial, debido al daño del peroxinitrito sobre los componentes de la cadena de transporte de electrones [76]. La QLL resulta

totalmente inhibida por la adición de SOD (2  $\mu\text{M}$ ), involucrando al  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en el mecanismo de quimioexcitación (Fig. 19A).

En la figura 19B, se representan con barras los niveles en el estado estacionario de QLL en PSM expuestas a succinato y antimicina A, en diferentes condiciones. Un aumento de la QLL de manera dosis-dependiente se obtuvo cuando el donador de  $\cdot\text{NO}$ , NOC-7, se añadió hasta 3  $\mu\text{M}$  (es decir, 0.3  $\mu\text{M}$  / min  $\cdot\text{NO}$ ), pero a la mayor concentración de 6  $\mu\text{M}$  NOC-7 (0.45  $\mu\text{M}$  / min de  $\cdot\text{NO}$ ), la inhibición de la QLL era compatible con el destino preferencial de las especies derivadas del luminol hacia "rutas oscuras" frente al exceso de  $\cdot\text{NO}$  [146]. Por otra parte, el atrapador de peroxinitrito, la metionina ( $k = 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) o la SOD también inhibieron la QLL.

Fig. 19A

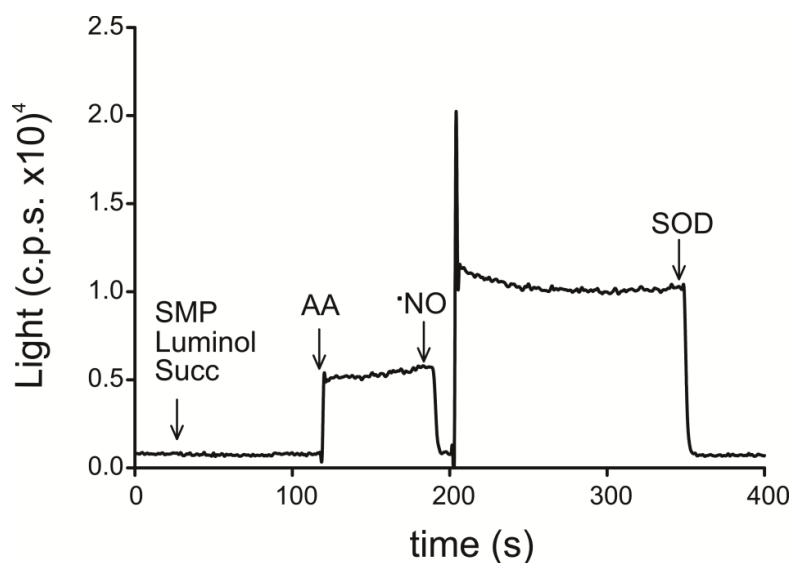
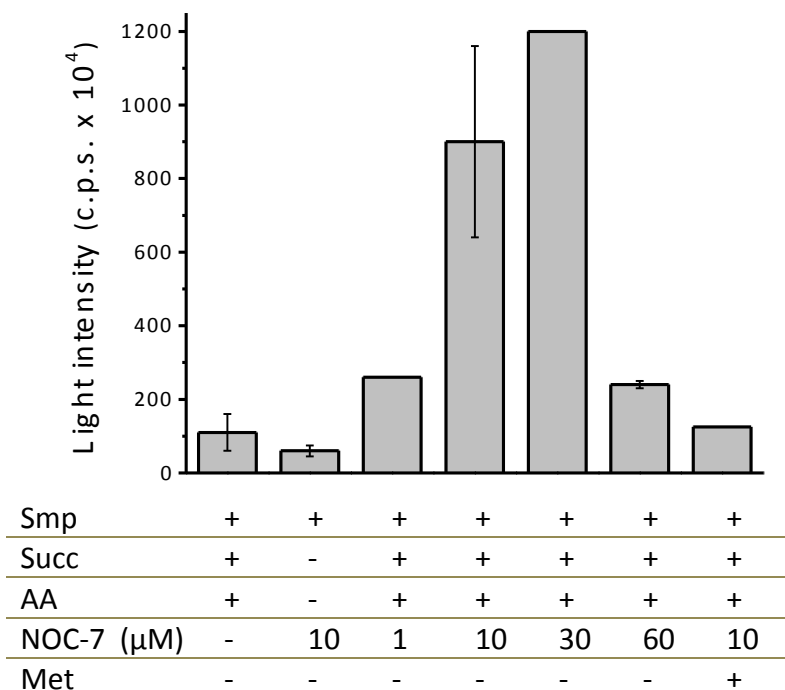


Fig. 19B



**Figura 19. Quimioluminiscencia del luminol inducida por las PSM y efecto del óxido nítrico. A)** Las PSM (0.5 mg/mL) se incubaron con luminol (400  $\mu\text{M}$ ) en PBS isotónico a 37°C. Las flechas indican el momento en que los diferentes reactivos succinato (succ, 6 mM), antimicina A (AA, 2  $\mu\text{M}$ ), \*NO (6  $\mu\text{M}$ ), y la superóxido dismutasa (SOD, 2  $\mu\text{M}$ ) se añadieron a la mezcla de reacción. Este experimento se realizó en el contador Thorn Emi fotón por cuatuplicado con resultados similares; aquí se muestra una curva representativa. B) Las PSM (0.5 mg/mL) se incubaron

*PBS con 400  $\mu\text{M}$  luminol y distintos compuestos como se indica: succinato (succ, 6 mM), antimicina A (AA, 2  $\mu\text{M}$ ), y diferentes concentraciones de NOC-7; 10  $\mu\text{M}$  metionina (MET) se añadió en presencia de 10  $\mu\text{M}$  NOC-7. Las barras representan la quimioluminiscencia máxima alcanzada en cada estado en un LabTechnologies LUMIstar Galaxy BMG.*

Las PSM también fueron capaces de inducir la quimioluminiscencia de la celenterazina (QLC) (Fig. 20A). Es interesante que la adición de succinato a las PSM indujera la QLC, evidenciando niveles "basales" de generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , lo cual era compatible con una mayor sensibilidad de la sonda en comparación con el luminol. Además, la adición de antimicina A causó un gran aumento en la QLC, esperable debido a un aumento en la formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por las PSM. Al igual que lo observado con la QLL, la adición de un bolo de  $^{\cdot}\text{NO}$  resultó en una inhibición transitoria seguida de un aumento en la QLC (overshoot), de acuerdo a lo reportado en nuestro laboratorio, donde la QLC fue inducida por el sistema xantina/xantina oxidasa y modulada por niveles de  $^{\cdot}\text{NO}$  [149]. La evidencia de la formación de peroxinitrito en PSM expuestas a  $^{\cdot}\text{NO}$  mediante QLC se confirmó además por el efecto inhibitorio que ejerce la pre-incubación con metionina en el perfil de emisión de la QLC después de la adición de  $^{\cdot}\text{NO}$  (Fig. 20B). Es importante tener en cuenta que la celenterazina no reacciona directamente con peroxinitrito, sino que lo hace con radicales derivados del peroxinitrito en base a experimentos de flujo detenido (Valez *et al*, datos sin publicar).



Fig. 20A

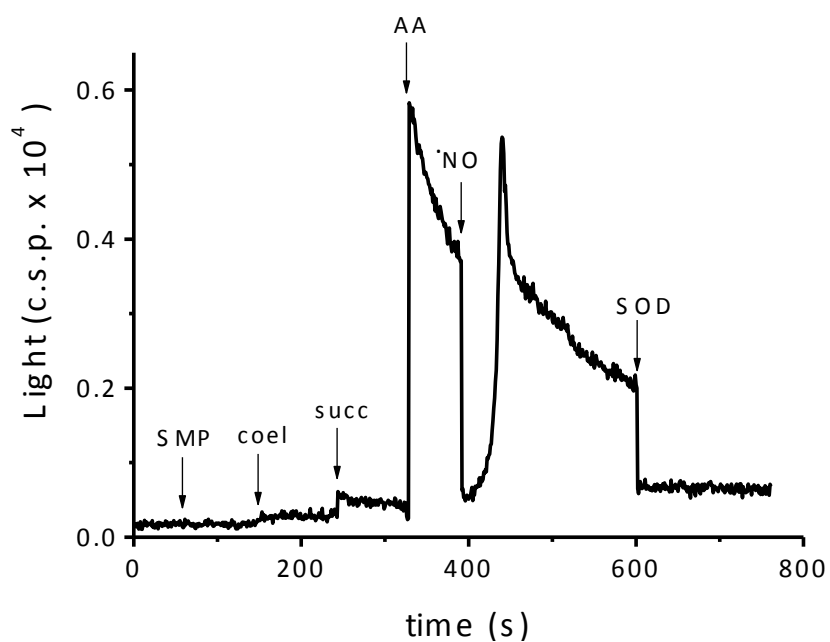
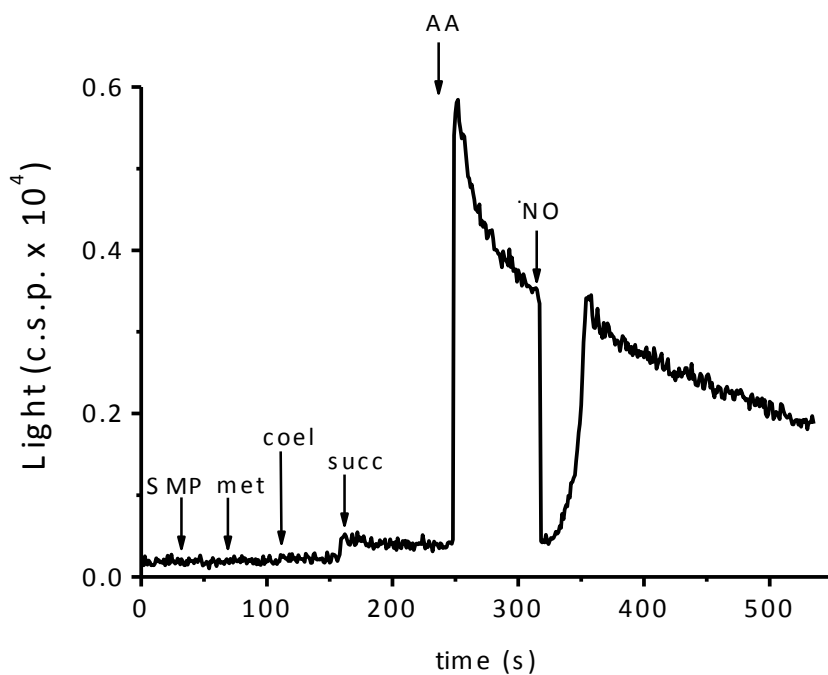


Fig. 20B



**Figura 20. Quimioluminiscencia de la celenterazina (QLC) inducida por PSM expuestas a óxido nítrico.** A) Las PSM (0.5 mg/mL) se incubaron con celenterazina (1 mM) en PBS a 37°C. Las flechas indican el orden de adición a la mezcla de reacción de sustrato (succ, 6 mM), antimicina A (2  $\mu$ M), un bolo de  $\cdot$ NO (6  $\mu$ M) y SOD (2  $\mu$ M). Este ensayo se realizó en el mismo contador Thorn Emi fotón utilizado con luminol, por cuatuplicado con resultados similares. B) Se evaluó la pre-incubación de PSM con metionina (5 mM) antes de la adición de sustratos.

En la figura 21, la formación de peroxinitrito también se midió a través de la fluorescencia de la DHR través de su oxidación a rodamina-123 (RH). Hemos mezclado PSM con DHR en PBS con succinato como sustrato y antimicina A; inmediatamente, se añadió a la mezcla NOC-7 y seguimos la fluorescencia por 20 minutos. Concentraciones crecientes de NOC-7 hasta un máximo de  ${}^{\bullet}\text{NO}$  de  $1.4 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  produjeron un rápido aumento en la fluorescencia de la RH, lo que refleja la formación de peroxinitrito. Sin embargo, mayores flujos de  ${}^{\bullet}\text{NO}$  mostraron una disminución en la fluorescencia de la RH, mostrando una curva en forma de campana (Fig. 21A). La DHR reacciona con los radicales derivados del peroxinitrito ( ${}^{\bullet}\text{NO}_2$  y  ${}^{\bullet}\text{OH}$ ), en lugar de reaccionar directamente con el peroxinitrito [158] y por lo tanto la acción inhibidora debida al exceso de  ${}^{\bullet}\text{NO}$  era esperable debido a su reacción con radicales intermediarios semi-oxidados de la DHR [159]. Rendimientos máximos de la formación de RH se obtuvieron cerca de los flujos equimolares de  ${}^{\bullet}\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . La pre-incubación con los metionina resultó en una fuerte inhibición de la oxidación de la DHR dependiente de  ${}^{\bullet}\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , apoyando que es un proceso mediado por peroxinitrito (Fig. 21B).

Figura 21A:

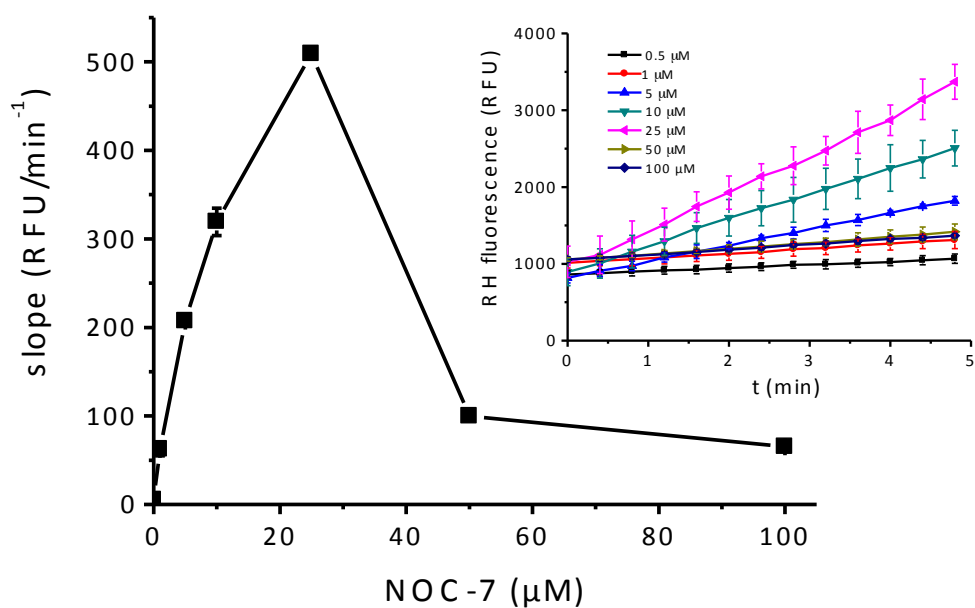
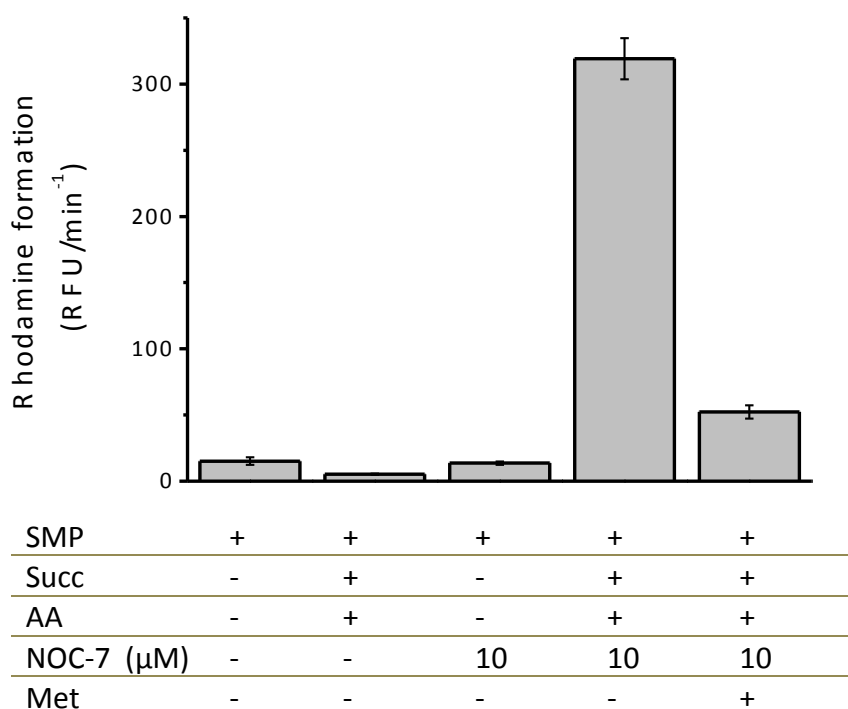


Figura 21B:



**Figura 21: Oxidación de la DHR-123 por PSM expuestas a óxido nítrico.** Las PSM (0.75 mg/mL) se incubaron en PBS con DHR-123 (DHR, 50 μM). La fluorescencia de la rodamina (RH) se siguió bajo agitación continua a 37 °C durante 20 minutos. A) Fluorescencia tras la adición de succinato (6 mM), antimicina A (2 μM) en función de la concentración de NOC-7. En el inset, curso temporal de la acumulación de RH. B) Efecto de la metionina (10 mM) en los

*rendimientos de fluorescencia en PSM expuestas a 10  $\mu\text{M}$  NOC-7. Se realizaron condiciones control en ausencia de  $^{\bullet}\text{NO}$  o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  como se indica en las barras.*

Se evaluó una sonda fluorescente nueva para la detección de peroxinitrito en PSM. En el CBA (cumarin-7-borónico), el ácido borónico reacciona estequiométricamente rápido con  $\text{ONOO}^-$  con una velocidad constante de  $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  originando el producto hidroxilado, 7-hidroxicumarina (COH), borato y nitrito [140]. En la figura 22, se añadieron al sistema de PSM, succinato, antimicina A y NOC-7 lo cual resultó en un aumento lineal en el tiempo de la fluorescencia debido a la acumulación de COH, reflejando la formación de peroxinitrito por los flujos simultáneos de  $^{\bullet}\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . A diferencia del perfil que mostró la DHR en forma de campana como función de la concentración NOC-7, el CBA mostró un aumento en la pendiente de fluorescencia que alcanzó una meseta a mayores flujos  $^{\bullet}\text{NO}$  (Fig. 22A). Este comportamiento se debe a la reacción directa del CBA con el peroxinitrito [140], involucrando un proceso directo de oxidación por dos electrones sin la formación significativa de intermediarios radicalares derivados del CBA que de otro modo podrían reaccionar con el exceso de  $^{\bullet}\text{NO}$ . La inhibición de la fluorescencia del COH se realizó con cisteína ( $k = 4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) en concentraciones que compitieron eficientemente por peroxinitrito (Fig. 22B) [160]. Notablemente, tanto para los ensayos con DHR como con CBA, el máximo de la oxidación de la sonda inducida por las PSM se obtuvo a una concentración de  $25 \mu\text{M}$  NOC-7, lo que sugiere que en esas condiciones, la relación de los flujos de  $^{\bullet}\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  fue de cerca de uno.

Figura 22A:

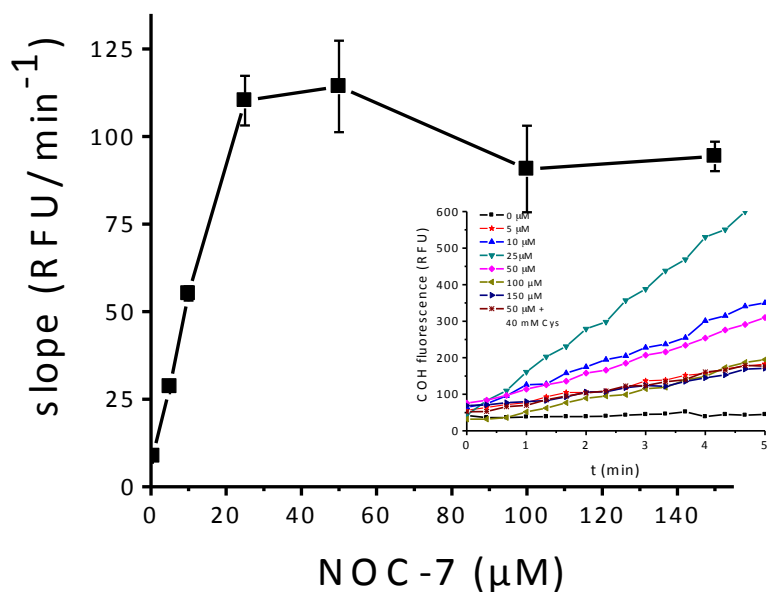
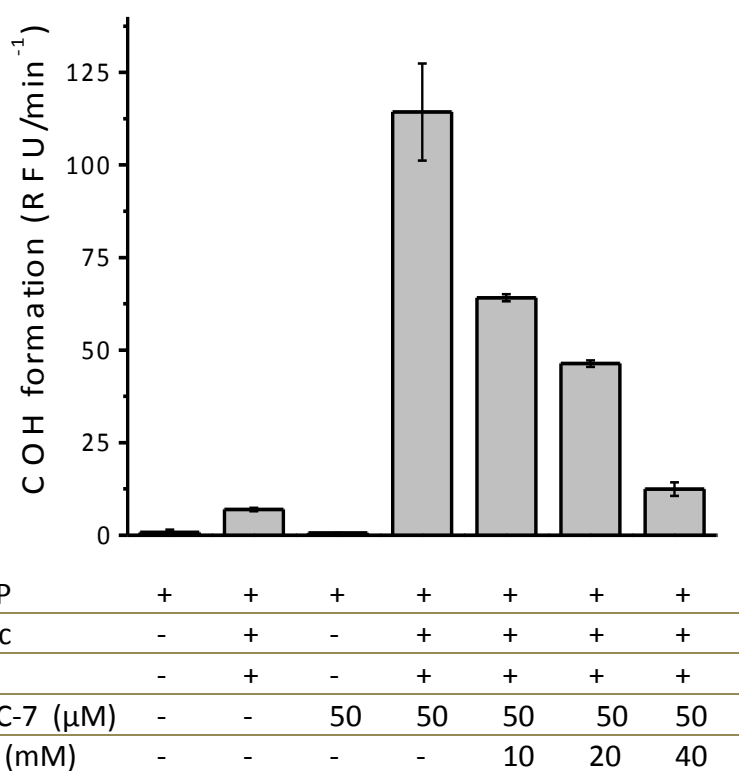


Figura 22B:



**Figura 22: Oxidación del ácido cumarin-7-borónico por las PSM.** Las PSM (0.75 mg/mL) se incubaron en PBS con CBA (50 μM). La fluorescencia de la forma oxidada, 7-hidroxicumarina (COH), fue seguida a 37°C bajo agitación continua durante 20 min. A) Fluorescencia tras la adición de succinato (6 mM), antimicina A (2 μM) como una función de la concentración de

*NOC-7. Inset: evolución temporal de la acumulación COH. B) Se realizaron controles en la condición de 50  $\mu$ M NOC-7 y se evaluó también el efecto inhibitorio de la cisteína (10, 20 y 40 mM) sobre la oxidación del CBA.*

### **5.1.2 Oxidación proteica inducida por peroxinitrito en PSM**

Los radicales derivados del peroxinitrito reaccionan con las proteínas de la membrana interna mitocondrial y conducen a la generación de radicales proteicos que podrían ser atrapados con DMPO. El DMPO se oxida a una nitrona estable; los productos nitrona DMPO-proteína se pueden detectar inmunoquímicamente a través de un anticuerpo específico [161]. En la figura 23, las PSM se pre-incubaron con DMPO (carriles 1-8) y se expusieron a diferentes reactivos durante 30 minutos a 37°C. En las PSM se obtuvo una significativa inmunodetección a partir de la pre-incubación con succinato, antimicina A y concentraciones crecientes de NOC-7, compatible con la formación de peroxinitrito. La adición de SOD o tiron (para atrapar  $O_2^{\cdot-}$ ) o metionina (para atrapar peroxinitrito) inhibió la formación de radicales proteicos tal como se revela inmunoquímicamente. La nitración de tirosinas proteicas también fue detectada en la condición de la formación máxima de peroxinitrito, aunque las señales se veían mucho más débiles que las obtenidas para la detección de radicales proteicos (no se muestra). Condiciones control demostraron que ni los flujos de  $O_2^{\cdot-}$  ni los de  $^{\cdot}NO$  en forma independiente, forman radicales proteicos y también que la pre-incubación con metionina inhibe la inmunodetección (Fig. 23B).

Figura 23A:

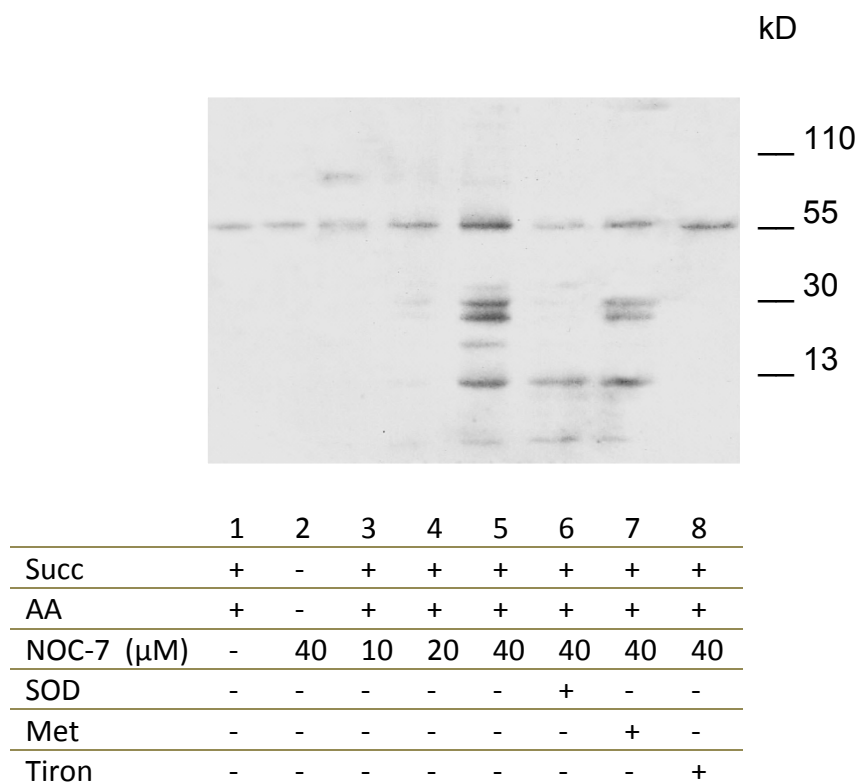


Figura 23B:

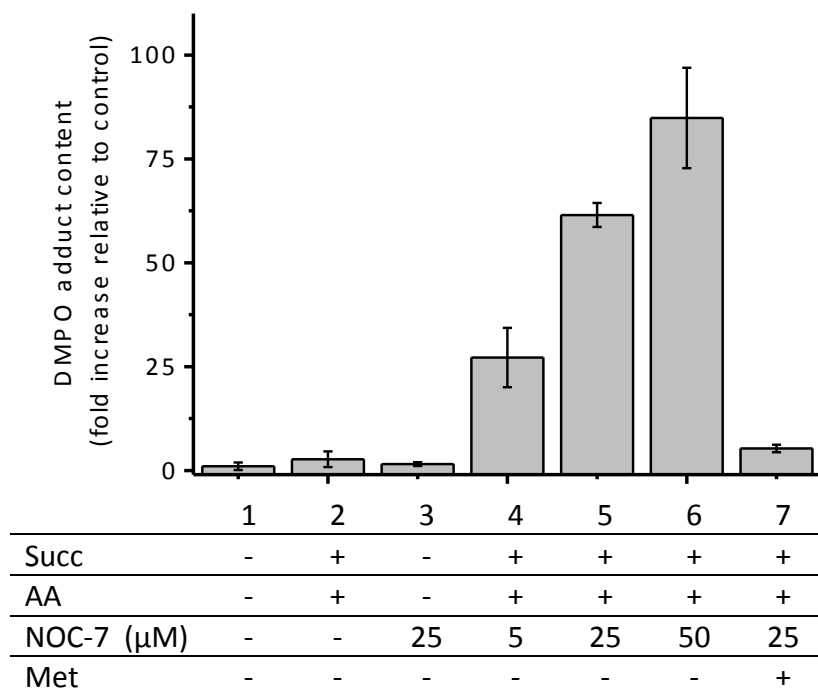


Figura 23. Detección de la formación de radicales proteicos en PSM por immunospin trapping con DMPO. A) Las PSM (1 mg/mL) se incubaron en solución isotónica a 37°C durante 20 min

con DMPO (100 mM) con diferentes reactivos. Succinato (3 mM), antimicina A (2  $\mu$ M), SOD (20  $\mu$ M), metionina (10 mM), tiron (5 mM) y NOC-7 (5, 25 y 50  $\mu$ M) se agregan como se indica en la tabla. B) Se realizaron controles y las densidades de banda se representan como barras. Concentraciones crecientes de NOC-7 (5, 25 y 50  $\mu$ M) producen un aumento en la inmunodetección con anti-DMPO. Se observó el efecto inhibitorio de la metionina (10 mM) en la formación de radicales proteicos.

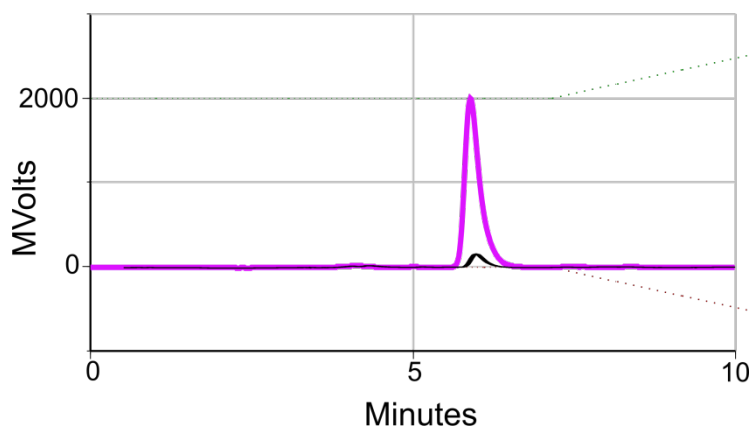
## 5.2 Localización de la formación de ONOO<sup>-</sup> a través del uso de una sonda hidrofóbica análogo de tirosina (BTBE)

La ventaja de esta sonda frente a muchas reportadas, radica en que es hidrofóbica, y por lo tanto se intercala en membranas. Muchos de los estudios mecanísticos de nitración de tirosinas están hechos en soluciones acuosas, sin embargo, la mayoría de los residuos de tirosinas proteicas que se ven nitrados *in vivo* e *in vitro* están asociados a entornos hidrofóbicos. Trabajos previos en nuestro laboratorio [155] mostraron que el BTBE podía ser incorporado en liposomas de fosfatidilcolina y que frente al agregado de ONOO<sup>-</sup>, uno de los productos mayoritarios a pH 7.4 era el 3-nitro-BTBE (3%), y en menor proporción también se obtenían, el producto de dimerización del BTBE, el 3,3'-di-BTBE (0.02%) y el producto hidroxilado (por HPLC-MS). Posteriormente se evaluó el uso de esta sonda por primera vez en una biomembrana como la del glóbulo rojo [96]. En ese trabajo observaron que cuando el BTBE era incorporado a glóbulos rojos y se los exponía a ONOO<sup>-</sup>, se obtenían productos nitrados y dimerizados del BTBE, indicando que en la membrana estaban ocurriendo procesos que involucraban a los radicales derivados del ONOO<sup>-</sup>. En ese sentido quisimos evaluar esta sonda en la membrana mitocondrial.

Inicialmente, estudiamos si la incorporación del BTBE en la mitocondria aislada intacta le ocasionaba algún cambio que modificara su funcionalidad y/o grado de acoplamiento (Fig. 24). Para esto preincubamos mitocondrias aisladas de corazón de rata (17.6 mg/mL) con BTBE (1mM) preparado en DMSO y se evaluó la respiración mitocondrial, con el agregado de sustratos respiratorios y ADP. Observamos que la



funcionalidad mitocondrial y grado de acople, permanecían inalterados frente a la incorporación del BTBE en la membrana mitocondrial (RCR= 4-5 con y sin BTBE). Estudiamos la incorporación de esta sonda pre-incubándola con las mitocondrias en diferentes condiciones de tiempo, temperatura, y concentración. Pudimos observar que la sonda muestra altos rendimiento de incorporación (90%) a 37°C y agitación suave (Fig. 24).



**Figura 24. Incorporación de BTBE en mitocondrias de corazón.** BTBE (1mM) fue incorporado en las mitocondrias aisladas (17.6 mg/mL), se realizó su extracción y posterior separación por HPLC, se muestra un cromatograma con el BTBE en la fracción mitocondrial (rojo) y el del sobrenadante (negro).

Pre-incorporamos el BTBE a las PSM y luego, en presencia de succinato, antimicina A y NOC-7, seguimos la fluorescencia dependiente de la oxidación de la DHR-123 por  $\text{ONOO}^-$ , con el mismo diseño experimental que en la Figura 21. Cuando hay BTBE incorporado en las PSM, observamos que la fluorescencia se inhibe (Figura 25A y 25B), lo cual sugería que el  $\text{ONOO}^-$  estaba siendo desviado a reaccionar con el BTBE para formar los productos 3-nitro-BTBE y 3'3-di-BTBE. Por otra parte queríamos analizar donde estaba reaccionando el BTBE con el  $\text{ONOO}^-$  formado, si era en la cercanía de la membrana (o de los sitios de formación de  $\text{ONOO}^-$ ) o fuera de la membrana mitocondrial, para lo cual utilizamos un análogo de tirosina hidrofílico, el pHPA, que se localiza en la solución acuosa circundante. Como se muestra en la Figura 25A, en presencia de pHPA no se inhibe la oxidación de la DHR, reflejando claramente la localización de la formación de  $\text{ONOO}^-$  en la membrana mitocondrial o su cercanía, en

donde está incorporado el BTBE. Como control, observamos que el DMSO, el solvente del BTBE, no está interfiriendo en la oxidación de la DHR.

Figura 25A:

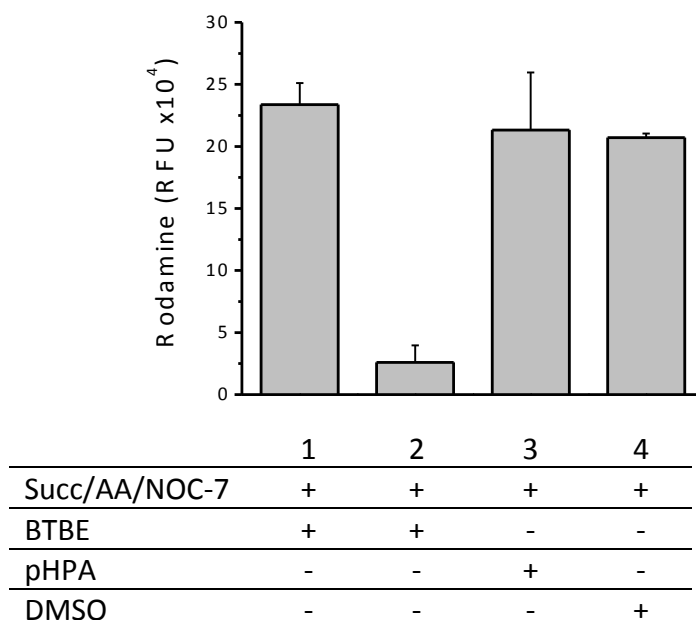
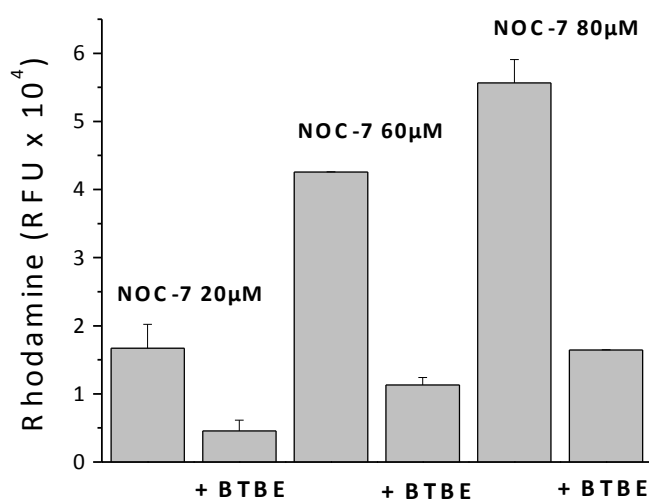


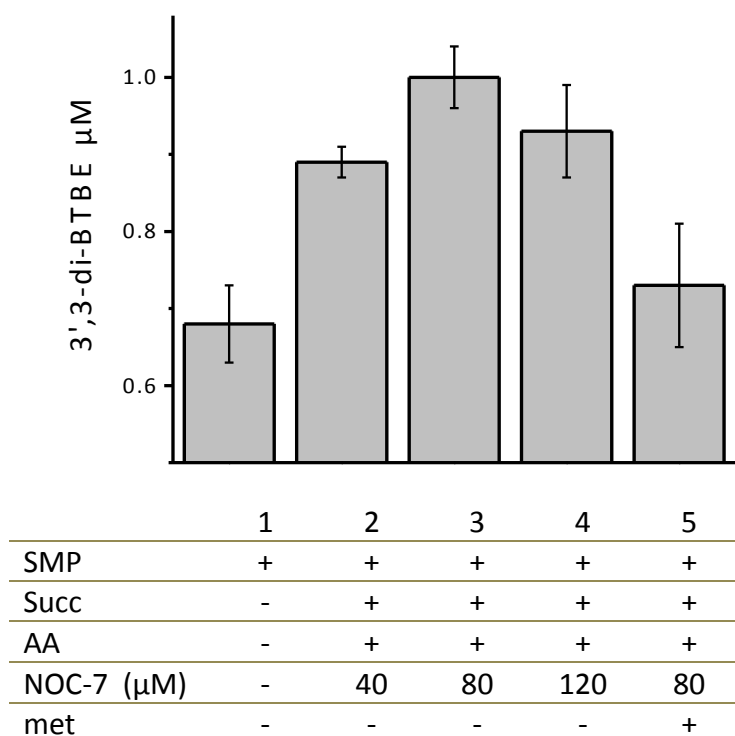
Figura 25B:



**Figura 25. Oxidación de la DHR-123 por PSM expuestas a flujo de óxido nítrico.** A) Efecto del pHPA y DMSO. Las PSM (0.75 mg/mL) fueron preincubadas con BTBE (1 mM), pHPA (1 mM) o DMSO y luego se expuso al sistema formador de ONOO- (succinato, antimicina A y NOC-7) con DHR-123 (50 μM). Se observa que el pHPA casi no inhibe la oxidación de la DHR y que el

solvente DMSO no es interfiere. B) El BTBE (1 mM) se pre-incorporó en las PSM (0.75 mg/mL) en presencia de succinato, antimicina A y NOC-7 a las concentraciones indicadas. Se observa la inhibición de la fluorescencia por el BTBE.

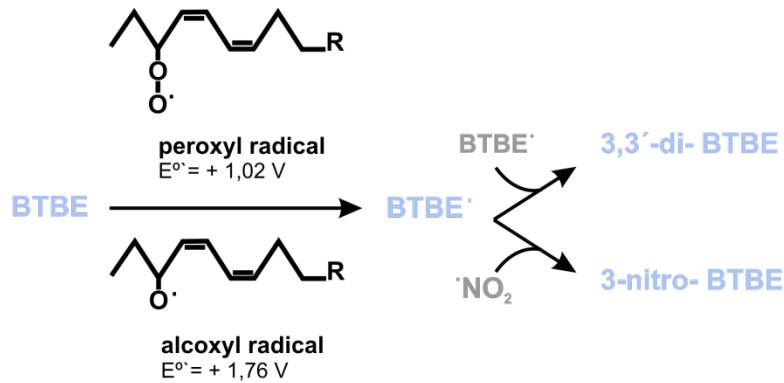
Para analizar qué productos del BTBE se estaban formando, en condiciones de formación de ONOO<sup>-</sup> endógeno, extrajimos al BTBE y lo analizamos por RP-HPLC. Fue interesante observar que el producto mayoritario y casi el único era el 3',3-di-BTBE (Fig. 26). La formación de di-BTBE era coincidente con la formación de ONOO<sup>-</sup> en las PSM, aumentando en las condiciones de máxima formación de ONOO<sup>-</sup>.



**Figura 26. Formación de 3',3-di-BTBE en las PSM inducido por la formación de ONOO<sup>-</sup> endógeno.** Las PSM (0.75 mg/mL) fueron pre-incubadas con BTBE (1 mM), luego en presencia de succinato y antimicina A, se expuso a diferentes concentraciones de NOC-7. Se extrajo el BTBE y se cuantificaron los productos por HPLC, en este caso solo di-BTBE. La metionina inhibe dicha formación.

Dado que en las PSM inducidas a formar ONOO<sup>-</sup> (con succinato, antimicina A y NOC-7), generan mayoritariamente di-BTBE, planteamos que este ONOO<sup>-</sup> formado podría

inducir procesos de lipoperoxidación en la membrana mitocondrial, promoviendo oxidaciones por un electrón del BTBE por radicales lipídicos con la consecuente formación de di-BTBE como se había visto previamente en liposomas [162], como se muestra en la Figura 27.



**Figura 27.** Formación de 3-nitro-BTBE y di-BTE a partir del radical BTBE<sup>·</sup> inducido por lipoperoxidación. El radical fenoxilo (BTBE<sup>·</sup>) se forma por la oxidación por un electrón del BTBE a partir de los radicales lipídicos, alcoxilo y peroxilo en la membrana mitocondrial.

Para evaluar esta hipótesis, estimamos la lipoperoxidación a través de la acumulación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs), una de las cuales es el MDA (malondialdehído) y cuantificamos di-BTBE en las mismas condiciones. Para inducir la lipoperoxidación utilizamos el *t*-BOOH (*tert*- butil hidropéroxido) que es un inductor de lipoperoxidación en mitocondrias (Radi, *et al* 1993). Observamos que a concentraciones crecientes de *t*-BOOH se acumula cada vez más MDA y aumenta la formación de di-BTBE (Fig. 28).

Figura 28A:

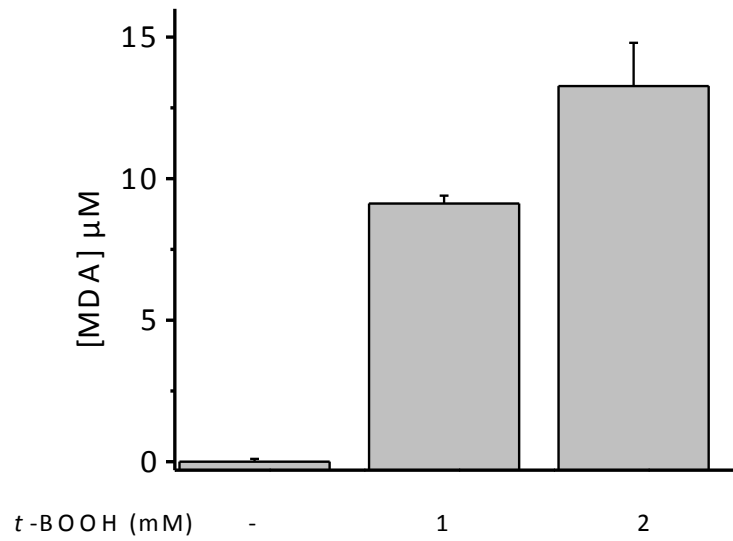
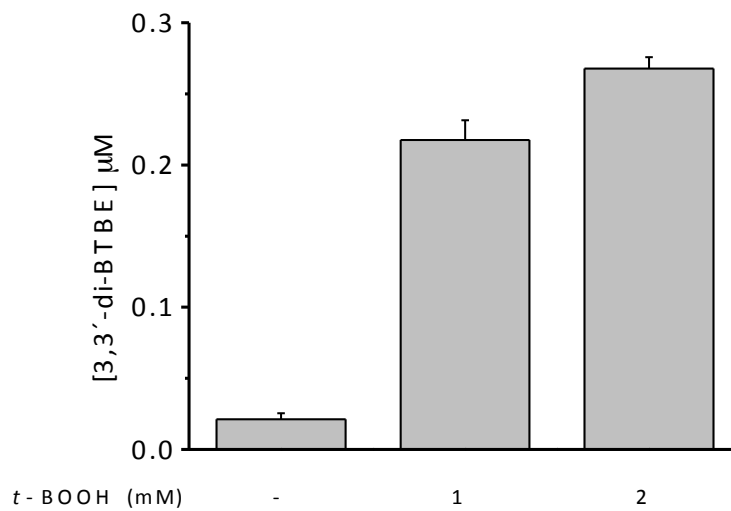


Figura 28B:



**Figura 28. El tert-butil hidroperóxido induce la lipoperoxidación en mitocondrias aisladas intactas.** El BTBE (1 mM) fue pre-incubado con las mitocondrias aisladas de corazón de rata (2 mg/mL), luego fueron tratadas con t-BOOH (1-2 mM) e incubadas por 1 h a 37°C en buffer isotónico. A) La cuantificación de MDA fue medida a 532 nm como se describe e materiales y métodos. B) El 3,3'-di-BTBE fue separado y cuantificado por RP-HPLC.

### **5.3 Estudiar la incorporación, reducción y capacidad redox de las MnP en mitocondrias aisladas intactas y partículas submitocondriales frente a la formación mitocondrial de ONOO<sup>-</sup> y oxidantes exógenos y evaluar su efecto protector frente al estrés oxidativo mitocondrial.**

Trabajos previos en nuestro laboratorio mostraron que en condiciones de baja tensión de oxígeno los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial pueden reducir a las MnP (III) a MnP (II), que a su vez puede reducir ONOO<sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y proteger los componentes mitocondriales del daño mediado por peroxinitrito [135]. Teniendo en cuenta que en el interior de las mitocondrias la concentración fisiológica de oxígeno está típicamente en el rango de 3-30 μM [27], se evaluó si las concentraciones de oxígeno fisiológicamente relevantes son adecuados para asegurar la suficiente reducción de las MnP, y por lo tanto tener un efecto protector contra los trastornos mediados por peroxinitrito. El consumo de oxígeno y la reducción de MnP fueron controlados simultáneamente electroquímica y espectrofotométricamente, respectivamente. En la figura 29, se evaluó la reducción de la MnP (MNTE-2-PyP) siguiendo la absorbancia a 454 y 439 nm correspondiente a los máximos de Mn (III) y Mn (II), respectivamente [131]. Para el complejo I (Fig. 29A), se observó la reducción de la MnP a partir de concentraciones de oxígeno relativamente altas (~150 μM) y se mantuvo estable, mientras que el oxígeno fue consumido por las PSM con NADH en las primeros 4 - 5 minutos; a 10 μM oxígeno casi un 100% de la MnP (5 μM) se redujo a Mn (II). En el caso del complejo II (Fig. 29B), la reducción de la MnP con succinato fue mucho más lenta, tomando de 20 a 25 minutos para completar el proceso. La reducción de la MnP dependiente del complejo II se aceleró significativamente a concentraciones bajas de oxígeno (<10 μM).

Además, se evaluó otra MnP, la MnTnHex-2-PyP que tiene una reactividad similar a la MnTE-2-PyP con peroxinitrito [132], pero posee un potencial de reducción más alto ( $E_{1/2}^{\circ} = +0.314$  V) y contiene cuatro cadenas alquilo con seis átomos de carbono que aumentan la lipofilicidad [163].

En la Fig. 29C, la MnTnHex-2-PyP fue reducida casi completamente por el complejo I con NADH durante el tiempo de mezclado (1 - 2 min) a pesar de que los niveles de oxígeno eran todavía muy altos (> 100  $\mu\text{M}$ , datos no mostrados). A 10  $\mu\text{M}$  oxígeno, toda la MnTnHex-2-PyP se redujo. Por otra parte, la reducción por el complejo II con succinato (Fig. 29D) mostró un comportamiento rápido similar, se completó en los primeros 3-4 minutos (en ese momento el nivel de oxígeno era > 100  $\mu\text{M}$ , por lo que a 10  $\mu\text{M}$  la reducción fue total). En general, los resultados con MnTnHex-2-PyP son consistentes con un proceso de reducción muy rápido por ambos complejos I y II, de acuerdo con su potencial de reducción más alto ( $E_{1/2}^{\circ} = +0.314 \text{ V}$ ) que el de la MnTE-2-PyP ( $E_{1/2}^{\circ} = +0.228 \text{ V}$ ) (Fig. 29E).

Figura 29A:

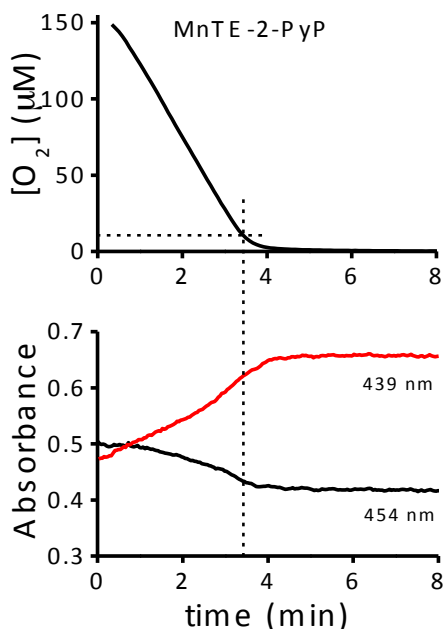


Figura 29B:

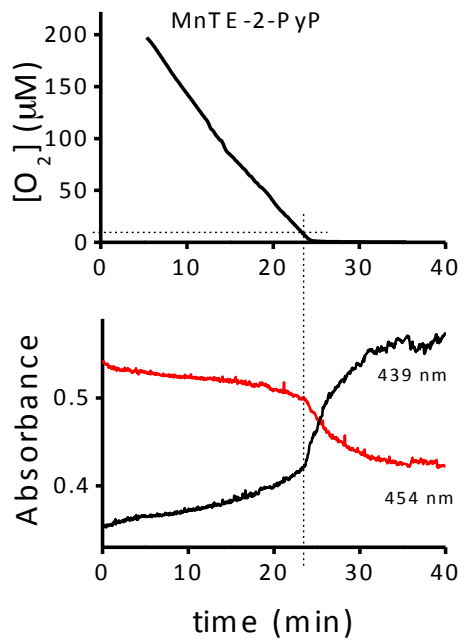


Figura 29C:

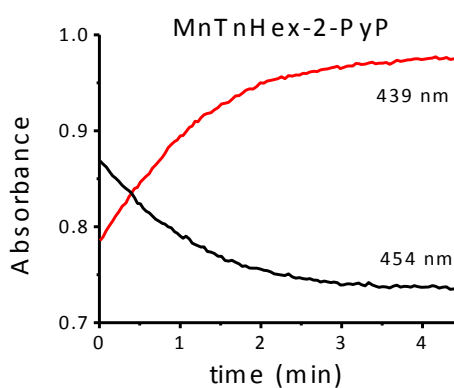


Figura 29D:

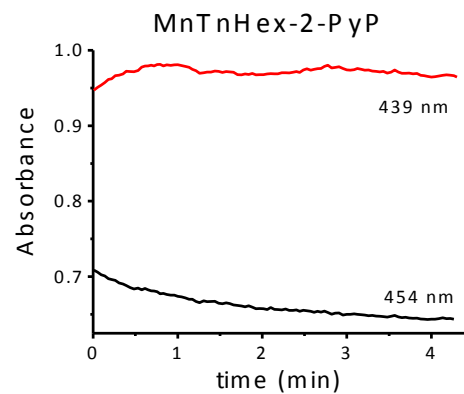
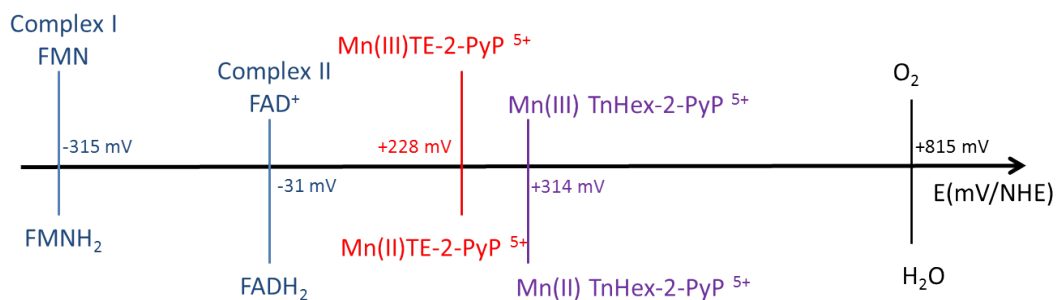


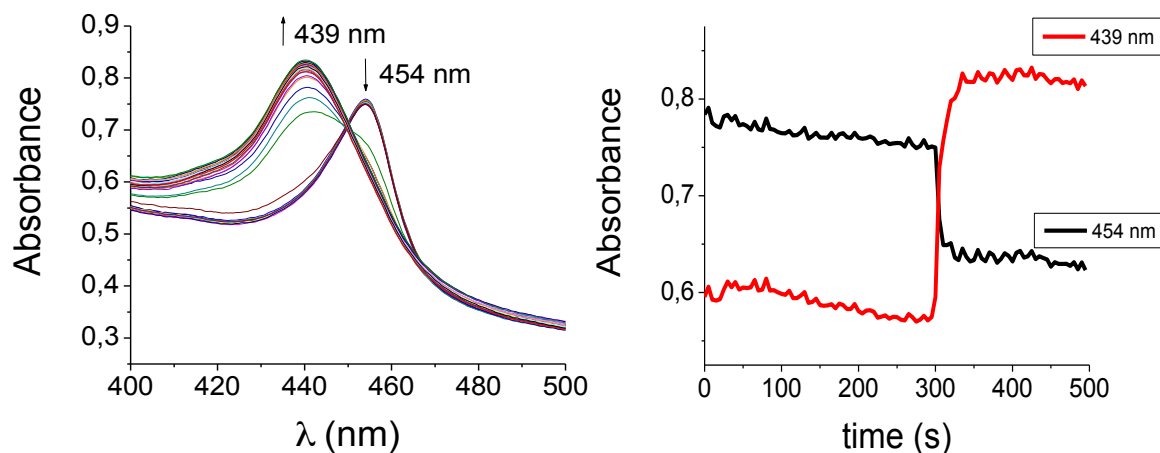
Figura 29E:



*Figura 29. Reducción de MnTE-2-PyP y MnTnHex-2-PyP por las PSM en función de la concentración de oxígeno. La concentración de oxígeno y la reducción de MnP fueron seguidas simultáneamente como se indica en Materiales y Métodos. A) Las PSM (0,1 mg/mL) se incubaron en buffer isotónico con MnTE-2-PyP (5 μM) y NADH (1 mM) o B) succinato de (2,5 mM), para el complejo I y II, respectivamente. C) Las PSM (0,1 mg/mL) se incubaron con MnTnHex-2-PyP (5 μM) y NADH (1 mM) o D) succinato de (2,5 mM) para el complejo I y II, respectivamente. En los gráficos, ~10 μM oxígeno se indica con una línea para facilitar el análisis de datos. E) Esquema de los potenciales redox de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, las MnP utilizadas en este trabajo (MnTE-2-PyP y MnTnHex-2-PyP) y el oxígeno molecular.*

La reducción de las MnP también fue realizada en mitocondrias aisladas de corazón, debido a que la doble membrana intacta podía interferir negativamente en la incorporación y posterior reducción de las MnP. Sin embargo, observamos que una vez incorporadas las MnP, no se alteraba el grado de acople mitocondrial, y que la MnTE-2-PyP era eficientemente reducida por el complejo II, con lo cual confirmamos que las porfirinas de manganeso estaban llegando a la membrana interna y/o matriz mitocondrial para poder reducirse (Fig. 30).





**Figura 30.** Reducción de la MnTE-2-PyP por el complejo II de mitocondrias aisladas de corazón de rata. La MnTE-2-PyP (5  $\mu$ M) fue incorporada a mitocondrias aisladas de corazón de rata (0.5 mg/mL), con agitación leve a 37°C por 10 minutos. Luego se separan las mitocondrias y se evalúa la funcionalidad mitocondrial, se agrega succinato, se observa la reducción de las porfirinas por espectrofotometría.

### 5.3.1 Efecto antioxidante de las MnP en PSM expuestas a flujos de ONOO<sup>-</sup> auténtico

Se evaluó si la MnP reducida por los componentes de la cadena de transporte de electrones, podría proteger contra el daño que ejerce el ONOO<sup>-</sup> sobre los complejos mitocondriales, particularmente el complejo I que reduce fácilmente a la MnP (Fig. 29) y se sabe que es sensible a la inactivación mediada por peroxinitrito [74, 76].

En la figura 31, se evaluó el consumo de oxígeno dependiente del complejo I en PSM con NADH como sustrato con y sin MnP, desafiado a un flujo de peroxinitrito 50  $\mu$ M/min; el protocolo de adición de los reactivos se indica en la Figura 31A. Las MnP se redujeron durante el proceso de consumo de oxígeno dependiente de PSM hasta alcanzar un nivel cercano a la anoxia; entonces, se infundió peroxinitrito durante 3 minutos, seguido de reoxigenación. Observamos que bajo condiciones de control (sin MnP ni peroxinitrito), la velocidad de respiración de las PSM después de la anoxia/reoxigenación disminuyó en aproximadamente 25% en comparación con la condición pre-anóxica. Cuando se infundió peroxinitrito durante 3 minutos, hubo una disminución  $\sim$  65% en la velocidad respiratoria. La pre-incubación de PSM con MnP

prevenía totalmente los efectos mediados por peroxinitrito en el complejo I, y protegía también del efecto de la anoxia/reoxigenación, con sólo una disminución de aproximadamente 7% de la capacidad respiratoria en presencia de MnP sobre la condición pre-anóxica (Fig. 31B). De acuerdo con los datos de consumo de oxígeno el complejo I, la infusión de peroxinitrito causa una disminución de ~60% en la actividad de la NADH deshidrogenasa (actividad del control =  $0,89 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) que se protegió en gran medida con la presencia de MnP, con sólo un 20 ~ % de inactivación (es decir, un grado de inactivación que no afecta a las tasas generales de las vías respiratorias).

Figura 31A:

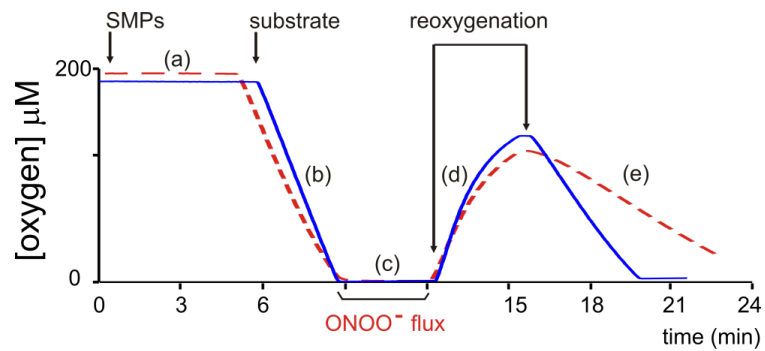
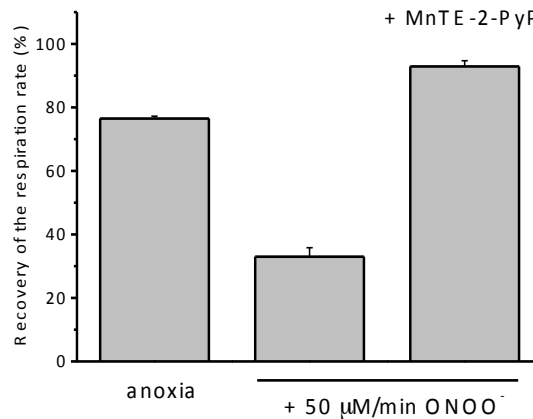


Figura 31B:

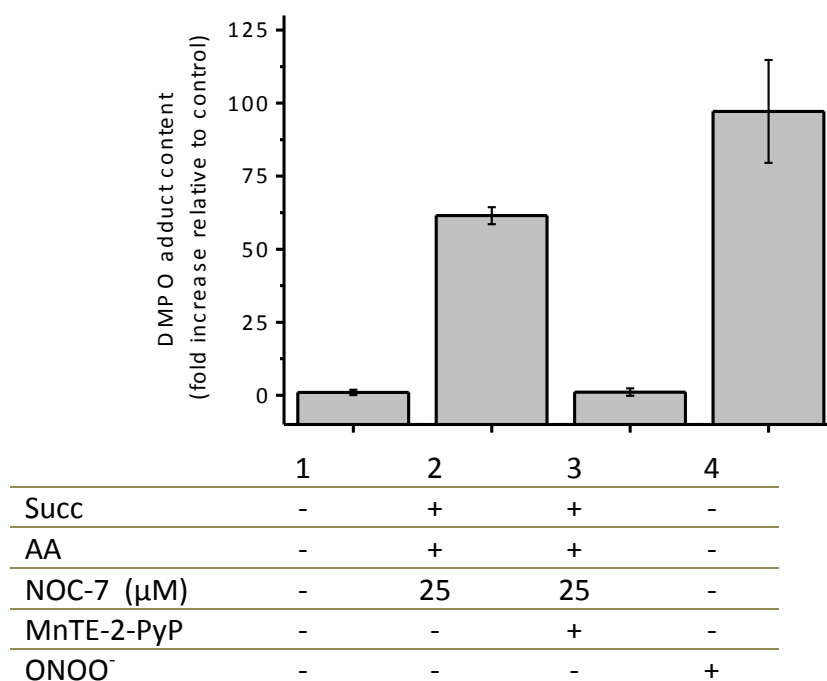


**Figura 31. Efecto antioxidante de la MnTE-2-PyP sobre inactivación del complejo I mitocondrial dependiente de peroxinitrito.** A) Registro primario representativo de la concentración de oxígeno en función del tiempo, evaluación de la respiración dependiente del complejo I (NADH deshidrogenasa) en PSM antes y después de un flujo de peroxinitrito

durante 3 minutos y la capacidad protectora de las MnP. Una vez que el sistema se equilibra y es calibrado (a) en PBS a 37°C con agitación continua, se inyectan las PSM (0.1 mg/mL). A continuación, se añaden los sustratos respiratorios como se indica y se inicia el consumo de oxígeno. Esta pendiente (b) corresponde al 100% de la velocidad respiratoria para cada experimento (100%). Cerca de los niveles de anoxia se inició un flujo de peroxinitrito (50  $\mu$ M/min) durante 3 minutos (c) y después el sistema se reoxigena simplemente abriendo la cámara para permitir que se equilibre el oxígeno (d). Cuando el nivel de oxígeno llega a  $\sim$ 100  $\mu$ M, la cámara se cierra y los sustratos se añaden de nuevo dando lugar a una nueva pendiente, posterior a la exposición (e). El trazo sólido representa un registro de PSM con MnTE-2-PyP agregado al comienzo del experimento y el trazo discontinuo representa uno sin MnP, para evaluar sólo la inactivación mediada por peroxinitrito. B) Las PSM (0.1 mg/mL) se incubaron con y sin MnTE-2-PyP (5  $\mu$ M) y se agregó NADH (1 mM) en buffer isotónico. Las barras representan la recuperación de la velocidad respiratoria (%) después de la infusión.

También se analizaron los efectos de las MnP en la formación de radicales proteicos en PSM a partir de un flujo endógeno de peroxinitrito (Fig. 32). El peroxinitrito fue generado en PSM con succinato, antimicina A y NOC-7 en tubos de microcentrífuga (1,5 mL) con tapón para minimizar la entrada de oxígeno y facilitar la reducción de las MnP. Técnicas inmunoquímicas (como en la Fig. 22), puso de manifiesto que la formación de radicales proteicos dependiente de peroxinitrito, era totalmente inhibido en presencia de MnP. Se estima que durante el período de incubación, la formación de peroxinitrito total por las PSM en condiciones de máxima fue  $>$  20  $\mu$ M; como la protección total se obtuvo con 5  $\mu$ M MnP, lo cual es consistente con la reducción catalítica de peroxinitrito.

Figura 32:

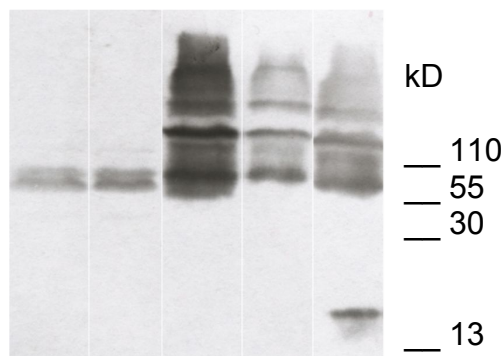


**Figura 32. Las MnP protegen de la formación de radicales proteicos dependiente de peroxinitrito en PSM.** Las PSM (2 mg/mL) se incubaron en tubos Eppendorf tapados, con DMPO (100 mM), succinato (6 mM) y MnTE-2-PyP (5 μM) (como se indica) en buffer isotónico a 37°C con agitación continua durante 5 minutos para permitir la reducción de MnP. Después de eso, se agrega NOC-7 (25 mM) durante 20 minutos. Las muestras se centrifugaron para concentrarse a 40 mg/mL y se realizaron análisis de Western blot con anticuerpo anti-DMPO. Los resultados se expresan en función del aumento de veces en relación con las muestras control.

Otro efecto importante del daño mediado por ONOO<sup>-</sup>, es la nitración de residuos tirosina en proteínas. Para explorar adicionalmente el efecto protector de las MnP sobre el daño mitocondrial dependiente de peroxinitrito, se realizaron análisis inmunoquímicos en tirosinas proteicas nitradas en PSM (Fig. 33). Las PSM se incubaron con y sin MnP antes de exponerlas a un flujo constante de peroxinitrito auténtico con el diseño experimental descrito en la figura 31A. Los datos muestran que tanto la MnTE-2-PyP como la MnTnHex-2-PyP (ambas pre-reducidas, 5 μM) atenúan la nitración de tirosina significativamente en PSM expuestas a flujos de peroxinitrito (100

$\mu\text{M}/\text{min}$  durante 3 minutos, la exposición total es de  $300 \mu\text{M}$ ), confirmando la capacidad (catalítica) antioxidante de las MnP sobre el peroxinitrito en este sistema.

Figura 33:

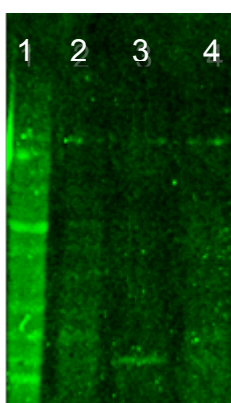


	1	2	3	4	5
SMP/succ	+	+	+	+	+
MnTE-2-PyP	-	+	-	+	-
MnTnHex-2-PyP	-	-	-	-	+
ONOO <sup>-</sup>	-	-	+	+	+

**Figura 33. Las MnP protegen de la nitración de tirosinas proteicas en PSM, dependiente de peroxinitrito.** La nitración de tirosinas proteicas se evaluó en PSM ( $0.1 \text{ mg}/\text{mL}$ ) se incubaron con MnTE-2-PyP o MnTnHex-2 PyP- ( $5 \mu\text{M}$ ) y se expusieron a flujos de ONOO<sup>-</sup> ( $100 \mu\text{M}/\text{min}$ ) durante 3 minutos en buffer isotónico. Las muestras se recogieron y ultra-centrifugaron a  $100.000 \text{ g}$ , se resuspendieron a  $40 \text{ mg}/\text{mL}$ , y se analizaron por transferencia Western usando anticuerpo anti-nitro tirosina.

### 5.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante de las MnP en células endoteliales sometidas a estrés nitroxidativo a partir de flujos de ONOO<sup>-</sup> exógenos con SIN-1.

Otra forma de evaluar la actividad antioxidante de las MnP fue incorporándolas a un cultivo de células endoteliales (BAEC) y exponiendo las mismas a un dador exógeno de peroxinitrito, el SIN-1 (3-(4- morfolino) sidnonimina hidrocloreto). Este compuesto se descompone a pH fisiológico en forma simultánea a O<sub>2</sub><sup>-</sup> y <sup>•</sup>NO, que reaccionan formando ONOO<sup>-</sup> [164]. Posteriormente analizamos un marcador de estrés nitroxidativo como la nitración proteica utilizando el anticuerpo anti-nitrotirosina. Para esto pre-incubamos las BAECs con una MnP diferente recientemente desarrollada, la MnTnBuOE-2-PyP (Fig. 34), que tiene incluido en cada una de las cadenas hidrofóbicas un átomo de O en el centro de la larga cadena alquilo (próximo al anillo piridilo), lo cual ha permitido disminuir la toxicidad en modelos *in vivo*, manteniendo su lipofilidad y reactividad (ver Tabla III) [163]. Una vez terminada la incubación con las MnP, se retira el medio con el excedente de MnP que no se incorporó a las células y se incubó con SIN-1 por 10 horas. Una vez cumplido ese tiempo, se levantan las células para el análisis inmunológico. Observamos que la exposición a SIN-1 indujo la nitración proteica mediada por ONOO<sup>-</sup> como se esperaba y que la pre-incubación con MnP (5 y 20 μM) inhibió la nitración a diferentes tiempos de pre-incubación (2 y 24 horas) (Fig. 34).

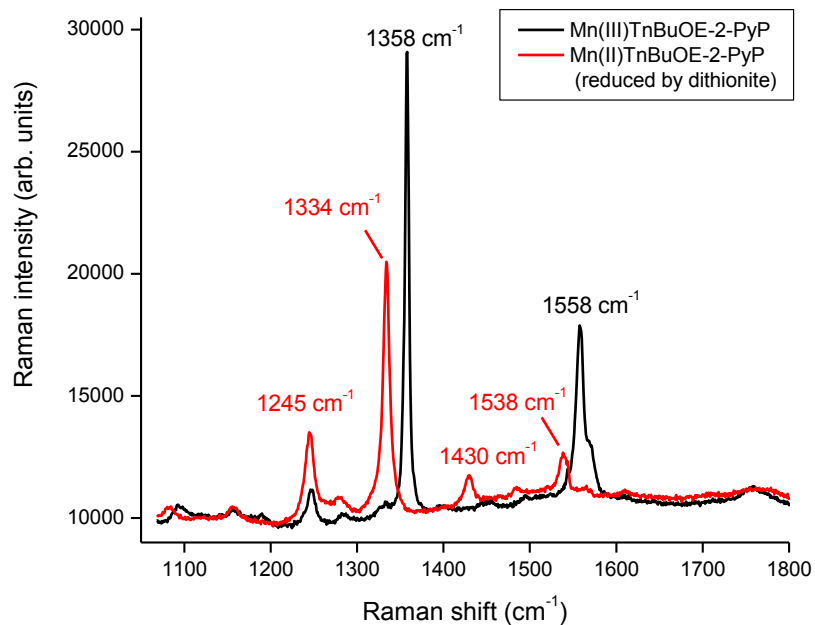


**Figura 34. Efecto antioxidante de la MnP en BAECs expuestas a SIN-1.** Preincubamos las células con MnTnBuOE-2-PyP por 2 h y 24 h. Posteriormente, cambiamos el medio y expusimos a SIN-1 (100μM) toda la noche. Levantamos las células y ensayamos con el anticuerpo anti-

*nitrotirosina, para ver nitración proteica. 1) control con SIN-1; 2) con MnP 5  $\mu$ M incubado 2 horas; 3) MnP 5  $\mu$ M incubado 24 horas y 4) MnP 20  $\mu$ M por 2 horas.*

### **5.3.3 Determinación de la incorporación de MnP a células endoteliales en cultivo mediante microscopía confocal Raman Resonante**

Cuando realizamos los experimentos de incorporación de MnP en BAECs, observamos efectos sobre procesos oxidativos inducidos por la formación de peroxinitrito, por ejemplo la nitración proteica. Inferíamos que se incorporaba porque ejercía efectos protectores, pero quedaba aún sin determinar de forma directa que concentración de MnP se incorporaba en las células. Para esto era necesaria una metodología que permitiera cuantificar las MnP incorporadas en las células, de hecho hay varios reportes de diferentes métodos analíticos (espectrofotométricos intercambiando el Mn por Zn, cromatográficos o por espectroscopía de masa) que implican procedimientos complejos, lentos y de bajo rendimiento de extracción de las MnP [136, 137, 165]. Nos propusimos utilizar una metodología diferente para este objetivo y a través del Dr. Murgida de la Universidad de Buenos Aires, utilizamos la microscopía Confocal Raman Resonante. Esta técnica nos permitiría estudiar la incorporación de las MnP en las células endoteliales o mitocondrias *in situ*. En primera instancia realizamos un estudio del espectro Raman Resonante de la MnTnBuOE-2-PyP reducida y oxidada para poder determinar el límite de sensibilidad que nos permite alcanzar la técnica (Fig. 35). A partir de estos estudios preliminares pudimos determinar las bandas Raman características de la MnP oxidada y reducida con un límite de sensibilidad de 2  $\mu$ M MnP.



**Figura 35. Espectros de Raman Resonante de la MnTnBuOE-2-PyP oxidada y reducida.** Espectros de MnTnBuOE-2-PyP (0.1 mM en amortiguador fosfato KPi 100 mM, pH 7.4) oxidada (línea negra) y reducida con el agregado de ditionito de sodio (línea roja). La porfirina fue colocada en una celda de cuarzo rotatoria (para evitar fotorreducción) y excitada con un láser de kriptón a 457.9 nm enfocado con el objetivo 20 X del microscopio confocal. Se utilizó una potencia de láser de 5 mW. Los espectros obtenidos a temperatura ambiente fueron centrados en 1450 cm<sup>-1</sup> y obtenidos con binning de 1 y slit width de 100 μm.

Posteriormente preincubamos la MnTnBuOE-2-PyP (5 μM) con mitocondrias aisladas (0.5 mg/mL) (Fig. 36A) y PSM (0.5 mg/mL) (Fig. 36B), en presencia de succinato (6 mM). Observamos que la MnP aparece mayoritariamente oxidada, y que una vez agregado el succinato comienza a aparecer una señal correspondiente a la MnP reducida que se incrementa a los 10 minutos. Esto sugiere que las MnP están siendo reducidas por las mitocondrias suplementadas con succinato.



Figura 36A:

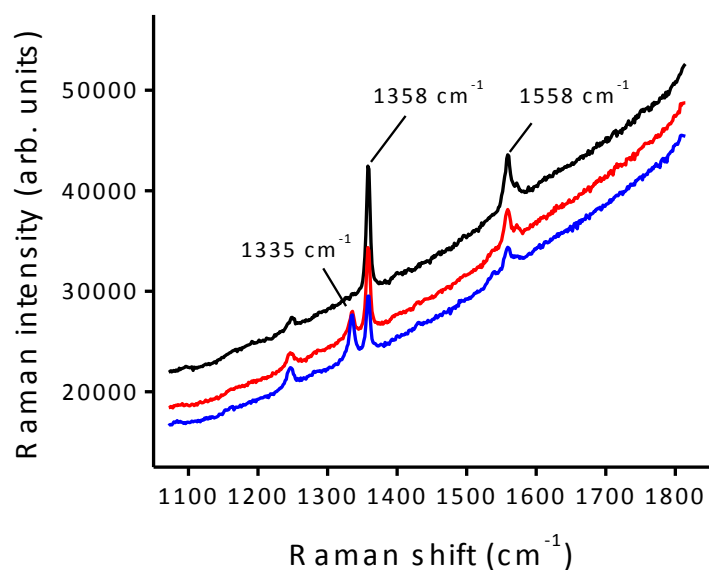
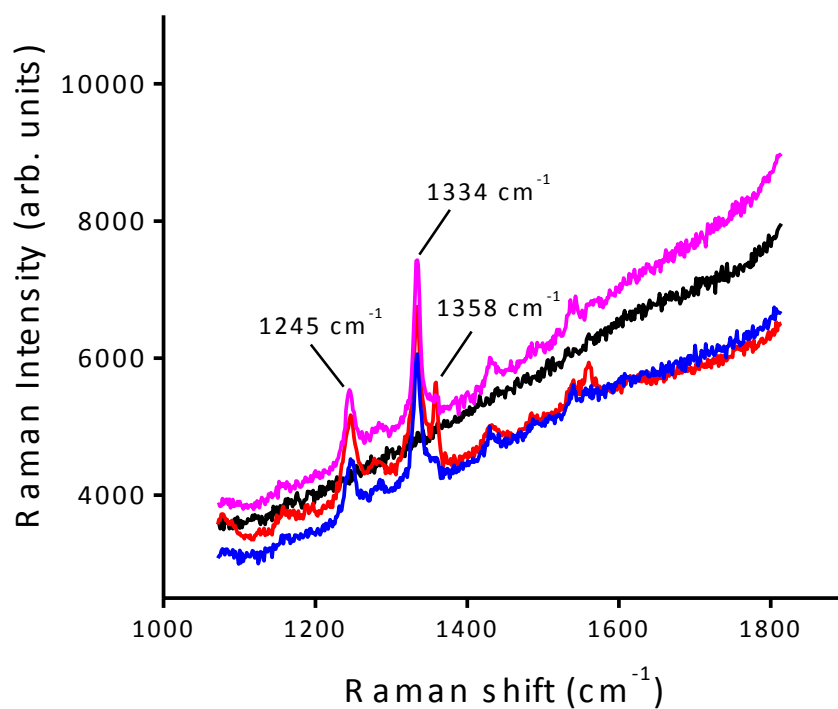


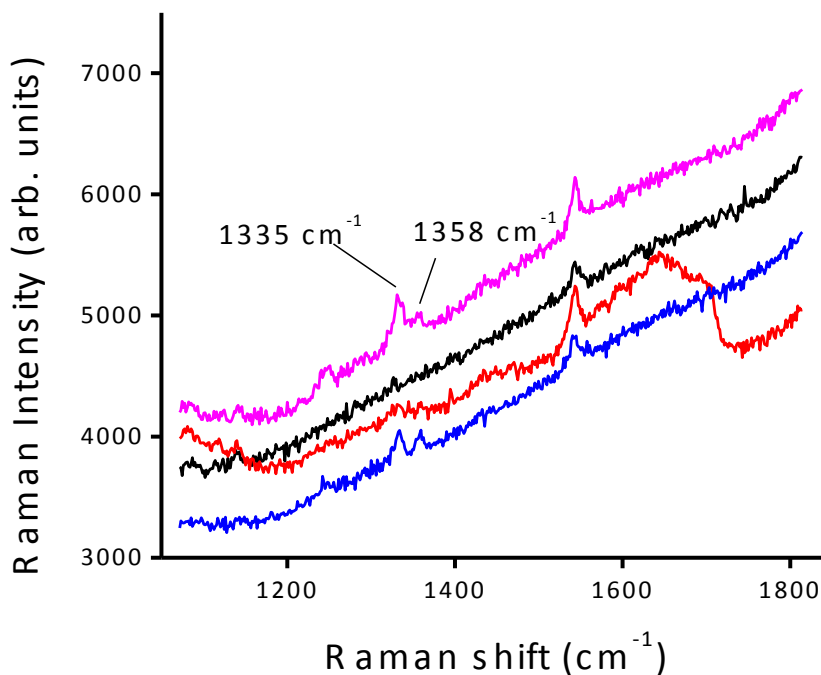
Figura 36B:



**Figura 36. Microscopía Raman de mitocondrias con MnP.** A) Mitocondrias con MnP (en negro), con succinato (rojo) y después de 10 minutos después del agregado de succinato (azul). B) Las PSM se muestran como control (negro), luego se agrega la MnP pero sin mezclar (rojo). Luego de mezclar la MnP con las PSM (azul) y con el agregado de succinato 6 mM (violeta). Se

observa la señal Raman de la MnP reducida cuando se mezclan los reactivos en la celda y aumenta con el agregado de succinato.

Después de haber demostrado que tanto en mitocondrias aisladas como en PSM se observan claramente bandas Raman características que son concluyentes de la incorporación de la MnTnBuOE-2-PyP a nivel de membranas, realizamos el mismo diseño experimental en cultivos de células endoteliales (Fig. 37). Pudimos observar que la MnTnBuOE-2-PyP se incorpora en las células y que la forma reducida aumenta con el tiempo de incubación.



**Figura 37. Espectro Raman de MnP incorporadas en BAECs.** Las BAECs fueron incubadas con MnP (5  $\mu$ M) a diferentes tiempos 3, 16 y 14 horas. A partir de finalizados esos tiempos de incubación, se retira el medio y se levantan con tripsina-edta, se realizan 3 lavados con PBS y se resuspende el pellet final de células en el mínimo volumen de PBS. Se colocan como gota sobre un portaobjeto y se enfoca el objetivo del microscopio confocal. Células sin MnP (negro), incubadas con MnP, 3 horas (rojo), 16 horas (azul) y 24 horas (violeta).

## 6 DISCUSIÓN

En este trabajo, demostramos la formación de peroxinitrito a partir de PSM que forman  $O_2^{\cdot-}$  en presencia de una fuente exógena  $^{\cdot}NO$  a través de una combinación de métodos. Ambas sondas quimioluminiscentes probadas, luminol y celenterazina, fueron capaces de revelar la formación de peroxinitrito, con patrones generales de quimioluminiscencia similares. Por otra parte, la adición de bolo de  $^{\cdot}NO$  o la exposición a un flujo sostenido de  $^{\cdot}NO$  por NOC-7 a las PSM, dio lugar a un aumento (“overshoot”) o a un aumento del estado estacionario en la emisión de luz, respectivamente (Figs. 19 y 20). La inhibición de la quimioluminiscencia del luminol y de la celenterazina por exceso de  $^{\cdot}NO$  reveló la naturaleza radicalar de ambos procesos de quimioexcitación, que conducen a la formación de radicales intermediarios del luminol y de la celenterazina que fácilmente se pueden combinar con  $^{\cdot}NO$  y promover la formación de productos derivados que los llevan a vías oscuras [146, 149]. Con la DHR se obtuvieron resultados similares (Fig. 21), la formación del producto de oxidación fluorescente, la RH fue significativa sólo cuando ambos  $O_2^{\cdot-}$  y  $^{\cdot}NO$  se forman juntos. El rendimiento de la oxidación DHR por  $O_2^{\cdot-}$  producido en las PSM muestra una curva en forma de campana en función del  $^{\cdot}NO$ , debido a la reacción competitiva de los intermediarios radicalares de la DHR con  $^{\cdot}NO$ . Un comportamiento similar al de la DHR ha sido observado anteriormente en otros sistemas formadores de  $O_2^{\cdot-}$  y  $^{\cdot}NO$  [158, 166] y refleja la naturaleza radicalar del proceso de oxidación de la sonda, lo que sin duda limita la precisión en la detección del peroxinitrito. En cualquier caso, si tenemos en cuenta el pico de la formación de RH y ~30% de rendimiento oxidación por el peroxinitrito [78], se puede estimar un flujo máximo de  $1.4 \mu M \text{ min}^{-1}$  de peroxinitrito, en presencia de un flujo de  $O_2^{\cdot-}$  de  $1.4 \mu M \text{ min}^{-1}$  a partir de  $0.75 \text{ mg/mL}$  PSM y un flujo de  $^{\cdot}NO$   $1.4 \mu M \text{ min}^{-1}$  por NOC-7 (es decir, la formación estequiométrica de peroxinitrito).

Interesantemente, se utilizó la sonda fluorescente CBA que se presentó como una herramienta prometedora para la detección específica de peroxinitrito en sistemas biológicos [166]. La ventaja de estas sondas basadas en boronatos radica en que reaccionan rápida y directamente con el peroxinitrito dando lugar a su producto de

oxidación, el COH, que se puede seguir fácilmente por espectroscopía de fluorescencia. Nuevamente, se obtuvo una oxidación significativa del CBA principalmente bajo condiciones que favorecen la formación de peroxinitrito en las PSM (es decir, suplementadas con succinato, antimicina A y NOC-7) (Fig. 22). En particular, la fluorescencia dependiente de COH aumentó en función de la concentración de NOC-7 hasta alcanzar una meseta. La señal de baja intensidad obtenida por las PSM en presencia de succinato y antimicina A y ausencia de  $^{\bullet}\text{NO}$  se debe a la oxidación lenta de la sonda por el peróxido de hidrógeno ( $k = 1.5 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [140]. Las sondas basadas en boronatos representan un paso adelante en términos de sensibilidad y especificidad para la detección de peroxinitrito en comparación con otras sondas más ampliamente utilizadas, tales como luminol o DHR que reaccionan con un gran número de oxidantes por un electrón y participan en reacciones secundarias (tales como reacciones con exceso de  $^{\bullet}\text{NO}$ ) que pueden llevar a resultados poco cuantitativos e incluso confusos. Teniendo en cuenta que el rendimiento de la reacción COH con peroxinitrito es de  $\sim 81\%$ , la cuantificación del flujo de peroxinitrito siempre se refleja estequiométricamente por uno de los precursores radicales limitantes, ya sea  $^{\bullet}\text{NO}$  o  $\text{O}_2^{\bullet -}$ . El resultado abre la posibilidad de generar boronatos dirigidos específicamente a la mitocondria, para medir la formación de peroxinitrito intramitocondrial.

La formación de peroxinitrito por las PSM expuestas a  $^{\bullet}\text{NO}$  fue demostrada también por ensayos de inmunquímica a través de la detección de la formación de aductos proteína-DMPO utilizando el anticuerpo anti-DMPO (Fig. 23). Es importante destacar que en nuestro laboratorio se ha detectado previamente aductos proteína-DMPO nitrada en mitocondrias intactas obtenidas del cerebro y médula espinal de animales sometidos a una enfermedad neurodegenerativa en la cual el peroxinitrito desempeña un rol en la patogenia de la enfermedad [120]. Los datos actuales confirman que la formación de peroxinitrito en el entorno mitocondrial es capaz de generar secundariamente radicales derivados de proteínas; y que a su vez, estos radicales derivados de proteínas podrían reaccionar con  $^{\bullet}\text{NO}$  o  $^{\bullet}\text{NO}_2$  y evolucionar a 3-nitrotirosina (aunque esto fue, como lo esperábamos, menos sensible que immunospin trapping debido a que las concentraciones milimolares de DMPO compiten mucho mejor por los radicales tirosilo proteicos que las submicromolares de  $^{\bullet}\text{NO}_2$ ). En efecto, en las mitocondrias las tirosinas proteicas nitradas se han observado

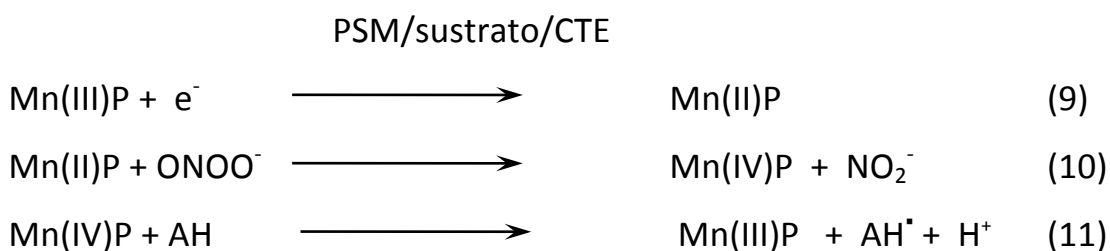
en un gran número de condiciones de enfermedad [167] e incluso en condiciones basales [168] y parecen participar en alteraciones de la homeostasis redox mitocondrial. Los datos presentados aquí (Fig. 23) muestran la utilidad de las técnicas inmunoquímicas para elucidar la reacción de radicales derivados del peroxinitrito en las mitocondrias.

La utilización del BTBE (análogo de tirosina) en mitocondrias, nos permitió orientarnos en el sitio de formación de peroxinitrito (compartimentalización mitocondrial). Inicialmente realizamos estudios de la incorporación de esta sonda a la membrana mitocondrial y observamos que era inocua para la función mitocondrial ya que no alteraba el grado de acople (a 37°C y agitación suave). Además, cuando extrajimos y separamos por RP-HPLC el BTBE, obtuvimos alto rendimiento de incorporación (>90%) en la fracción mitocondrial (Fig. 24). A partir de estos datos y en base a los estudios previos con DHR en PSM expuestas a óxido nítrico, observamos que la oxidación de DHR por  $\text{ONOO}^-$  resultaba inhibida con la pre-incorporación de BTBE en la membrana mitocondrial debido a que éste último compite por el  $\text{ONOO}^-$  con la DHR, disminuyendo la concentración de rodamina oxidada (Fig. 25). Posteriormente realizamos un estudio comparativo con el BTBE, utilizando una sonda también análoga de tirosina pero hidrofílica, el pHPA (se distribuye en el entorno acuoso). Pudimos observar que la inhibición se disminuía, con lo cual concluimos que el BTBE estaba localizándose en el compartimento de formación de  $\text{ONOO}^-$  en la membrana interna mitocondrial (Fig. 25). Por otra parte, cuando extrajimos y separamos este BTBE pre-incorporado en las PSM que formaban  $\text{ONOO}^-$ , observamos que el producto mayoritario y casi exclusivo era el di-BTBE (Fig. 26).

Datos previos en nuestro laboratorio [162], demostraban la conexión entre la formación de di-BTBE y la lipoperoxidación lipídica en liposomas (Fig. 27). Se mostraba claramente que la nitración y dimerización de tirosinas proteicas por oxidantes biológicamente relevantes, transcurre a través de la formación de radical tirosilo. En el caso particular de la oxidación de tirosinas asociada a biocompartimentos, tienen un rol esencial los ácidos grasos insaturados constituyentes de las membranas biológicas. En ese trabajo propusieron que los radicales lipídicos derivados de ácidos grasos poliinsaturados (radicales alcoxilo y peroxilo), pueden promover la oxidación por un electrón de la tirosina para dar el correspondiente radical tirosilo ( $^{\bullet}\text{Tyr}$ ). Una vez

formado este <sup>•</sup>Tyr podría reaccionar con un <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> para formar 3-nitro-Tyr o reaccionar con otro <sup>•</sup>Tyr y formar di-Tyr a través de la formación de radicales lipídicos. En ese trabajo usaron al BTBE incorporado a liposomas con ácidos grasos insaturados para evaluar esta hipótesis y su asociación con el proceso de lipoperoxidación. En base a estos datos, estimamos la lipoperoxidación mitocondrial a través de TBARs, cuantificando MDA cuando inducíamos con *t*-BOOH [169]. El resultado fue que la cantidad de di-BTBE aumentaba a medida que aumentaba la formación de MDA y la concentración de *t*-BOOH (Fig. 28). Estos datos apoyan que el ONOO<sup>-</sup> formado por las PSM estaría promoviendo oxidación lipídica y estos radicales lipídicos pueden oxidar por un electrón al BTBE, produciendo di-BTBE como producto mayoritario, en consistencia con los datos previamente reportados [162].

Una vez demostrada la formación de peroxinitrito en la mitocondria y conociendo el daño que esta molécula altamente oxidante y nitrante produce sobre proteínas clave del metabolismo mitocondrial, nos propusimos incorporar a nuestro modelo la utilización de MnP. Basados en un trabajo publicado por nuestro grupo [135] donde se demuestra que pueden ser reducidas por PSM suplementadas con sustratos a Mn(II) en ausencia de oxígeno y de esta forma pueden desempeñar un papel en la eliminación de peroxinitrito a través del siguiente ciclo catalítico:



Donde AH representa un donador de electrones, tal como puede ser el glutatión, el ácido ascórbico y el ácido úrico, que pueden reaccionar fácilmente con Mn(IV)P [135].

El primer paso es crítico (Ec. 9) y exige que las MnP tomen un electrón a partir de los complejos respiratorios, proceso que está en competencia con la transferencia de electrones normal hacia el oxígeno molecular. Dado que la reducción de los niveles de oxígeno, incrementan el grado de reducción de los complejos respiratorios y la

probabilidad de la Ec. 9, en este trabajo se exploró si las MnP se podían reducir por la cadena de transporte de electrones incluso a los niveles normales de oxígeno mitocondrial ( $\sim 3\text{-}30\ \mu\text{M}$ ) y posteriormente disminuir el daño causado por el peroxinitrito. Experimentos previos mostraron a las MnP actuando como reductores catalíticos en las mitocondrias bajo condiciones anóxicas [135], una situación que tiene relevancia fisiopatológica limitada. La eficacia antioxidante de las MnP está relacionada con su capacidad para aceptar y donar electrones, y ésta capacidad depende de las propiedades físico-químicas de cada compuesto basado en Mn. Hay una amplia variedad de MnP que difieren en su hidrofobicidad, potencial de reducción, carga eléctrica, sustituyentes y reactividad, entre otras propiedades [163]. La MnTE-2-PyP es una metaloporfirina hidrofílica con  $E_{1/2} = +0.228\ \text{V vs. ENH}$ , y ha sido el más comúnmente utilizado en los modelos de estrés oxidativo. A su vez, una porfirina más nueva, la MnTnHex-2-PyP tiene un mayor potencial redox ( $E_{1/2} = +0.314\ \text{V}$ ) y cadenas alquilo más largas que mejoran la lipofilicidad. A pesar de estas propiedades, que probablemente influyen en su interacción redox con la membrana mitocondrial interna, su reactividad con peroxinitrito es similar [163]. Figura 29E muestra el potencial redox de los complejos respiratorios I y II, de las MnP utilizadas y del oxígeno molecular. El potencial redox de la MnTnHex-2-PyP es ligeramente mayor que la de MnTE-2-PyP, y esto la hace más adecuada para su reducción por los complejos respiratorios. En efecto, la reducción de MnTE-2-PyP por el complejo I y II (Fig. 29A y 29B, respectivamente) se produce simultáneamente con la disminución de los niveles de oxígeno durante el proceso. Observamos que en aproximadamente  $10\ \mu\text{M}$  oxígeno, la MnTE-2-PyP fue reducida casi completamente por el complejo I (con NADH), que se manifiesta por un aumento de la absorbancia a  $439\ \text{nm}$ . Las PSM suplementadas con succinato, mostraron un proceso de reducción mucho más lento, pero en aproximadamente  $10\ \mu\text{M}$  de oxígeno, casi el 50% de la MnTE-2-PyP se redujo. Además, en el caso de la reducción de MnTnHex-2-PyP, la velocidad de la reacción es el doble para el complejo I y se acelera cinco veces para el complejo II, lo cual está de acuerdo con sus características fisicoquímicas. Entonces, bajo condiciones de formación de peroxinitrito en el sistema de PSM, la MnTE-2-PyP fue capaz de proteger en gran medida tanto de la inactivación de la actividad NADH deshidrogenasa dependiente de peroxinitrito, como la inhibición del consumo de oxígeno dependiente del complejo I

(Fig. 31), apoyando el concepto de que las MnP pueden sufrir ciclos redox catalíticos en la mitocondria para proteger del daño oxidativo dependiente de peroxinitrito como se propone en las reacciones de 1-3 y previamente [135]. Este argumento se confirmó además por la acción protectora de las MnP en la formación de radicales proteicos (Fig. 32) y nitrotirosina (Fig. 33). Es importante destacar que los bajos niveles de concentración micromolar de MnP (5  $\mu\text{M}$ ) fueron capaces de suministrar protección a las altas concentraciones de peroxinitrito (hasta 300  $\mu\text{M}$ ), los cuales son los niveles alcanzables en las mitocondrias *in vivo*, bajo regímenes de dosis demostrando que proporcionan una acción farmacológica [170].

Pudimos evaluar la protección antioxidante de las MnP en un cultivo de células endoteliales, evaluando un marcador de estrés nitroxidativo como la nitración de tirosinas proteicas. Observamos que las MnP preincubadas con el cultivo celular podían ejercer efectos protectores frente a la nitración mediada por  $\text{ONOO}^-$  a partir de un dador exógeno (SIN-1) (Fig. 34). Por otra parte y en base a la complejidad que representaba demostrar directamente la incorporación y reducción de las MnP *in situ*, tanto en células como en mitocondrias, utilizamos una metodología novedosa como es la Microscopía Confocal Raman Resonante. En esta técnica, a partir de espectros Raman de las MnP en forma reducida y oxidada (Fig. 35), pudimos identificar las bandas Raman características para estos compuestos (MnP oxidada: 1358 y 1558  $\text{cm}^{-1}$  y MnP reducida: 1245, 1334 y 1537  $\text{cm}^{-1}$ ) y evaluamos también que el límite de sensibilidad del equipo era 2  $\mu\text{M}$ . En base a estos datos característicos, pudimos identificar a las MnP tanto en PSM como en mitocondrias (Fig. 36), y observamos que frente al agregado de un sustrato respiratorio como el succinato aparecen las bandas características de la MnP reducida. Más interesante aún fue que las células que habían sido incubadas con las MnP a diferentes tiempos, mostraban bandas de Raman resonante para la MnP oxidada a tiempos cortos de incubación y de MnP reducida a tiempos largos de incubación (Fig. 37). Con lo cual pudimos confirmar que las MnP se incorporan en las células a una concentración que puede ser observada en el Raman y que estas pueden existir reducidas en el entorno celular.

En conclusión, hemos demostrado la formación de peroxinitrito en PSM inducidas a formar  $\text{O}_2^{\cdot-}$  expuestas a  $\cdot\text{NO}$  con una variedad de metodologías. En particular, el uso de una sonda basada en boronatos (CBA) para cuantificar el peroxinitrito y la aplicación



de técnicas de *immunospintrapping* para evaluar el daño oxidativo de proteínas, amplía aún más las posibilidades de medir estos procesos en mitocondrias intactas e incluso en células. Mientras que la formación mitocondrial de  $O_2^{\cdot-}$  en este trabajo fue estimulada por el uso de la antimicina A (inhibidor de la respiración), el modelo representa un ejemplo general para otras condiciones que promueven la fuga de electrones al oxígeno molecular. Además, hemos sido capaces de demostrar que las MnP pueden reducir catalíticamente el peroxinitrito después de interactuar y tomar electrones de la cadena de transporte mitocondrial. Trabajos en curso de nuestro laboratorio confirman que estas observaciones obtenidas en PSM pueden ser reproducidas en mitocondrias intactas (Fig. 30). Por otra parte, pudimos ver este mismo efecto protector de las MnP en células endoteliales, ya que atenúan la nitración proteica inducida por peroxinitrito. Además, pudimos confirmar a través de microscopía confocal Raman resonante, la incorporación y reducción de las MnP en sistemas biológicos.

***Por lo tanto, nuestros datos apoyan directamente la formación de peroxinitrito en la mitocondria y demuestran que las MnP pueden someterse a un ciclo redox catalítico para neutralizar el daño oxidativo mitocondrial dependiente de peroxinitrito.***

De los resultados y observaciones experimentales realizadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, surgieron las siguientes publicaciones en revistas arbitradas y presentaciones en eventos:

Publicaciones en revistas arbitradas:

- 1) **Valez V**, Cassina A, Batinic-Haberle I, Kalyanaraman B, Ferrer-Sueta G, Radi R. (2013)  
*Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins.* Arch Biochem Biophys. 1;529(1):45-54. doi: 0.1016/j.abb.2012.10.012. Epub 2012 Nov 8.
- 2) **Valez V**, Aicardo, A., Cassina, A., Quijano, C., Radi, R. (2012) *Oxidative Stress in Mitochondria.* Principles of Free Radical Biomedicine. Pantopoulos K., Schipper H., editors. New York; 2012. p 283 - 302. *Review*
- 3) Bartesaghi S, **Valez V**, Trujillo M, Peluffo G, Romero N, Zhang H, Kalyanaraman B, Radi R. (2006) *Mechanistic studies of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration in membranes using the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester.* Biochemistry. 2006 Jun 6;45(22):6813-25.
- 4) Bartesaghi S, Ferrer-Sueta G, Peluffo G, **Valez V**, Zhang H, Kalyanaraman B, Radi R. (2007)  
*Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments.* Amino Acids. 32(4):501-15. Epub 2006 Nov 2. *Review.*

Resúmenes en eventos:

- 1) *Coelenterazine chemiluminescence as an indicator of superoxide and peroxynitrite formation in mitochondria and cells*, en 12<sup>th</sup> Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International Buenos Aires, Argentina - Mayo 2004.

- 2) *N-t-BOC L-Tyrosine tert-butyl ester (BTBE) incorporated into phosphatidylcholine liposomes for mechanistic studies of nitration in hydrophobic environments*, en el IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine y la XXXIV Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. Junio 29 a julio 2, de 2005, Aguas de Lindoia, San Pablo, Brazil.
- 3) *Nitration and dimerization by peroxynitrite of the hydrophobic tyrosine analog N-t-BOC L-Tyrosine tert-butyl ester (BTBE) in model membranes with saturated and polyunsaturated fatty acids*, en la XXXV Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. 1 al 4 de julio de 2006, Aguas de Lindoia, San pablo, Brazil.
- 4) *Peroxynitrite detection in mitochondria: chemiluminescence and fluorescence probes, immunospin-trapping and oxidation/nitration of proteins and tyrosine analogs*, en Free Radicals in Montevideo 2007, V Meeting of SFRBM – South American Group, and V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species. Septiembre 2-6, 2007. Montevideo, Uruguay.
- 5) *Mitochondria are capable of manganese porphyrin reduction and catalytically decompose ONOO<sup>-</sup>*, en la XXXV Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq y en el XI congreso de la Asociación Panamericana de Bioquímica y Biología Molecular (PABMB). 17 al 20 de mayo de 2008, Aguas de Lindoia, San pablo, Brazil.
- 6) *Formación de peroxinitrito en partículas submitocondriales expuestas a un dador de <sup>•</sup>NO: detección por sondas quimioluminiscentes, fluorescentes e inmunoquímicas*, en Jornadas de la SUB 2012, 31 de agosto al 2 de setiembre, en Hotel Argentino, Piriápolis, Maldonado.

- 7) *Peroxynitrite formation in nitric oxide- exposed submitochondrial particles: detection and quantitation by a boronic acid- based probe*, en la 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM) del 14 al 18 de noviembre de 2012, San Diego, California, USA.

Presentaciones orales en eventos:

- 1) *Mitochondria are capable of manganese porphyrin reduction and catalytically decompose ONOO<sup>-</sup>*, en el Simposio "SBBq-PABMB Cone Sul Symposium" durante la XXXV Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq y el XI congreso de la Asociación Panamericana de Bioquímica y Biología Molecular (PABMB). 17 al 20 de mayo de 2008, Aguas de Lindoia, San pablo, Brazil.
- 2) *Peroxynitrite formation and reactions in submitochondrial particles exposed to nitric oxide: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins* en Simposio: Rol de la Mitochondria en la Patología Humana. Hotel Cala di Volpe, Montevideo, Uruguay. Durante el curso Mitochondria: bioenergética, metabolismo oxidativo y señalización, en Facultad de Medicina, UdelaR, del 9 al 27 de julio de 2012.
- 3) *Peroxynitrite formation and reactions in submitochondrial particles exposed to nitric oxide: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins*, en el V Mitomeeting, del 7 al 10 de agosto de 2012, Guapé, Minas Gerais, Brazil.

Otras publicaciones relacionadas a la tesis:

Quijano C, Castro L, Peluffo G, **Valez V**, Radi R. (2007) *Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293(6):H3404-14. Epub 2007 Sep 28.

## **7 PERSPECTIVAS**

Con respecto a los compuestos dirigidos a la mitocondria, tenemos como perspectiva el desarrollo futuro de mitoBTBE, mito péptidos de tirosina, profundizando en la línea de los resultados con los péptidos SS, modulando el estrés nitrooxidativo mitocondrial y las consecuencias sobre la bioenergética mitocondrial y los fenómenos de señalización de muerte, abriendo interesantes perspectivas farmacológicas.

Con respecto a la utilización de las MnP, seguiremos trabajando con los cultivos celulares, evaluando su actividad en modelos de enfermedad o de aumento de estrés nitrooxidativo, y explorando nuevas técnicas como el Raman para su detección y cuantificación.

## 8 AGRADECIMIENTOS

A Rafael, por todos estos años de orientación científica, por el apoyo, las enseñanzas y por incentivar me con el arte científico. Por generar este espacio maravilloso que es el CEINBIO.

A Adriana, por dejarme entrar en “la cueva”, por contagiarme esa pasión por las mitocondrias, por su apoyo en la ciencia y en la vida.

En lo que respecta a esta tesis, le agradezco a Gerardo, por iniciarme en el trabajo con las porfirinas y por estar siempre apoyando; a Celia, porque me enseñó todos sobre el asombroso mundo de las BAECs; a Silvina por el apoyo, y por enseñarme a hacer HPLC; y a Sebastián por su ayuda con las porfirinas, por su buena onda y generosidad inagotable.

A todos mis compañeros y amigos del CEINBIO, por el buen ambiente de trabajo de siempre, y en particular a Adrián que me acompañó en buena parte de este trabajo, ayudando con discusiones e ideas nuevas.

## 9 REFERENCIAS

1. Altmann, R., *Die Elementar Organismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. 1890, Veit, Leipzig.
2. Benda, C. (1898) *Weitere Mitteilungen über die Mitochondria*, in *Archives in Analytical Physiology*: Berlín. p. 393 - 398.
3. Michaelis, L. (1900) *Die vitale Färbung, eine Darstellungsmethode der Zellgrana*, in *Arch Mikrok Anat.* p. 558 - 575.
4. Lazarow, A. and S.J. Cooperstein. (1953) *Studies on the enzymatic basis for the Janus green B staining reaction*. *J Histochem Cytochem.* 1(4): p. 234-41.
5. Kingsbury, B.F. (1912) *Anat. Rec.* 6: p. 39 - 52.
6. Keilin, D. (1925) *Proc. R. Soc. Lond. B Biol.* 98: p. 312 - 339.
7. Bensley, R. (1934) *Anat. Rec.* 60: p. 449-455.
8. Krebs, H.A. and W.A. Johnson. (1937) *Metabolism of ketonic acids in animal tissues*. *Biochem J.* 31(4): p. 645-60.
9. Kennedy, E.P. and A.L. Lehninger. (1949) *Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria*. *J Biol Chem.* 179(2): p. 957-72.
10. Palade, G.E. (1952) *The fine structure of mitochondria*. *Anat Rec.* 114(3): p. 427-51.
11. Sjostrand, F.S. (1953) *Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes*. *Nature.* 171(4340): p. 30-2.
12. Palade, G.E. (1964) *The Organization of Living Matter*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 52: p. 613-34.
13. Mitchell, P. (1961) *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. *Nature.* 191: p. 144-8.
14. Mitchell, P. (1966) *Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation*. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 41(3): p. 445-502.
15. Margulis, L., *Symbiosis in Cell Evolution* 1981, San Francisco: W. H. Freeman.
16. Embley, T.M. and W. Martin. (2006) *Eukaryotic evolution, changes and challenges*. *Nature.* 440(7084): p. 623-30.
17. Cox, C.J., P.G. Foster, R.P. Hirt, S.R. Harris, and T.M. Embley. (2008) *The archaeobacterial origin of eukaryotes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(51): p. 20356-61.
18. Boxma, B., R.M. de Graaf, G.W. van der Staay, T.A. van Alen, G. Ricard, T. Gabaldon, A.H. van Hoek, S.Y. Moon-van der Staay, W.J. Koopman, J.J. van Hellemond, A.G. Tielens, T. Friedrich, M. Veenhuis, M.A. Huynen, and J.H. Hackstein. (2005) *An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen*. *Nature.* 434(7029): p. 74-9.

19. Scheffler, I.E., *Mitochondria*. Second ed 2008: John Wiley & Sons, Inc., Publication.
20. Frey, T.G. and C.A. Mannella. (2000) *The internal structure of mitochondria*. Trends Biochem Sci. 25(7): p. 319-24.
21. Perkins, G.A., J.Y. Song, L. Tarsa, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, and T.G. Frey. (1998) *Electron tomography of mitochondria from brown adipocytes reveals crista junctions*. J Bioenerg Biomembr. 30(5): p. 431-42.
22. Perkins, G., C. Renken, M.E. Martone, S.J. Young, M. Ellisman, and T. Frey. (1997) *Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts*. J Struct Biol. 119(3): p. 260-72.
23. Saxton, W.M. and P.J. Hollenbeck. (2012) *The axonal transport of mitochondria*. J Cell Sci. 125(Pt 9): p. 2095-104.
24. Westermann, B. (2010) *Mitochondrial fusion and fission in cell life and death*. Nat Rev Mol Cell Biol. 11(12): p. 872-84.
25. Devlin, T.M., *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Seventh ed 2010: John Wiley & Sons, Inc.
26. Boveris, A., N. Oshino, and B. Chance. (1972) *The cellular production of hydrogen peroxide*. Biochem J. 128(3): p. 617-30.
27. Turrens, J.F. (2003) *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol. 552(Pt 2): p. 335-44.
28. Valez, V., A. Cassina, I. Batinic-Haberle, B. Kalyanaraman, G. Ferrer-Sueta, and R. Radi. (2013) *Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins*. Arch Biochem Biophys. 529(1): p. 45-54.
29. St-Pierre, J., J.A. Buckingham, S.J. Roebuck, and M.D. Brand. (2002) *Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain*. J Biol Chem. 277(47): p. 44784-90.
30. Quijano, C., L. Castro, G. Peluffo, V. Valez, and R. Radi. (2007) *Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293(6): p. H3404-14.
31. Gardner, P.R., I. Raineri, L.B. Epstein, and C.W. White. (1995) *Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells*. J Biol Chem. 270(22): p. 13399-405.
32. Andreyev, H.J., M.A. Kamm, A. Forbes, and R.J. Nicholls. (1996) *Joint symptoms after restorative proctocolectomy in ulcerative colitis and familial polyposis coli*. J Clin Gastroenterol. 23(1): p. 35-9.
33. Kussmaul, L. and J. Hirst. (2006) *The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(20): p. 7607-12.



34. Turrens, J.F. and A. Boveris. (1980) *Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria*. *Biochem J.* 191(2): p. 421-7.
35. Lenaz, G. (2001) *The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology*. *IUBMB Life.* 52(3-5): p. 159-64.
36. Zhang, L., L. Yu, and C.A. Yu. (1998) *Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria*. *J Biol Chem.* 273(51): p. 33972-6.
37. Boveris, A., E. Cadenas, and A.O. Stoppani. (1976) *Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide*. *Biochem J.* 156(2): p. 435-44.
38. Cadenas, E., A. Boveris, C.I. Ragan, and A.O. Stoppani. (1977) *Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria*. *Arch Biochem Biophys.* 180(2): p. 248-57.
39. Han, D., E. Williams, and E. Cadenas. (2001) *Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space*. *Biochem J.* 353(Pt 2): p. 411-6.
40. Turrens, J.F., A. Alexandre, and A.L. Lehninger. (1985) *Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria*. *Arch Biochem Biophys.* 237(2): p. 408-14.
41. Adam-Vizi, V. and L. Tretter. (2013) *The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress*. *Neurochem Int.*
42. Sheu, K.F. and J.P. Blass. (1999) *The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex*. *Ann N Y Acad Sci.* 893: p. 61-78.
43. Brand, M.D. (2010) *The sites and topology of mitochondrial superoxide production*. *Exp Gerontol.* 45(7-8): p. 466-72.
44. Orr, A.L., C.L. Quinlan, I.V. Perevoshchikova, and M.D. Brand. (2012) *A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase*. *J Biol Chem.* 287(51): p. 42921-35.
45. Hirst, J. (2010) *Towards the molecular mechanism of respiratory complex I*. *Biochem J.* 425(2): p. 327-39.
46. Starkov, A.A. (2008) *The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling*. *Ann N Y Acad Sci.* 1147: p. 37-52.
47. Starkov, A.A. (2012) *An update on the role of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase in oxidative stress*. *Mol Cell Neurosci.*
48. Tretter, L. and V. Adam-Vizi. (2012) *High Ca<sup>2+</sup> load promotes hydrogen peroxide generation via activation of alpha-glycerophosphate dehydrogenase in brain mitochondria*. *Free Radic Biol Med.* 53(11): p. 2119-30.
49. Turrens, J.F., B.A. Freeman, J.G. Levitt, and J.D. Crapo. (1982) *The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles*. *Arch Biochem Biophys.* 217(2): p. 401-10.

50. Yusa, T., J.D. Crapo, and B.A. Freeman. (1984) *Hyperoxia enhances lung and liver nuclear superoxide generation*. Biochim Biophys Acta. 798(2): p. 167-74.
51. Duranteau, J., N.S. Chandel, A. Kulisz, Z. Shao, and P.T. Schumacker. (1998) *Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes*. J Biol Chem. 273(19): p. 11619-24.
52. Mitchell, P. (1977) *Vectorial chemiosmotic processes*. Annu Rev Biochem. 46: p. 996-1005.
53. Korshunov, S.S., V.P. Skulachev, and A.A. Starkov. (1997) *High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria*. FEBS Lett. 416(1): p. 15-8.
54. Dietrich, M.O. and T.L. Horvath. (2010) *The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan*. Pflugers Arch. 459(2): p. 269-75.
55. Brand, M.D. and T.C. Esteves. (2005) *Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3*. Cell Metab. 2(2): p. 85-93.
56. Kowaltowski, A.J., E.S. Naia-da-Silva, R.F. Castilho, and A.E. Vercesi. (1998) *Ca<sup>2+</sup>-stimulated mitochondrial reactive oxygen species generation and permeability transition are inhibited by dibucaine or Mg<sup>2+</sup>*. Arch Biochem Biophys. 359(1): p. 77-81.
57. Richter, C. (1997) *Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis and respiration*. Biosci Rep. 17(1): p. 53-66.
58. Sullivan, P.G. and M.R. Brown. (2005) *Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 29(3): p. 407-10.
59. Winklhofer, K.F. and C. Haass. (2010) *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Biochim Biophys Acta. 1802(1): p. 29-44.
60. Groeger, G., C. Quiney, and T.G. Cotter. (2009) *Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule*. Antioxid Redox Signal. 11(11): p. 2655-71.
61. Radi, R., J.F. Turrens, L.Y. Chang, K.M. Bush, J.D. Crapo, and B.A. Freeman. (1991) *Detection of catalase in rat heart mitochondria*. J Biol Chem. 266(32): p. 22028-34.
62. Kowaltowski, A.J., N.C. de Souza-Pinto, R.F. Castilho, and A.E. Vercesi. (2009) *Mitochondria and reactive oxygen species*. Free Radic Biol Med. 47(4): p. 333-43.
63. Yarian, C.S., D. Toroser, and R.S. Sohal. (2006) *Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice*. Mech Ageing Dev. 127(1): p. 79-84.
64. Gardner, P.R. and I. Fridovich. (1991) *Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase*. J Biol Chem. 266(29): p. 19328-33.

65. Grimsrud, P.A., H. Xie, T.J. Griffin, and D.A. Bernlohr. (2008) *Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes*. J Biol Chem. 283(32): p. 21837-41.
66. Sinibaldi, F., B.D. Howes, M.C. Piro, F. Polticelli, C. Bombelli, T. Ferri, M. Coletta, G. Smulevich, and R. Santucci. (2010) *Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: a model for protein-mitochondrial membrane binding*. J Biol Inorg Chem. 15(5): p. 689-700.
67. Kagan, V.E., H.A. Bayir, N.A. Belikova, O. Kapralov, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, J. Jiang, D.A. Stoyanovsky, P. Wipf, P.M. Kochanek, J.S. Greenberger, B. Pitt, A.A. Shvedova, and G. Borisenko. (2009) *Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death*. Free Radic Biol Med. 46(11): p. 1439-53.
68. Abriata, L.A., A. Cassina, V. Tortora, M. Marin, J.M. Souza, L. Castro, A.J. Vila, and R. Radi. (2009) *Nitration of solvent-exposed tyrosine 74 on cytochrome c triggers heme iron-methionine 80 bond disruption. Nuclear magnetic resonance and optical spectroscopy studies*. J Biol Chem. 284(1): p. 17-26.
69. Kagan, V.E., V.A. Tyurin, J. Jiang, Y.Y. Tyurina, V.B. Ritov, A.A. Amoscato, A.N. Osipov, N.A. Belikova, A.A. Kapralov, V. Kini, Vlasova, II, Q. Zhao, M. Zou, P. Di, D.A. Svistunenko, I.V. Kurnikov, and G.G. Borisenko. (2005) *Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors*. Nat Chem Biol. 1(4): p. 223-32.
70. Radi, R., K.M. Bush, and B.A. Freeman. (1993) *The role of cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation*. Arch Biochem Biophys. 300(1): p. 409-15.
71. Souza, J.C., Laura; Cassina, Adriana; Batthyány, Carlos and Radi, Rafael., *Nitrocytochrome c: synthesis, purification, and functional studies.*, in *Methods Enzymol*, E. Inc., Editor 2008.
72. Alexeyev, M.F. (2009) *Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species?* FEBS J. 276(20): p. 5768-87.
73. Niles, J.C., J.S. Wishnok, and S.R. Tannenbaum. (2006) *Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation*. Nitric Oxide. 14(2): p. 109-21.
74. Cassina, A. and R. Radi. (1996) *Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport*. Arch Biochem Biophys. 328(2): p. 309-16.
75. Poderoso, J.J., M.C. Carreras, C. Lisdero, N. Riobo, F. Schopfer, and A. Boveris. (1996) *Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles*. Arch Biochem Biophys. 328(1): p. 85-92.

76. Radi, R., M. Rodriguez, L. Castro, and R. Telleri. (1994) *Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite*. Arch Biochem Biophys. 308(1): p. 89-95.
77. Ferrer-Sueta, G. and R. Radi. (2009) *Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals*. ACS Chem Biol. 4(3): p. 161-77.
78. Radi, R., G. Peluffo, M.N. Alvarez, M. Naviliat, and A. Cayota. (2001) *Unraveling peroxynitrite formation in biological systems*. Free Radic Biol Med. 30(5): p. 463-88.
79. Radi, R., A. Cassina, R. Hodara, C. Quijano, and L. Castro. (2002) *Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria*. Free Radic Biol Med. 33(11): p. 1451-64.
80. Poderoso, J.J., M.C. Carreras, F. Schopfer, C.L. Lisdero, N.A. Riobo, C. Giulivi, A.D. Boveris, A. Boveris, and E. Cadenas. (1999) *The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance*. Free Radic Biol Med. 26(7-8): p. 925-35.
81. Radi, R., A. Denicola, and B.A. Freeman. (1999) *Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate*. Methods Enzymol. 301: p. 353-67.
82. Romero, N., A. Denicola, J.M. Souza, and R. Radi. (1999) *Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide*. Arch Biochem Biophys. 368(1): p. 23-30.
83. Batthyany, C., J.M. Souza, R. Duran, A. Cassina, C. Cervenansky, and R. Radi. (2005) *Time course and site(s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxynitrite*. Biochemistry. 44(22): p. 8038-46.
84. Cassina, A.M., R. Hodara, J.M. Souza, L. Thomson, L. Castro, H. Ischiropoulos, B.A. Freeman, and R. Radi. (2000) *Cytochrome c nitration by peroxynitrite*. J Biol Chem. 275(28): p. 21409-15.
85. Tortora, V., C. Quijano, B. Freeman, R. Radi, and L. Castro. (2007) *Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation*. Free Radic Biol Med. 42(7): p. 1075-88.
86. MacMillan-Crow, L.A., J.P. Crow, J.D. Kerby, J.S. Beckman, and J.A. Thompson. (1996) *Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts*. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(21): p. 11853-8.
87. Demicheli, V., C. Quijano, B. Alvarez, and R. Radi. (2007) *Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide*. Free Radic Biol Med. 42(9): p. 1359-68.
88. Quijano, C., D. Hernandez-Saavedra, L. Castro, J.M. McCord, B.A. Freeman, and R. Radi. (2001) *Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration*. J Biol Chem. 276(15): p. 11631-8.
89. Dolder, M., S. Wendt, and T. Wallimann. (2001) *Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide*

- translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage.* Biol Signals Recept. 10(1-2): p. 93-111.
90. Zorov, D.B., M. Juhaszova, Y. Yaniv, H.B. Nuss, S. Wang, and S.J. Sollott. (2009) *Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore.* Cardiovasc Res. 83(2): p. 213-25.
  91. Konorev, E.A., N. Hogg, and B. Kalyanaraman. (1998) *Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite.* FEBS Lett. 427(2): p. 171-4.
  92. Aulak, K.S., M. Miyagi, L. Yan, K.A. West, D. Massillon, J.W. Crabb, and D.J. Stuehr. (2001) *Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge.* Proc Natl Acad Sci U S A. 98(21): p. 12056-61.
  93. Yamakura, F., H. Taka, T. Fujimura, and K. Murayama. (1998) *Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine.* J Biol Chem. 273(23): p. 14085-9.
  94. Turko, I.V., S. Marcondes, and F. Murad. (2001) *Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 281(6): p. H2289-94.
  95. Castro, L., V. Demicheli, V. Tortora, and R. Radi. (2011) *Mitochondrial protein tyrosine nitration.* Free Radic Res. 45(1): p. 37-52.
  96. Romero, N., G. Peluffo, S. Bartesaghi, H. Zhang, J. Joseph, B. Kalyanaraman, and R. Radi. (2007) *Incorporation of the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester to red blood cell membranes to study peroxynitrite-dependent reactions.* Chem Res Toxicol. 20(11): p. 1638-48.
  97. Szeto, H.H. (2008) *Development of mitochondria-targeted aromatic-cationic peptides for neurodegenerative diseases.* Ann N Y Acad Sci. 1147: p. 112-21.
  98. Ye, Y., C. Quijano, K.M. Robinson, K.C. Ricart, A.L. Strayer, M.A. Sahawneh, J.J. Shacka, M. Kirk, S. Barnes, M.A. Accavitti-Loper, R. Radi, J.S. Beckman, and A.G. Estevez. (2007) *Prevention of peroxynitrite-induced apoptosis of motor neurons and PC12 cells by tyrosine-containing peptides.* J Biol Chem. 282(9): p. 6324-37.
  99. Valez, V., Aicardo, A., Cassina, A., Quijano, C., Radi, R., *Oxidative Stress in Mitochondria*, in *Principles of Free Radical Biomedicine*, K. Pantopoulos, Schipper, H., Editor 2012, Nova Science Publishers, Inc.: New York. p. 283 - 302.
  100. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet. (2007) *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.* Physiol Rev. 87(1): p. 315-424.
  101. Calcerrada, P., G. Peluffo, and R. Radi. (2011) *Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications.* Curr Pharm Des. 17(35): p. 3905-32.

102. Sies, H. (1991) *Oxidative stress: from basic research to clinical application*. Am J Med. 91(3C): p. 31S-38S.
103. Pacher, P. and C. Szabo. (2006) *Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes*. Curr Opin Pharmacol. 6(2): p. 136-41.
104. Szabo, C. (2009) *Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction*. Br J Pharmacol. 156(5): p. 713-27.
105. Cosentino, F., K. Hishikawa, Z.S. Katusic, and T.F. Luscher. (1997) *High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells*. Circulation. 96(1): p. 25-8.
106. Pacher, P. and C. Szabo. (2005) *Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme*. Antioxid Redox Signal. 7(11-12): p. 1568-80.
107. Varvarovska, J., J. Racek, F. Stozicky, J. Soucek, L. Trefil, and R. Pomahacova. (2003) *Parameters of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus and their relatives*. J Diabetes Complications. 17(1): p. 7-10.
108. McCord, J.M. (1976) *Iron- and manganese-containing superoxide dismutases: structure, distribution, and evolutionary relationships*. Adv Exp Med Biol. 74: p. 540-50.
109. Inarrea, P., H. Moini, D. Rettori, D. Han, J. Martinez, I. Garcia, E. Fernandez-Vizarra, M. Iturralde, and E. Cadenas. (2005) *Redox activation of mitochondrial intermembrane space Cu,Zn-superoxide dismutase*. Biochem J. 387(Pt 1): p. 203-9.
110. Flohé, L., *Peroxiredoxin Systems*. Subcellular Biochemistry, ed. J. Harris. Vol. 44. 2007, New York: Springer.
111. Schopfer, F., N. Riobo, M.C. Carreras, B. Alvarez, R. Radi, A. Boveris, E. Cadenas, and J.J. Poderoso. (2000) *Oxidation of ubiquinol by peroxynitrite: implications for protection of mitochondria against nitrosative damage*. Biochem J. 349(Pt 1): p. 35-42.
112. Jung, J.E., G.S. Kim, H. Chen, C.M. Maier, P. Narasimhan, Y.S. Song, K. Niizuma, M. Katsu, N. Okami, H. Yoshioka, H. Sakata, C.E. Goeders, and P.H. Chan. (2010) *Reperfusion and Neurovascular Dysfunction in Stroke: from Basic Mechanisms to Potential Strategies for Neuroprotection*. Mol Neurobiol.
113. Murphy, M.P. (1997) *Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria*. Trends Biotechnol. 15(8): p. 326-30.
114. Gane, E.J., F. Weilert, D.W. Orr, G.F. Keogh, M. Gibson, M.M. Lockhart, C.M. Frampton, K.M. Taylor, R.A. Smith, and M.P. Murphy. (2010) *The mitochondria-targeted anti-oxidant mitoquinone decreases liver damage in a phase II study of hepatitis C patients*. Liver Int.
115. Snow, B.J., F.L. Rolfe, M.M. Lockhart, C.M. Frampton, J.D. O'Sullivan, V. Fung, R.A. Smith, M.P. Murphy, and K.M. Taylor. (2010) *A double-blind,*

- placebo-controlled study to assess the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ as a disease-modifying therapy in Parkinson's disease. Mov Disord.*
116. Murphy, M.P. (2008) *Targeting lipophilic cations to mitochondria*. *Biochim Biophys Acta.* 1777(7-8): p. 1028-31.
  117. James, A.M., H.M. Cocheme, R.A. Smith, and M.P. Murphy. (2005) *Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species. Implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools*. *J Biol Chem.* 280(22): p. 21295-312.
  118. Adlam, V.J., J.C. Harrison, C.M. Porteous, A.M. James, R.A. Smith, M.P. Murphy, and I.A. Sammut. (2005) *Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury*. *FASEB J.* 19(9): p. 1088-95.
  119. Supinski, G.S., M.P. Murphy, and L.A. Callahan. (2009) *MitoQ administration prevents endotoxin-induced cardiac dysfunction*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 297(4): p. R1095-102.
  120. Cassina, P., A. Cassina, M. Pehar, R. Castellanos, M. Gandelman, A. de Leon, K.M. Robinson, R.P. Mason, J.S. Beckman, L. Barbeito, and R. Radi. (2008) *Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants*. *J Neurosci.* 28(16): p. 4115-22.
  121. Trnka, J., F.H. Blaikie, A. Logan, R.A. Smith, and M.P. Murphy. (2009) *Antioxidant properties of MitoTEMPOL and its hydroxylamine*. *Free Radic Res.* 43(1): p. 4-12.
  122. Leo, S., G. Szabadkai, and R. Rizzuto. (2008) *The mitochondrial antioxidants MitoE(2) and MitoQ(10) increase mitochondrial Ca(2+) load upon cell stimulation by inhibiting Ca(2+) efflux from the organelle*. *Ann N Y Acad Sci.* 1147: p. 264-74.
  123. Antonenko, Y.N., A.V. Avetisyan, L.E. Bakeeva, B.V. Chernyak, V.A. Chertkov, L.V. Domnina, O.Y. Ivanova, D.S. Izyumov, L.S. Khailova, S.S. Klishin, G.A. Korshunova, K.G. Lyamzaev, M.S. Muntyan, O.K. Nepryakhina, A.A. Pashkovskaya, O.Y. Pletjushkina, A.V. Pustovidko, V.A. Roginsky, T.I. Rokitskaya, E.K. Ruuge, V.B. Saprunova, Severina, II, R.A. Simonyan, I.V. Skulachev, M.V. Skulachev, N.V. Sumbatyan, I.V. Sviryaeva, V.N. Tashlitsky, J.M. Vassiliev, M.Y. Vyssokikh, L.S. Yaguzhinsky, A.A. Zamyatnin, Jr., and V.P. Skulachev. (2008) *Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies*. *Biochemistry (Mosc).* 73(12): p. 1273-87.
  124. Murphy, M.P. and R.A. Smith. (2007) *Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47: p. 629-56.

125. Szeto, H.H. and P.W. Schiller. (2011) *Novel therapies targeting inner mitochondrial membrane--from discovery to clinical development*. Pharm Res. 28(11): p. 2669-79.
126. Szeto, H.H. (2008) *Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury*. Antioxid Redox Signal. 10(3): p. 601-19.
127. Zhao, K., G.M. Zhao, D. Wu, Y. Soong, A.V. Birk, P.W. Schiller, and H.H. Szeto. (2004) *Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury*. J Biol Chem. 279(33): p. 34682-90.
128. Yang, L., K. Zhao, N.Y. Calingasan, G. Luo, H.H. Szeto, and M.F. Beal. (2009) *Mitochondria targeted peptides protect against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity*. Antioxid Redox Signal. 11(9): p. 2095-104.
129. Dai, D.F., T. Chen, H. Szeto, M. Nieves-Cintron, V. Kutuyavin, L.F. Santana, and P.S. Rabinovitch. (2011) *Mitochondrial targeted antioxidant Peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol. 58(1): p. 73-82.
130. Ferrer-Sueta, G., I. Batinic-Haberle, I. Spasojevic, I. Fridovich, and R. Radi. (1999) *Catalytic scavenging of peroxynitrite by isomeric Mn(III) N-methylpyridylporphyrins in the presence of reductants*. Chem Res Toxicol. 12(5): p. 442-9.
131. Ferrer-Sueta, G., C. Quijano, B. Alvarez, and R. Radi. (2002) *Reactions of manganese porphyrins and manganese-superoxide dismutase with peroxynitrite*. Methods Enzymol. 349: p. 23-37.
132. Ferrer-Sueta, G., D. Vitturi, I. Batinic-Haberle, I. Fridovich, S. Goldstein, G. Czapski, and R. Radi. (2003) *Reactions of manganese porphyrins with peroxynitrite and carbonate radical anion*. J Biol Chem. 278(30): p. 27432-8.
133. Batinic-Haberle, I. (2002) *Manganese porphyrins and related compounds as mimics of superoxide dismutase*. Methods Enzymol. 349: p. 223-33.
134. Szabo, C., H. Ischiropoulos, and R. Radi. (2007) *Peroxyntirite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. Nat Rev Drug Discov. 6(8): p. 662-80.
135. Ferrer-Sueta, G., L. Hannibal, I. Batinic-Haberle, and R. Radi. (2006) *Reduction of manganese porphyrins by flavoenzymes and submitochondrial particles: a catalytic cycle for the reduction of peroxynitrite*. Free Radic Biol Med. 41(3): p. 503-12.
136. Spasojevic, I., Y. Chen, T.J. Noel, P. Fan, L. Zhang, J.S. Reboucas, D.K. St Clair, and I. Batinic-Haberle. (2008) *Pharmacokinetics of the potent redox-modulating manganese porphyrin, MnTE-2-PyP(5+), in plasma and major organs of B6C3F1 mice*. Free Radic Biol Med. 45(7): p. 943-9.
137. Spasojevic, I., Y. Chen, T.J. Noel, Y. Yu, M.P. Cole, L. Zhang, Y. Zhao, D.K. St Clair, and I. Batinic-Haberle. (2007) *Mn porphyrin-based*



- superoxide dismutase (SOD) mimic, MnIIITE-2-PyP5+, targets mouse heart mitochondria.* Free Radic Biol Med. 42(8): p. 1193-200.
138. Asayama, S., E. Kawamura, S. Nagaoka, and H. Kawakami. (2006) *Design of manganese porphyrin modified with mitochondrial signal peptide for a new antioxidant.* Mol Pharm. 3(4): p. 468-70.
  139. Detweiler, C.D., L.J. Deterding, K.B. Tomer, C.F. Chignell, D. Germolec, and R.P. Mason. (2002) *Immunological identification of the heart myoglobin radical formed by hydrogen peroxide.* Free Radic Biol Med. 33(3): p. 364-9.
  140. Zielonka, J., A. Sikora, J. Joseph, and B. Kalyanaraman. (2010) *Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe.* J Biol Chem. 285(19): p. 14210-6.
  141. Boveris, A., S. Alvarez, J. Bustamante, and L. Valdez. (2002) *Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles.* Methods Enzymol. 349: p. 280-7.
  142. Lahaye, D., K. Muthukumaran, C.H. Hung, D. Gryko, J.S. Reboucas, I. Spasojevic, I. Batinic-Haberle, and J.S. Lindsey. (2007) *Design and synthesis of manganese porphyrins with tailored lipophilicity: investigation of redox properties and superoxide dismutase activity.* Bioorg Med Chem. 15(22): p. 7066-86.
  143. V. Darley-Usmar, D.R.a.M.W., *Mitochondria a practical approach.* Practical Approach Series, ed. D.R.a.B.D. James 1987: URL Press.
  144. Koppenol, W.H., J.J. Moreno, W.A. Pryor, H. Ischiropoulos, and J.S. Beckman. (1992) *Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide.* Chem Res Toxicol. 5(6): p. 834-42.
  145. Winterbourn, C.C. (1990) *Oxidative reactions of hemoglobin.* Methods Enzymol. 186: p. 265-72.
  146. Castro, L., M.N. Alvarez, and R. Radi. (1996) *Modulatory role of nitric oxide on superoxide-dependent luminol chemiluminescence.* Arch Biochem Biophys. 333(1): p. 179-88.
  147. Radi, R., T.P. Cosgrove, J.S. Beckman, and B.A. Freeman. (1993) *Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence.* Biochem J. 290 ( Pt 1): p. 51-7.
  148. Shimomura, O. and K. Teranishi. (2000) *Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine.* Luminescence. 15(1): p. 51-8.
  149. Tarpey, M.M., C.R. White, E. Suarez, G. Richardson, R. Radi, and B.A. Freeman. (1999) *Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation.* Circ Res. 84(10): p. 1203-11.
  150. Teranishi, K. and O. Shimomura. (1997) *Coelenterazine analogs as chemiluminescent probe for superoxide anion.* Anal Biochem. 249(1): p. 37-43.

151. Zhou, M., Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, and R.P. Haugland. (1997) *A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases*. *Anal Biochem*. 253(2): p. 162-8.
152. Radi, R., H. Rubbo, L. Thomson, and E. Prodanov. (1990) *Luminol chemiluminescence using xanthine and hypoxanthine as xanthine oxidase substrates*. *Free Radic Biol Med*. 8(2): p. 121-6.
153. Folkes, L.K., K.B. Patel, P. Wardman, and M. Wrona. (2009) *Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with oxygen: implications for quantifying peroxynitrite formation in cells*. *Arch Biochem Biophys*. 484(2): p. 122-6.
154. Brito, C., M. Naviliat, A.C. Tiscornia, F. Vuillier, G. Gualco, G. Dighiero, R. Radi, and A.M. Cayota. (1999) *Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death*. *J Immunol*. 162(6): p. 3356-66.
155. Bartesaghi, S., V. Valez, M. Trujillo, G. Peluffo, N. Romero, H. Zhang, B. Kalyanaraman, and R. Radi. (2006) *Mechanistic studies of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration in membranes using the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester*. *Biochemistry*. 45(22): p. 6813-25.
156. Radi, R., J.S. Beckman, K.M. Bush, and B.A. Freeman. (1991) *Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. *Arch Biochem Biophys*. 288(2): p. 481-7.
157. Peluffo, G., P. Calcerrada, L. Piacenza, N. Pizzano, and R. Radi. (2009) *Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 296(6): p. H1781-92.
158. Miles, A.M., D.S. Bohle, P.A. Glassbrenner, B. Hansert, D.A. Wink, and M.B. Grisham. (1996) *Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide*. *J Biol Chem*. 271(1): p. 40-7.
159. Wrona, M., K. Patel, and P. Wardman. (2005) *Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals*. *Free Radic Biol Med*. 38(2): p. 262-70.
160. Radi, R., J.S. Beckman, K.M. Bush, and B.A. Freeman. (1991) *Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. *J Biol Chem*. 266(7): p. 4244-50.
161. Nakai, K. and R.P. Mason. (2005) *Immunochemical detection of nitric oxide and nitrogen dioxide trapping of the tyrosyl radical and the resulting nitrotyrosine in sperm whale myoglobin*. *Free Radic Biol Med*. 39(8): p. 1050-8.
162. Bartesaghi, S., J. Wenzel, M. Trujillo, M. Lopez, J. Joseph, B. Kalyanaraman, and R. Radi. (2010) *Lipid peroxyl radicals mediate*

- tyrosine dimerization and nitration in membranes*. Chem Res Toxicol. 23(4): p. 821-35.
163. Batinic-Haberle, I., Z. Rajic, A. Tovmasyan, J.S. Reboucas, X. Ye, K.W. Leong, M.W. Dewhirst, Z. Vujaskovic, L. Benov, and I. Spasojevic. (2011) *Diverse functions of cationic Mn(III) N-substituted pyridylporphyrins, recognized as SOD mimics*. Free Radic Biol Med. 51(5): p. 1035-53.
164. Singh, R.J., N. Hogg, J. Joseph, E. Konorev, and B. Kalyanaraman. (1999) *The peroxy nitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors*. Arch Biochem Biophys. 361(2): p. 331-9.
165. Spasojevic, I., I. Kos, L.T. Benov, Z. Rajic, D. Fels, C. Dedeugd, X. Ye, Z. Vujaskovic, J.S. Reboucas, K.W. Leong, M.W. Dewhirst, and I. Batinic-Haberle. (2011) *Bioavailability of metalloporphyrin-based SOD mimics is greatly influenced by a single charge residing on a Mn site*. Free Radic Res. 45(2): p. 188-200.
166. Sikora, A., J. Zielonka, M. Lopez, J. Joseph, and B. Kalyanaraman. (2009) *Direct oxidation of boronates by peroxy nitrite: mechanism and implications in fluorescence imaging of peroxy nitrite*. Free Radic Biol Med. 47(10): p. 1401-7.
167. Murray, J., S.W. Taylor, B. Zhang, S.S. Ghosh, and R.A. Capaldi. (2003) *Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxy nitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry*. J Biol Chem. 278(39): p. 37223-30.
168. Sacksteder, C.A., W.J. Qian, T.V. Knyushko, H. Wang, M.H. Chin, G. Lacan, W.P. Melega, D.G. Camp, 2nd, R.D. Smith, D.J. Smith, T.C. Squier, and D.J. Bigelow. (2006) *Endogenously nitrated proteins in mouse brain: links to neurodegenerative disease*. Biochemistry. 45(26): p. 8009-22.
169. Radi, R., S. Sims, A. Cassina, and J.F. Turrens. (1993) *Roles of catalase and cytochrome c in hydroperoxide-dependent lipid peroxidation and chemiluminescence in rat heart and kidney mitochondria*. Free Radic Biol Med. 15(6): p. 653-9.
170. Reboucas, J.S., I. Spasojevic, and I. Batinic-Haberle. (2008) *Quality of potent Mn porphyrin-based SOD mimics and peroxy nitrite scavengers for pre-clinical mechanistic/therapeutic purposes*. J Pharm Biomed Anal. 48(3): p. 1046-9.