



UNIVERSIDAD DE JAÉN

*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

**La Espectrometría de masas  
como  
herramienta para el análisis de  
modificaciones  
postraduccionales de proteínas  
por ácidos  
grasos nitrados.**

**Alumno: Melisa López García**

**Julio, 2018**



UNIVERSIDAD DE JAÉN

*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

**La Espectrometría de masas  
como  
herramienta para el análisis de  
modificaciones  
postraduccionales de proteínas  
por ácidos  
grasos nitrados.**

**Alumno: Melisa López García**

**Julio, 2018**

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	1
1. RESUMEN/SUMMARY.....	3
2. ÓXIDO NITRICO.....	4
2.1 Capacidad señalizadora.....	5
3. ACIDOS GRASOS NITRADOS.....	7
3.1 Condiciones que promueven la formación de ácidos grasos nitrados..	8
3.2 Mecanismos de formación de ácidos grasos nitrados .....	8
3.2.1 Nitración de ácidos grasos.....	9
3.2.2 Otros mecanismos de formación .....	10
3.3 Propiedades biológicas de los ácidos grasos nitrados.....	10
4. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES. NITROALQUILACION .....	13
5. ESPECTROMETRIA DE MASAS.....	15
6. INSTRUMENTACION .....	15
6.1 Sistema para introducción de la muestra .....	16
6.2 Fuente de iones o ionizador .....	17
6.3 Analizador de masas.....	17
6.4 Detector.....	20
7. PROTEÓMICA.....	20
7.1 Limitaciones de la proteómica .....	20
7.2 Mapeo peptídico o huellas de masas peptídica.....	21

<b>8. ESPECTROSCOPIA DE MASAS EN TANDEM .....</b>	<b>22</b>
<b>9. USO DE ESPECTROMETRÍA PARA LA DETECCIÓN DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN PROTEÍNAS. NITROALQUILACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>10. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>42</b>
<b>11. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>12. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>44</b>

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
BH4	Tetrahidrobiopterina
Cys	Cisteína
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DTT	Ditiotreitol
ECD	Disociación con electrones libres o radicales químicos
ETD	Disociación por transferencia electrónica
EVOO	Aceite de oliva virgen extra
EPI	Iones producto
ESI	Ionización por electrospray
FAD	Flavin adenina dinucleótido
FD	Desorción por campo eléctrico
FMN	Flavin mononucleótido
FRET	Energía de resonancia Förster
FP	Proteínas fluorescentes
FT-ICR	Espectrómetro de resonancia ciclónica de Iones
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GSH	Tripéptido glutatión
GTP	Guanosín trifosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
His	Histidina
HPLC-ESI	Ionización por electrospray acoplada a cromatografía líquida
IAM	Yodoacetamida
IRMPD	Haces de fotones infrarrojos
IRS	Sustrato del receptor de insulina
Lna-NO <sub>2</sub>	Ácido nitrolinolénico
LNO <sub>2</sub>	Ácido nitrolinolato
MALDi	Desorción/Ionización por Láser Asistida en Matriz
MS, MS/MS, MS <sup>2</sup>	Espectroscopia de masas en tándem
NADPH	Adenina dinucleótido fosfato

NEM	N-etilmaleimida
NO	Oxido nitrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión nitrito
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Anión nitrato
NO <sub>2</sub> -FA	Ácidos grasos nitrados
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NOX2	Óxidasa 2 fagocítica
OA-NO <sub>2</sub>	Ácido nitroleico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
ONOO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinitroso
PD	Desorción por plasma
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PSC	Post Source Decay
PMF	Mapeo por huella peptídica
PTMs	Modificaciones postraduccionales
RBC	Glóbulos rojos humanos
Rbx	Rubredoxina
Ser	Serina
Thr	Treonina
TOF	Tiempo de vuelo
TPR	Tetratricopeptido

## **1. RESUMEN/SUMMARY**

Las proteínas son susceptibles de sufrir modificaciones postraduccionales reversibles en su interacción con los ácidos grasos nitrados a través de residuos aminoacídicos que actúan como diana. Estas modificaciones inducen una gran variedad de cambios en su estructura y función. Además, constituyen un mecanismo esencial de regulación de su actividad biológica

El presente trabajo trata de una revisión bibliográfica, sobre la capacidad de los ácidos grasos nitrados para llevar a cabo dichas modificaciones postraduccionales, así como la manera de detectar las mismas mediante espectrometría de masas.

Para ello se ha llevado a cabo una exhaustiva búsqueda de información en bases de datos para conocer los mecanismos que rigen estas modificaciones.

En primer lugar, se trata los mecanismos de formación de ácidos grasos nitrados a través de la reacción con óxido nítrico y otros derivados, así como sus propiedades biológicas. Posteriormente se estudia su interacción con proteínas modificándolas y haciéndolas perder total o parcialmente su actividad biológica.

Finalmente se habla sobre los métodos espectrométricos empleados para detectar dichas modificaciones, así como cuales son las posibles dianas capaces de ser modificadas por dichos ácidos grasos nitrados.

### **SUMMARY**

Proteins are susceptible to reversible post-translational modifications in their interaction with nitrated fatty acids through amino acid residues that act as targets. These modifications induce a great variety of changes in their structure and function and constitute an essential mechanism of regulation of their biological activity

This work deals with a bibliographic review, about the capacity of nitrated fatty acids to carry out these post-translational modifications, as well as how to identify them by mass spectrometry.

To this end, an exhaustive search of information has been carried out in databases to discover the mechanisms that govern these modifications.

First, the mechanisms of formation of nitrated fatty acids through the reaction with nitric oxide and other derivatives are discussed, as well as their

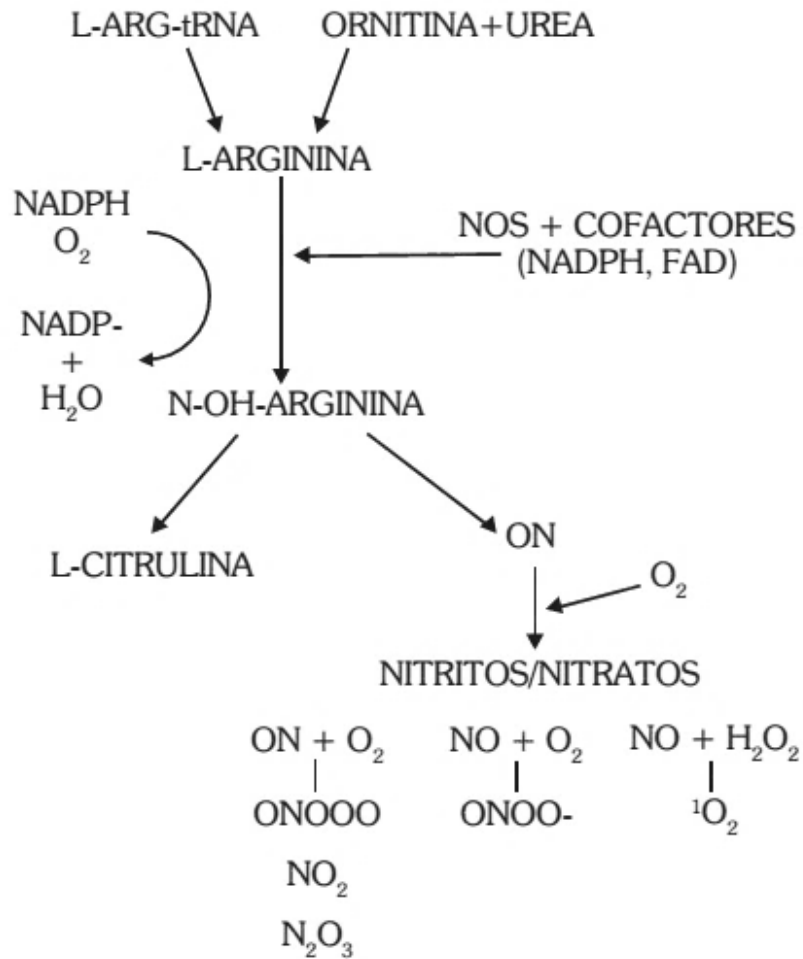
biological features, after that we study their interaction with the proteins modifying them and making them lose totally or partially their biological activity.

Finally, we talk about the spectrometric methods used to detect such modifications, and which are the possible targets capable of being modified by such nitrated fatty acids.

## 2. ÓXIDO NITRICO

El óxido nítrico (NO), también llamado monóxido de nitrógeno, es un radical muy reactivo ya que presenta un electrón desapareado en su orbital, por lo tanto es muy inestable en condiciones aerobias y rápidamente es oxidado a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), su radio de acción es limitado ya que tiene un tiempo de vida media de sólo unos pocos segundos (Geisler & Rudolph, 2012). Inicialmente fue considerado un contaminante atmosférico, aunque posteriormente se descubrió que era producido por numerosas células en los mamíferos y tenía diversas funciones biológicas (Rosete *et al.*, 1999). El NO se encuentra en un gran número de especies, tales como esponjas, insectos, ranas e incluso plantas. En el caso de los mamíferos las células sintetizan óxido nítrico a partir de la L-arginina por la acción del óxido nítrico sintetasa (NOS), algunos cofactores como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), flavin adenina dinucleótido (FAD), flavin mononucleótido (FMN) y tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) (Figura 1). En el caso de la NOS se requiere, además, la participación de la calmodulina y calcio para activarse (Patricia Gorocica *et al.*, 1999) Se han descrito tres isoformas de NOS, es decir, tres enzimas (iNOS, eNOS y nNos) que sintetizan el mismo producto, pero en diferentes tejidos (Cuéllar Mata *et al.*, 2010).





**Figura 1.-** Proceso de formación del óxido nítrico, proceso catalizado por la enzima óxido nítrico sintetasa, a partir de L-Arginina. Figura extraída del artículo (Rosete *et al.*, 1999).

### 2.1 Capacidad señalizadora

El óxido nítrico actúa como molécula señalizadora. El NO producido por los vasos sanguíneos activan la guanilato ciclasa, responsable de la síntesis del guanosín monofosfato cíclico (GMPc), esta enzima contiene un sitio específico destinado a el reconocimiento específico del NO pasando del estado activo a inactivo según las condiciones que haya en la célula, por lo tanto esta interacción tiene como resultado la relajación del músculo liso y la dilatación del vaso sanguíneo aumentando su flujo y disminuyendo la tensión sanguínea (Cuéllar Mata *et al.*, 2010).

También actúa sobre las plaquetas, inhibiendo su anexión, sobre los leucocitos impidiendo su adhesión a la pared de los vasos sanguíneos, incluso evita la aterosclerosis (también llamada arteriosclerosis, depósito de sustancias grasas en las paredes interiores de las arterias). Además, el NO es un inhibidor, impidiendo la síntesis de ADN de la mitosis y la proliferación de células del músculo liso de los vasos sanguíneos (Cuéllar Mata *et al.*, 2010).

Ejemplos de estas y otras acciones del óxido nítrico son las que exponen a continuación en la tabla 1.

Por otro lado, entre las biomoléculas que son objetivos de la nitración se encuentran residuos de tirosina, ácidos nucleicos tales como, guanina, GMPc, guanosín trifosfato (GTP), y ácidos grasos insaturados (Cuéllar Mata *et al.*, 2010).

<b>Célula/ tejido/ órgano</b>	<b>Efecto</b>
<b>Músculo liso</b>	Relajación-vasodilatación
<b>Plaquetas</b>	Inhibe su agregación
<b>Células inflamatorias</b>	Acciones antiinflamatorias
<b>Especies reactivas de oxígeno</b>	Efectos antioxidantes
<b>Células endoteliales</b>	Angiogénesis
<b>Miocardio</b>	Crecimiento y desarrollo fetal y posnatal, aumenta o disminuye la función contráctil. Antihipertrofia, cardioprotector contra daño isquémico generación y proliferación celular, anti apoptico, promueve la supervivencia, aumenta y disminuye la contracción.
<b>Cardiomiocitos</b>	Dañino en cantidades excesivas; pro apoptico, pro necrótico

**Tabla 1.-** Efectos biológicos del NO. Tabla extraída y modificada del artículo (Rosete *et al.*, 1999).

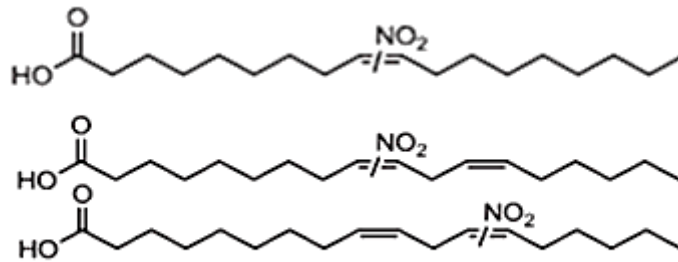
Con respecto a las plantas, numerosos estudios también han demostrado el papel esencial de NO en el crecimiento y el desarrollo, incluyendo la germinación de semillas, el crecimiento primario y lateral de la raíz, el cierre de las estomas, la florecencia, la regulación del crecimiento del tubo polínico, la maduración de la fruta y la senescencia. Por otra parte, el NO es un componente crucial de la respuesta inmune de las plantas y diversos tipos de estrés abiótico (Kovacs & Lindermayr, 2013).

### **3. ACIDOS GRASOS NITRADOS**

Los ácidos grasos nitrados (NO<sub>2</sub>-FA) son mediadores electrofílicos de señalización, se trata del producto de la reacción del óxido de nitrógeno y sus derivados como el dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), peroxinitrito (ONOO<sub>2</sub><sup>-</sup>), (Woodcock, Bonacci, Gelhaus, & Schopfer, 2013) y así como con mediadores inflamatorios derivados del oxígeno como el superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y radicales peroxílicos lipídicos con los ácidos grasos insaturados (Freeman *et al.*, 2008).

El peroxinitrito, proviene de la reacción de NO con el superóxido, a su vez el peroxinitrito experimenta fácilmente la protonación dando lugar al ácido peroxinitroso (ONOOH) o reacciona con el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para formar nitrosperoxicarbonato (ONOOCO) los cuales pueden sufrir una escisión homolítica para formar NO<sub>2</sub>. Además, tanto la protonación y la oxidación de nitrito puede producir dióxido de nitrógeno (Freeman *et al.*, 2008).

La nitración de un ácido graso se produce a través del doble enlace de este (Figura 2) (Freeman *et al.*, 2008) y presentan acción de señalización antiinflamatorio a través de modificaciones postraduccionales (PTMs) de proteínas (Woodcock *et al.*, 2013).



**Figura 2.-** Estructura química de los ácidos grasos; oleico (arriba) y linoleico (abajo) nitrados. Imagen obtenida del artículo (Geisler & Rudolph, 2012)

### 3.1 Condiciones que promueven la formación de ácidos grasos nitrados

Las condiciones inflamatorias favorecen un ambiente que facilita la oxidación enzimática y no enzimática de los ácidos grasos insaturados, este ambiente se caracteriza por un aumento de la producción de especies nitrogenadas tales como; NO, ONOO<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub>, y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Schopfer, Cipollina, & Freeman, 2011).

Cuando se produce la isquemia miocárdica y la lesión por reperfusión se promueve la formación del ambiente anteriormente descrito. Estas enfermedades coronarias se caracterizan por elevadas concentraciones de especies reactivas tales como O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HClO, NO y especies de nitrosación y nitraciones secundarias. El porcentaje de producción de estas especies reactivas es elevado en ambos casos (Schopfer *et al.*, 2011).

En este ambiente se promueve la generación de especies nitrantes y la formación de derivados de ácidos grasos nitrados electrófilos que son generados por nitración mediada por radicales libres de ácidos grasos a través de mecanismos que son incluso más efectivos a pH ácido (Woodcock *et al.*, 2013)

### 3.2 Mecanismos de formación de ácidos grasos nitrados

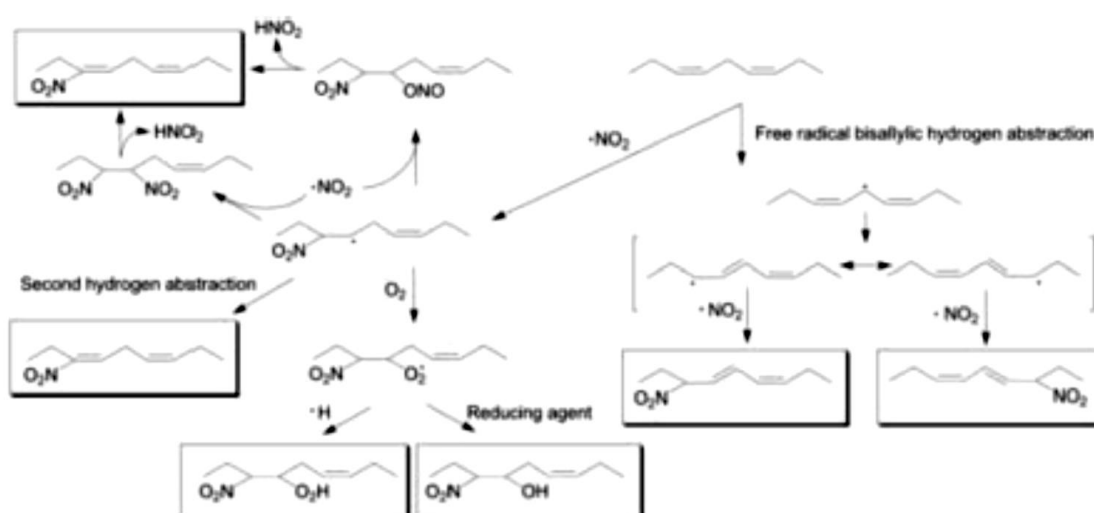
La formación de ácidos grasos nitrados se debe a la reacción de ácidos grasos que se encuentran almacenados en las células, con óxido nítrico y sus derivados.

Las reacciones de nitración de biomoléculas vienen dadas por una serie de factores tales como la concentración de NO, tensión de oxígeno, sitio de generación y catalizadores entre otros (Woodcock *et al.*, 2013)

### 3.2.1 Nitración de ácidos grasos

En el primer paso de la adición para la nitración de ácidos grasos, el átomo de nitrógeno del grupo NO<sub>2</sub> o de alguno de sus derivados se agrega al alqueno a través de los dobles enlaces, produciendo un radical nitroalquilo deslocalizado, se trata de un proceso rápido y reversible. En ambientes hidrofóbicos, donde solubilidad del NO y los óxidos de nitrógeno es relativamente alta estos radicales pueden evolucionar para dar derivados nitrados. Sin embargo, en un medio acuoso, donde la solubilidad del NO y especies derivadas es mucho menor, el radical nitroalquilo es menos eficiente. (Freeman *et al.*, 2008).

Posteriormente se produce la abstracción del átomo de hidrógeno alílico por NO<sub>2</sub>, se trata de un proceso lento pero irreversible y finalmente se inician las reacciones de peroxidación de cadena (Figura 3) (Woodcock *et al.*, 2013).



**Figura 3.-** Nitración de un ácido graso poliinsaturado mediante abstracción radical que reacciona con el oxígeno o el dióxido de nitrógeno. También puede producirse la adición directa de dióxido de nitrógeno a un doble enlace produciendo un radical intermedio. Imagen extraída de (Woodcock *et al.*, 2013).

### 3.2.2 Otros mecanismos de formación

Existe un segundo mecanismo mucho menos estudiado que el anterior, este mecanismo implica inicialmente la adición directa de NO<sub>2</sub> al ácido graso para formar un radical nitroalquenilo, este radical puede reaccionar con oxígeno para formar un ácido graso de nitroperoxilo, reaccionar con otro NO<sub>2</sub> para formar nitro-nitrito inestable o compuestos dinitro o perder un átomo de hidrógeno por abstracción por otro radical para reformar el doble enlace. (Woodcock *et al.*, 2013).

Las reacciones de nitración también pueden ocurrir mediante la peroxidación lipídica, modificando productos intermedios de dieno conjugado que se generan por peroxidación enzimática y no enzimática. Se produce el desglose de cadena carbonatada y un reordenamiento inducido por HNO<sub>2</sub> y ONOO, respectivamente. También son posibles reacciones que conducen a productos secundarios de nitración de ácidos grasos. La peroxidación de lípidos se produce tanto con ácidos grasos libres y esterificados, que conduce a la formación de productos electrofílicos hidrófobos e hidrófilos. (Freeman *et al.*, 2008).

### 3.3 Propiedades biológicas de los ácidos grasos nitrados

Acción de señalización celular y capacidad antiinflamatoria: La oxidación inducida por radicales libres de ácidos grasos insaturados genera moléculas bioactivas que participan en la señalización celular. Estas acciones de señalización incluyen la activación de receptores de proteínas (Woodcock *et al.*, 2013) el NO<sub>2</sub>-FA activa la expresión del gen antioxidante dependiente de Nrf2 mediante la aducción de tioles críticos en la proteína reguladora Nrf2 Keap1 (Fazzari *et al.*, 2014). Esta propiedad de los ácidos grasos nitrados se atribuye predominantemente a la adición de Michael que da lugar a modificaciones postraduccionales de las proteínas, los aductos se forman con aminoácidos nucleófilos funcionales de proteínas y factores de transcripción, estas modificaciones han sido vistas como patógenas. En el contexto de la inflamación las reacciones de electrofílicos derivados de los ácidos grasos nitrados dan lugar a eventos adaptativos que finalizan con la resolución de la inflamación. (Schopfer *et al.*, 2009).

El ácido nitrolinolato ( $\text{LNO}_2$ ) y ácido nitroleico ( $\text{OA-NO}_2$ ) inhiben la secreción inducida por lipopolisacárido de citocinas proinflamatorias en los macrófagos independientes de la formación de óxido nítrico (Cui *et al.*, 2006).

Resistencia a la insulina: la resistencia a la insulina es el principal factor causante de la diabetes tipo 2. Akt / PKB es una treonina proteína quinasa de serina, que desempeña un papel central en el metabolismo, así como acciones de la insulina, incluyendo el transporte de glucosa y la síntesis de proteínas y glucógeno; que está deteriorada en modelos de roedores de pacientes con diabetes tipo 2, se corroboró que la interrupción genética de Akt / PKB conduce a resistencia a la insulina en ratones (Yasukawa *et al.*, 2005). La inactivación directa de Akt / PKB es dependiente de la S-nitrosilación y nitración siendo por tanto responsables de la alteración de la transducción de señales de insulina en modelos dietéticos y genéticos de resistencia a la insulina. Los intermediarios reactivos derivados de ácidos grasos nitrados promueven la nitración de tirosina del receptor de insulina, el sustrato del receptor de insulina (IRS), y Akt. Cada uno de estos cationes modificadores se cree que dificultan la transducción de señal de la insulina, que conduce a resistencia a la insulina (White, Charbonneau, Cooney, & Marette, 2010).

Capacidad donadora de NO: los ácidos grasos nitrados presenta capacidad dadora de NO, pero más concretamente el nitrolinolato es un producto endógeno de la nitración de ácido linoleico, y estudios previos demostraron que  $\text{LNO}_2$  juega un papel importante en la relajación vascular y que este efecto se relaciona con su propiedad como dador de NO (Faine *et al.*, 2010). Esta capacidad también ha quedado demostrada en sistemas vegetales demostrándose la capacidad del ácido nitrolinolénico ( $\text{Lna-NO}_2$ ) para liberar NO tanto en las raíces y las hojas de 30 días de edad. (Mata-Perez *et al.*, 2018).

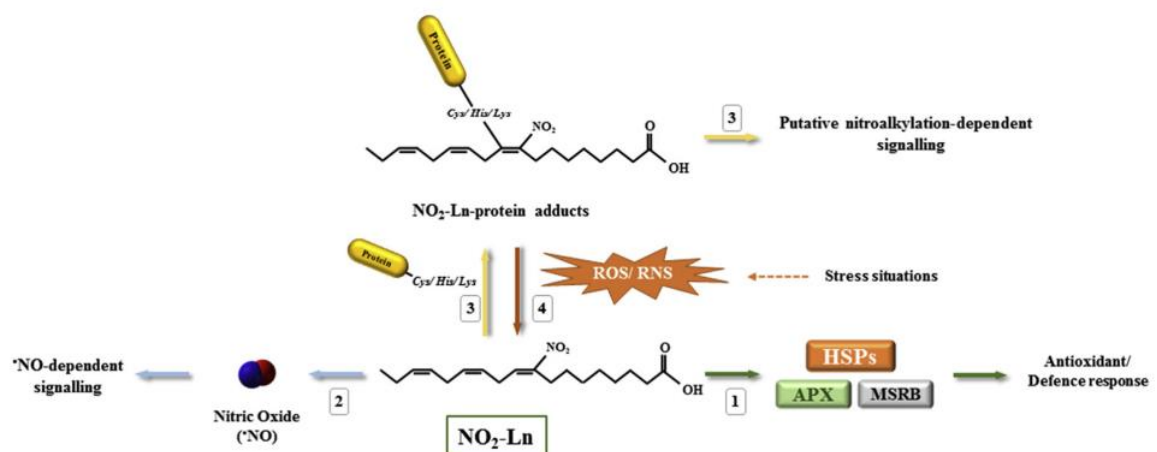
Inhibición de PknG: PknG de Tuberculosis micobacteriana es una proteína quinasa Ser / Thr que regula los procesos metabólicos clave dentro de la célula bacteriana, así como las vías de señalización de la célula huésped infectada. Esta proteína multidominio tiene un dominio quinasa con N- y C-terminal, el N-terminal alberga un dominio rubredoxina (Rbx), caracterizado por un ion de hierro coordinado por cuatro residuos de cisteína. La alteración del sitio de unión Rbx de metal por mutaciones simultáneas de todos los residuos de cisteína claves deteriora significativamente la actividad PknG. Para evaluar si los ácidos grasos

nitrados tienen un efecto sobre la actividad de quinasa PknG, la enzima fue tratado con diferentes concentraciones de OA-NO<sub>2</sub> la evidencia demostró que la actividad de la PknG se inhibió de manera significativa (Gil *et al.*, 2013).

Electrófilos derivados de ácidos grasos nitrados también modulan las actividades de los objetivos del sistema nervioso tales como proteínas sinápticas y el canal iónico excitatorio, TRPA1 por alquilación de tioles críticos (Baker *et al.*, 2007).

Recientemente, se ha demostrado que el ácido nitro linolénico está presente en varias especies de plantas, tales como *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* o *Oryza* y el ácido nitro linoleico conjugado se encuentra presente en el aceite de oliva virgen extra (EVOO), determinándose que el LNO<sub>2</sub> incita a un mecanismo de defensa que se caracteriza por la inducción de un gran conjunto de proteínas de choque térmico (HSP) y diversos sistemas antioxidantes (Figura 4) (Mata-Perez *et al.*, 2018). Por lo tanto, esta capacidad de LNO<sub>2</sub> en la creación de un mecanismo de defensa relevante en sistemas vegetales destaca la importancia de estos derivados nitrados de los ácidos grasos en la fisiología vegetal (Mata-Perez *et al.*, 2018).

Se sugiere también que el LNO<sub>2</sub> en las plantas también constituye una importante reserva de NO. (Mata-Perez *et al.*, 2018).



**Figura 4.-** Esquema sobre las acciones de señalización mediadas por NO<sub>2</sub>-Ln en las plantas, capaz de provocar la expresión de la red chaperona y varios sistemas antioxidantes como APX o MSRb y promover la defensa y respuestas antioxidantes. Imagen extraída de (Mata-Perez *et al.*, 2018).



Formación de aductos de Michael y modificaciones postraduccionales de proteínas: se trata de un mecanismo de la señalización celular que modula la estructura y función de proteínas. En él las proteínas actúan como una especie nucleófila mientras que los ácidos grasos nitrados actúan como electrófilos formando un enlace covalente a través de adición de Michael (Schopfer *et al.*, 2011). Esta propiedad se expondrá de manera más ampliada en el siguiente punto del documento.

#### **4. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES. NITROALQUILACION**

Se ha demostrado recientemente que los ácidos grasos nitrados actúan a través de modificaciones postraduccionales como un potente electrófilo con una alta constante de reacción con el glutatión, modificando covalentemente proteínas, aminoácidos e influyendo en su estructura y por lo tanto en su función, esta reacción se denomina reacción de Michael, en el caso de los ácidos grasos nitrados en los que un grupo nitro está implicado como electrófilo, esta reacción se denomina nitroalquilación (Geisler & Rudolph, 2012).

La reacción de Michael es un tipo común de reacción de nucleófilos y electrófilos suaves; reacciones suave-suave, ya que los tioles de cisteína, el tripéptido glutatión (GSH), seguido de las aminas primarias y secundarias de lisina e histidina, son los nucleófilos biológicos más suaves (Schopfer *et al.*, 2011).

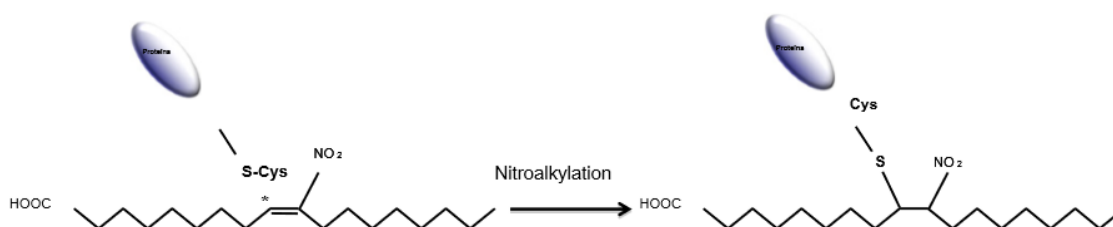
Los términos duros y blandos fueron definidos por primera vez por Pearson, clasificando a las especies como bases (nucleófilos) duras, bases blandas, ácidos (electrófilos) duros y ácidos blandos, las diferencias entre los términos duros y blandos hacen referencia a la facilidad de ionización y de polarización de la capa exterior de electrones. Generalmente los electrófilos blandos son fácilmente polarizables, tienden a estar formados por aceptores de electrones como el grupo nitro además presentan una densidad de carga más difusa, los nucleófilos blandos están más fácilmente polarizados y se oxidan, esto está asociado a la presencia de orbitales vacíos (Freeman *et al.*, 2008).

Los nitroalquenos de ácidos grasos son especies electrofílicas producidas durante la inflamación y el metabolismo, estas especies electrofílicas contienen un resto de su molécula pobre en electrones, que confiere la capacidad para la atracción de nucleófilos, ricos en electrones que donan electrones a especies

electrófilas para formar aductos covalentes (Schopfer *et al.*, 2011). De acuerdo con el conocimiento actual los residuos de tiol son los principales nucleófilos de los ácidos grasos nitrados, debido a su estructura química, el imidazol de la histidina y la amina en la lisina son capaces también de reaccionar como nucleófilos, pero en menor grado que los anteriores (Geisler & Rudolph, 2012).

Sin embargo, no todos los tioles de cisteína son capaces de reaccionar con electrófilos, si no que en primer lugar han de ser desprotonados por oxidación, siendo solo el 10% de los tioles de cisteína desprotonados mediante pH, al disminuir el pKa (Geisler & Rudolph, 2012).

La reactividad de estas moléculas es dirigida por el carbono  $\beta$ -proximal electrófilo al aceptor de electrones, generalmente el grupo  $\text{NO}_2$  (Figura 5) (Gil *et al.*, 2013).



**Figura 5.-** Reacción entre tiol de un aminoácido cisteína y el ácido oleico nitrado. El tiol nucleofílico ataca a los ácidos grasos nitrados electrofílicos, dando como resultado una unión covalente (nitroalquilación a través de adición de Michael) modificando postraduccionalmente la proteína (Geisler & Rudolph, 2012).

Los ácidos  $\text{OA-NO}_2$  y  $\text{LNO}_2$  reaccionan con GSH, las constantes de velocidad de segundo orden determinadas mediante espectrofotometría de flujo son significativamente mayores que las de la reacción GSH con peróxido de hidrógeno y ácidos grasos electrofílicos no nitrados. El aumento de pH de la reacción de 7.4 a 8.9 mejora las constantes de velocidad de segundo orden aparente para la reacción de tiol con  $\text{OA-NO}_2$  y  $\text{LNO}_2$  lo que muestra la dependencia del anión tiolato de GSH para la reactividad. Las velocidades de reacción nitroalqueno con tioles disminuyeron a medida que la  $\text{pK}$  de los tioles aumentaron, lo que indica que la organización de los ácidos grasos nitrados en estructuras micelares o de membrana puede limitar la reactividad de la reacción

de Michael reactividad, estos resultados revelan que la aducción de tioles por los ácidos grasos nitrados provoca una modificación postraduccional de proteínas lo cual es un mecanismo reversible. (Baker *et al.*, 2007).

Por lo tanto, las modificaciones postraduccionales inducidas por electrófilos conducen a cambios en las estructuras terciarias y cuaternarias modulando por lo tanto la función de la proteína y la distribución subcelular de una manera reversible, esta reacción puede ser revertida, lo que normalmente restaura la función de la proteína nativa (Baker *et al.*, 2007).

## **5. ESPECTROMETRIA DE MASAS**

La espectrometría de masas es una técnica que se basa en la separación de especies moleculares y atómicas en función a su relación masa/carga ( $m/z$ ). Su principal ventaja es sus bajos límites de detección, aunque también presenta otras características como amplio intervalo de aplicabilidad, elevada sensibilidad y alta especificidad entre otras (Gómez & González, 2010).

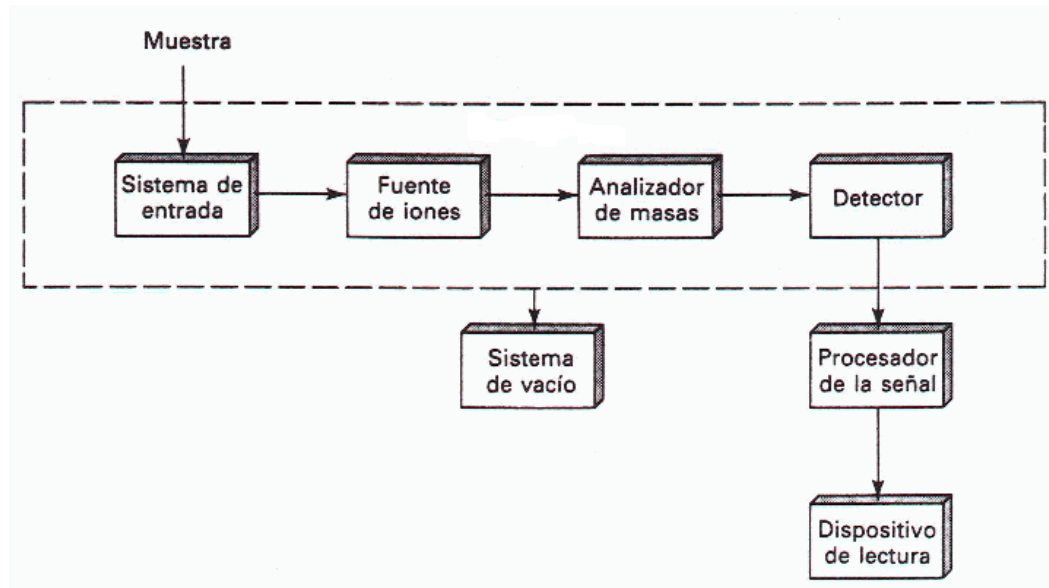
La espectrometría de masas es una herramienta analítica que tiene aplicación en numerosas áreas como: biología, física, geoquímica etc., concretamente en el ámbito de la biología y el análisis de las biomoléculas la espectrometría de masas apareció en la pasada década, a finales de los años 70 gracias a los avances en la precisión de la medición de masas que se incrementaron, el rango de masa que se podía analizar y la capacidad de acoplar equipos, pero sobre todo debido a la aparición de técnicas de “ionización suave” que permitían la ionización de moléculas de gran tamaño sin producir degradación como pasaba con las técnicas denominadas de “ionización dura”. Dichas técnicas son la ionización por electrospray (ESI), Desorción/Ionización por Láser Asistida en Matriz (MALDI), desorción por plasma (PD), o la desorción por campo eléctrico (FD) entre otras (Abián, Carrascal, & Gay, 2008a).

## **6. INSTRUMENTACION**

El espectrómetro de masas consta de cuatro partes, independientes unas de otras (Figura 6), estas partes son:

- Sistema para introducción de la muestra
- Fuente de iones o ionizador
- Analizador de masas, para la separación de los iones

- Detector y registrador



**Figura 6.-** Esquema de un espectrómetro de masas. Figura extraída de Fundamentos de la espectrometría de masas. Universidad de Murcia, Spain. Recuperado en: <http://www.um.es/LEQ/Atmosferas/Ch-VI-1/C61s4p1.htm> [Consultado: 04-04-2018].

### 6.1 Sistema para introducción de la muestra

A través del cual se pretende introducir una pequeña cantidad de muestra del orden de micro mol en el espectrómetro.

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, existen tres métodos para la introducción de la muestra.

Introducción indirecta: en este tipo de análisis la muestra se vaporiza en un recipiente externo al espectrómetro, como un balón de vidrio o de metal el cual alcanza elevadas temperaturas. Este método de introducción de la muestra es adecuado para gases y líquidos con punto de ebullición inferior a 200°C y para sólidos subliminales. Tras la vaporización en el balón el vapor se dirige hacia la fuente de iones.

Introducción directa: la muestra es introducida en la fuente de iones de manera directa a través de una varilla metálica la cual lleva incorporada en la punta un capilar que contiene la muestra, dicha varilla se introduce en el ionizador mediante un sistema de válvulas.

Sistemas especiales para la introducción de la muestra: se trata de aquellos casos en los que el espectrómetro de masas está acoplado con otras

técnicas de separación como cromatografía de líquidos o electroforesis capilar entre otros. El acoplamiento de un espectrómetro de masas y un cromatógrafo ha adquirido un gran auge ya que permite identificar una mezcla que contenga diversos componentes, identificando los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica (Gómez & González, 2010).

## **6.2 Fuente de iones o ionizador**

Su principal objetivo es convertir la muestra en iones, esto se puede conseguir de dos maneras, bien mediante bombardeo con electrones, moléculas o fotones o también se puede lograr la ionización mediante la energía térmica o eléctrica (Gómez & González, 2010).

El desarrollo de técnicas de ionización llamadas “ionización suave” fue el factor decisivo que permitió el análisis de biomoléculas mediante espectrometría de masas. La “ionización suave” permitía fraccionar en iones moléculas y compuestos de elevada masa sin sufrir degradaciones como ocurría con las técnicas de “ionización duras” utilizadas anteriormente las cuales empleaban gran energía produciendo una degradación excesiva de las moléculas.

En la actualidad ESI y MALDI son las dos técnicas empleadas en el análisis proteómico.

Por un lado, el ESI produce la ionización a presión atmosférica y mediante la aplicación de un campo eléctrico fuerte se nebuliza la disolución que contiene la muestra. De esta manera los iones presentes en la fase líquida se transforman en fase gaseosa de manera muy suave, conservándose en algunos casos complejos moleculares existentes en la solución, mientras que la ionización de péptidos y proteínas mediante este proceso genera iones multicargados.

El MALDI por su lado emplea una matriz química para la deposición de la muestra que absorbe radiación a la frecuencia del láser utilizado, esta radiación absorbida se emplea para producir iones de la muestra mediante reacciones fotoquímicas (Abián *et al.*, 2008).

## **6.3 Analizador de masas**

El analizador de masas presenta dos funciones principales una de ellas es separar los iones en función de su relación masa/carga, a mayor capacidad de un analizador de masas para diferenciar entre masas muy similares mayor

resolución (R) y la segunda función es enfocar los iones separados hasta un punto deseado (Gómez & González, 2010).

Los analizadores de masas más comunes son:

- Cuadrupolo
- TOF
- Trampa de iones
- Orbitrap
- FT-ICR
- Trampa de iones

Los analizadores de masas pueden clasificarse en función de su poder de resolución, la precisión en la medida y el rango de masa accesible en el análisis, aunque también hay que tener en cuenta el rango dinámico, el ciclo de trabajo y su rendimiento de transmisión de iones, estas características y otras se exponen de manera resumida para los principales analizadores en la tabla 2.

En cuanto a la resolución, la capacidad del instrumento para distinguir entre la masa de dos iones adyacentes se puede expresar atendiendo a diversos términos. La llamada resolución a 10% de valle se define como  $M/\Delta M$  para dos picos separados de forma que la altura del valle entre ellos es el 10% de la altura máxima y de igual masa.

La precisión de un analizador de masas se define como el error con el que la masa de un ion es medida, está relacionada en gran medida con la reproducibilidad (capacidad de repetición del análisis). La precisión y reproducibilidad junto con la resolución determinan la capacidad del espectrómetro de masas para realizar la medida exacta en muestras complejas, que es lo que trata el análisis proteómico.

INSTRUMENTO	Rango de Barrido	Resolución	Precisión (ppm) <sup>1</sup>	MS/MS	Ciclo de Barrido <sup>2</sup>	Límite de Detección	Rango Dinámico	Etapas MS <sup>3</sup>
<b>QIT, LIT</b>								
QIT	50 – 2200 200 - 6000	FWHM (m/z 50-2200) > 3700 a 26000 u/s > 8800 a 800 u/s	Max 100 (barrido completo)	CID, ETD	800-27,000 u/s	250 fg reserpina - en columna	>10 <sup>3</sup>	5-11
LIT	15 – 200 50 – 2000 200 – 4000	Max 40000 (ZoomScan)	NA	CID, ETD	4 sc/s	250 fg reserpina - en inyector S/N>100	NA	15
QqLIT	5 - 2800 en Q1/Q3 50 - 2800 en LIT	>3000 (m/z 609, 250 u/s)	120 Mr 16951, TurboIonSpray, Q1	CID	<4,000 u/s LIT <2,400 u/s RF/ DC	1 pmol Mioglobin Q1 barrido completo (400- 1800 amu) S/N > 6 para pico base	>10 <sup>6</sup>	NA
<b>Orbitrap</b>								
20	50-2000 200-4000	7500 - 100000 at m/z 400 (60000 a 1Hz)	< 3 EC < 2 IC	CID	0.5 sc/s a R=10 <sup>5</sup>	< fmol	> 4 x10 <sup>3</sup>	10
<b>FT</b>								
30	100 - 10000	9E5 (m/z 400, 7.0 T) 1.5E6 (m/z 400, 9.4 T) Mayor a 12-15 T.	Sub-ppm	ECD, CID, IRMPD	2 sc/s	< fmol	10 <sup>4</sup>	5
31 (7T)	50 - 4000	100,000 (m/z 400, 1 sc/s) > 750,000 m/z 400, < 1 sc/s)	< 1.2 EC < 1 IC	ECD, CID, IRMPD	1 sc/s at R=10 <sup>5</sup>	amol	> 4 x10 <sup>3</sup>	NA
40	5-40000 (TOF) 5-6000 (QMS/ MS)	<1 Da para selección de Precursor	<3	CID	< 20 sc/s	NA	10 <sup>4</sup>	2
41	25–20000 TOF	≤ 20,000	<1 MS 2 MS/MS	CID	20 sc/s (MS) 10 sc/s (MS/ MS)	fmol-amol en columna	10 <sup>5</sup>	2
42	20-1000,000 (TOF) 20-8,000 (Q)	17500 (m/z 956)	2	CID	10 sc/s	amol	10 <sup>4</sup>	2
43	50 to 20,000	17,500 FWHM a m/z 922 a max sensibilidad	< 2 IC < 5 EC	CID or ISCD	20 sc/s	amol	10 <sup>5</sup>	2
<b>TOF-TOF</b>								
50 (Lineal)	NA	≥ 1000	≤ 100					2
50 (Reflector)	0 to 500000	> 25,000 para péptidos	≤ 3	CID	200 sc/s	250 amol with S/N > 100:1	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	2
51 (Lineal)	NA	> 800 a 11674 Da > 85 a 66431 Da	500 at 11674 10000 at 66431	CID	NA	Tioredoxina 1pmol 500 disparos, S/N >200:1 BSA 1pmol 1000 disparos, S/N >80:1	NA	2
51 (Reflector)	NA	>20.000 de 1000 a 3600 Da	2.5 IC 20 EC	CID	NA	Neurotensina 250 amol 400 disparos, S/N >100:1	NA	2
51 (MS/MS)	NA	<b>Precursor:</b> 1570.6774, <b>Shots:</b> 500 <b>Fragmento Resolución</b> 175.1195 > 2000 1056.475 > 3500 1441.634 > 5000	<40 a 175-1441	CID	NA	<b>Precursor:</b> 1296.69 1.5 fmol <b>Disparos:</b> 500 <b>Fragmento, S/N Specific</b> 255.109 S/N > 65 784.411 S/N > 30 1183.601 S/N > 70	NA	2

**Tabla 2.-** Resumen de las principales características de algunos analizadores usados actualmente en proteómica. Tabla extraída de (Gómez & González, 2010).

## **6.4 Detector**

Esta parte del espectrómetro de masas transforma el flujo de iones que llega del analizador en señal eléctrica que puede ser amplificada, procesada, almacenada e interpretada, se suelen emplear detectores del tipo Copa de Faraday y fotomultiplicadores, que es el más empleado, aunque este no es el único.

Las principales características que debe presentar un detector son: sensibilidad, exactitud, resolución, tiempo de respuesta, estabilidad, amplio intervalo dinámico y un nivel de ruido bajo.

El espectro resultante es un gráfico que representa la abundancia relativa de los iones producidos en términos de porcentaje (%) respecto de su relación masa/carga ( $m/z$ ). La señal correspondiente a un ion aparece en forma de varios picos que corresponden a la distribución estadística de los distintos isótopos del ion.

Es frecuente la construcción de una biblioteca de espectros, una vez obtenido el espectro de masas se almacenan y se procesan para permitir la identificación por comparación de la muestra de manera casi inequívoca. (Gómez & González, 2010).

## **7. PROTEÓMICA**

El término proteómica se aplica para describir el estudio y caracterización de un conjunto completo de proteínas presentes en una célula, órgano, u organismo en un momento dado. Los enfoques proteómicos que más se emplean se pueden utilizar para el análisis comparativo de expresión de dos o más muestras de proteínas, para la localización y la identificación de modificaciones postraduccionales, y para el estudio de interacciones entre proteínas (Gómez & González, 2010).

### **7.1 Limitaciones de la proteómica**

El genoma humano se compone de 26000-31000 proteínas de codificación de los genes, mientras que el número total de proteínas humanas, incluyendo variantes de empalme, cationes esenciales y modificaciones postraduccionales, se ha estimado cerca de un millón, evidentemente este elevado número de proteínas totales constituye la principal limitación.



Teniendo en cuenta lo anteriormente dicho las muestras biológicas tendrán una elevada complejidad, por ejemplo, el suero que contiene una gran diversidad de proteínas, cerca de 10000 tipos diferentes de proteínas.

Por otro lado, las proteínas de membrana constituyen el 20-30% de los genes de un organismo, sin embargo, estas proteínas tienen gran tendencia a agregarse y precipitar en disolución, confundiendo en el análisis.

Otra gran limitación que encontramos a la hora de realizar un análisis proteómico reside en la instrumentación y la tecnología empleada para ello, donde se combina potentes, modernos y sofisticados equipos de espectrometría de masas para la identificación con métodos de preparación y separación previa de las proteínas que han evolucionado relativamente poco. Los procedimientos de extracción, purificación y preparación de las proteínas son determinantes e influyen de manera decisiva el resultado del método completo de identificación de proteínas, tanto es así que la sensibilidad global del procedimiento depende en mayor medida de la purificación que de la sensibilidad de los sofisticados métodos de identificación que se utilizan en pasos posteriores (Chandramouli *et al.*, 2009).

## **7.2 Mapeo peptídico o huellas de masas peptídica**

Se trata de convertir una proteína en sus péptidos a través de una enzima específica, normalmente la tripsina. El conjunto de péptidos en los que se puede fraccionar una proteína es una característica propia de esa proteína y pueden utilizarse para identificarla. Una vez obtenidos los péptidos de la proteína puede compararse con la masa teórica esperada almacenada en una base de datos y poder proponer una estructura, siendo esta la que más se ajuste a los datos experimentales obtenidos.

Por tanto, en este tipo de análisis hay que tener en cuenta numerosos factores, algunos de ellos son; el grado de purificación de la proteína, el número de péptidos obtenidos, la sensibilidad, la precisión y la base de datos.

Esta técnica se puede llevar a cabo mediante MALDI y TOF, debido a su rapidez y automatización que permiten analizar un gran volumen de muestras por hora de forma automática, además permiten la medida de masas peptídicas con errores inferiores a 20-50 ppm mientras que los más modernos y sofisticados pueden presentar un error incluso inferior a 3 ppm. Por otro lado, se ha

desarrollado una nueva técnica HPLC-ESI acoplado a orbitrap que es la empleada en la actualidad debido a su capacidad para la identificación de mezclas complejas de proteínas, complejos macromoleculares e incluso proteomas enteros de forma rápida, automática, reproducible, con una cobertura y rango dinámico superiores.

En cuanto a las bases de datos las hay libres y comerciales, las primeras se basaban en la determinación de los péptidos que se ajustaban a las masas esperadas, teniendo en cuenta un determinado error, posteriormente esta primera forma de búsqueda simple fue mejorada al tener en cuenta el número de péptidos para cada valor de peso molecular en la base de datos utilizada.

Es necesaria una calibración del eje de masas con patrones internos, en los sistemas MALDI-reTOF para conseguir la medida de masa de varias señales de una misma proteína con la mayor exactitud posible. Habitualmente se lleva a cabo una calibración externa que sitúa el error de la medida en torno 50-100 ppm seguida de una calibración interna que permite bajar el error a 10-50 ppm.

Es difícil conocer si las señales medidas corresponden a los péptidos contenidos en la proteína, es decir, si la identificación ha sido correcta mediante el análisis por huella peptídica (PMF), para ello comúnmente se lleva a cabo un análisis mediante espectroscopia de masas en tándem (Abián *et al.*, 2008).

## **8. ESPECTROSCOPIA DE MASAS EN TANDEM**

En ocasiones un único espectrómetro no es suficiente para la determinación de mezclas complejas, por lo que es normal que varios equipos estén conectados, de esta manera se puede aprovechar las características analíticas que cada uno de ellos ofrecen para analizar estructuras o mezclas complejas, por lo tanto, la espectrometría de masas en tándem se trata de dos espectrómetros de masas unidos por una cámara que fragmenta moléculas (Gómez & González, 2010).

Un equipo de MS/MS está constituido de seis componentes básicos:

- 1) sistema de introducción de muestra
- 2) fuente de ionización
- 3) primer analizador de masas (MS)
- 4) cámara o celda de colisión
- 5) segundo analizador de masas (MS)

6) detector.

La técnica usualmente se abrevia como: *tándem MS*, *MS/MS*, *MS<sup>2</sup>* (Fernández-Lainez *et al.*, 2009).

El uso de dos espectrómetros de masas en *tándem* permite el control de la formación de iones moleculares y fragmentos. El instrumento mide la masa de moléculas intactas en el primer espectrómetro de masas, los fragmentos en una cámara posterior conocida como celda de colisión y, a continuación, mide la masa de estos fragmentos en el segundo espectrómetro de masas. Los fragmentos en el segundo espectrómetro de masas pueden ser correlacionados con las moléculas intactas producidos en el primer espectrómetro de masas (Chace *et al.*, 2005).

En la actualidad existen diferentes acoplamientos entre los componentes de los equipos de *MS/MS*, que se diseñan de acuerdo con la naturaleza de las moléculas de interés. Uno de los equipos más utilizados en química es el de tipo cuadrupolo, acoplado a una fuente de ionización por “*electrospray*”, este equipo funciona de la siguiente manera: Una vez que la muestra ha sido introducida, sufre una ionización suave por ESI para adquirir carga; posteriormente pasa al primer espectrómetro de masas en donde los componentes de la muestra se separan y ordenan de acuerdo con relación su *m/z*. Los iones pasan por la celda de colisión en donde se generan fragmentos como producto de su colisión con un gas inerte, los fragmentos generados pasan por el espectrómetro, los cuales se pueden correlacionar con las moléculas intactas producidas en el primer MS. Los resultados generados se registran en forma de espectro de masas que es como la huella digital de los compuestos (Fernández-Lainez *et al.*, 2009).

Los analizadores de masas más frecuentes en este procedimiento son los sistemas híbridos Q-TOF y Q-LIT mediante los cuales se obtiene espectros con una alta resolución y también las trampas de iones que ofrecen un alto rendimiento de fragmentación, mientras que en las formas de ionización encontramos ESI y sus diferentes formas, TOF/TOF, FT-ICR, y por último la reintroducción del MALDI.

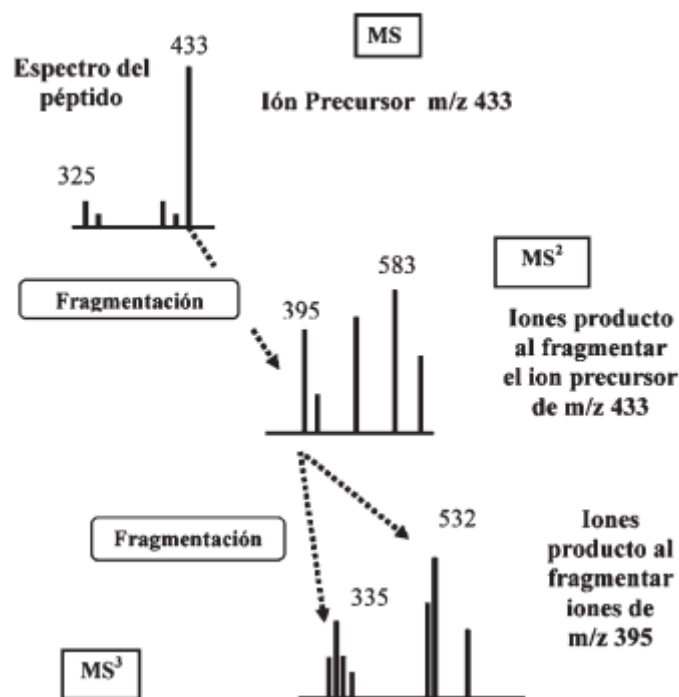
La fragmentación en espectroscopia de masas se lleva a cabo mediante la disociación inducida por colisión (CID) fragmentándose las moléculas mediante colisiones con átomos o moléculas de gases nobles como Argón, Xenón y Helio. La fragmentación llamada *Post Source Decay* (PSC) no ha tenido mucha

relevancia debido a la complejidad, donde el espectro se obtiene por combinación de varios espectros. Actualmente han aparecido nuevos métodos de fragmentación basados en la irradiación de la muestra con láser, alguna de ellas por haces de fotones infrarrojos (IRMPD), disociaciones con electrones libres o radicales químicos (ECD), disociación por transferencia electrónica (ETD) todas estas ofrecen una información distinta a la que ofrece la disociación por CID.

A partir de los espectros de masas en tándem obtenidos a partir del ion correspondiente a uno de los péptidos de digestión de la proteína (Figura 7) y su comparación con los espectros teóricos derivados de las secuencias de la base de datos se pueden identificar proteínas a gran escala

Este tipo de espectroscopia puede aplicarse tanto a proteínas aisladas, como a mezclas proteicas complejas, esta última es la base para el análisis de proteomas denominada la técnica como *Shotgun Proteomics*.

Finalmente, la búsqueda en las bases de datos se realiza de forma similar al PMF, mediante programas informáticos, la complejidad del proceso se incrementa cuando se realiza un análisis shotgun ya que se tienen grandes colecciones de péptidos, sin embargo, cuando se trata de identificar una o unas pocas proteínas, donde la cantidad de material es muy baja es posible la identificación mediante un único espectro (Abián, Carrascal, & Gay, 2008b).



**Figura 7.-** Esquema del análisis de un péptido, imagen extraída de (Gómez & González, 2010).

Las ventajas de las técnicas de MS/MS con respecto a la velocidad, la sensibilidad, y la aplicabilidad a las mezclas biológicas complejas de péptidos llevaron gradualmente a la sustitución de otras técnicas de análisis como cromatografía líquida por esta (Seidler *et al.*, 2010).

Además, con esta técnica se pueden detectar y cuantificar selectivamente múltiples analitos dentro de una familia de compuestos. También se puede obtener información estructural acerca de un compuesto a través de la formación de fragmentos específicos y es útil para descubrir compuestos en mezclas complejas de acuerdo con su patrón de fragmentación. Gracias al desarrollo de este tipo de tecnologías se necesitan cantidades mucho menores para la determinación de un solo metabolito, hacia la obtención de perfiles en los que se adquiere una gran cantidad de información en un tiempo muy corto (Fernández-Lainez *et al.*, 2009).

## **9. USO DE ESPECTROMETRÍA PARA LA DETECCIÓN DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN PROTEÍNAS. NITROALQUILACIÓN**

Los estudios en proteómica difieren en sus objetivos, unos son descriptivos como la identificación de proteínas en una muestra y la caracterización de sus modificaciones postraduccionales; en otros casos son métodos para realizar análisis cuantitativos de proteínas o para estudios de variaciones cuantitativas de proteínas en diferentes muestras (Abián *et al.*, 2008).

La medición de PTMs reversibles en sistemas biológicos complejos ha sido un reto debido a varias razones; la naturaleza lábil de estas modificaciones, la oxidación artificial, la conversión entre diferentes formas de PTM reversibles durante el procesamiento de la muestra, (Duan *et al.*, 2017), la existencia de más de 200 tipos diferentes de modificaciones postraduccionales y finalmente que la mayoría de estas modificaciones están presentes a baja estequiometría y poca abundancia, todo esto limita su detección al analizar siendo necesario por lo tanto métodos de purificación para caracterizar la presencia de modificaciones postraduccionales usando la espectrometría de masas (Swaney & Villen, 2016).

La espectrometría de masas proteómica constituye un enfoque poderoso para identificar las proteínas modificadas debido a los avances en la metodología y la tecnología en este campo durante la última década. Además, característicos cambios en los espectros de fragmentación permiten la localización exacta de la modificación en un aminoácido individual dentro de la proteína. (Swaney & Villen, 2016).

Uno de los mayores desafíos en la caracterización reversible de PTMs en residuos de cisteína (Cys) es la preservación del estado redox endógeno y minimizar la posible oxidación o reducción durante la preparación de la muestra. En las células vivas, la mayoría de las cisteínas de la proteína existe en un estado reducido (80- 90%). Sin embargo, los tioles de Cys pueden ser fácilmente oxidados sobre la lisis celular y posteriormente. Actualmente, un método común para minimizar la oxidación artificial es vía ácido de temple tricloroacético (TCA) seguido de bloqueo tioles libres con reactivos alquilantes en condiciones desnaturizantes. TCA actúa rápidamente sobre los tioles libres bajando significativamente el pH, posteriormente reactivos de alquilación, tales como N-etilmaleimida (NEM) y yodoacetamida (IAM), se incluyen a menudo en el tampón de desnaturización posterior a bloquear los tioles libres, preservando así cisteínas en su estado nativo para el procesamiento y mediciones aguas abajo. El NEM reacciona con tioles vía una adición de tipo Michael, que es más específica, más rápido, y menos dependiente del pH. El NEM puede ser menos específico para tioles en condiciones alcalinas, donde puede reaccionar con las cadenas laterales de la lisina y la histidina. Debe tenerse en cuenta que el bloqueo completo de tioles libres es un paso crítico, especialmente para las estrategias de detección indirecta (Duan, Gaffrey, & Qian, 2017).

Por otra parte, la existencia de iones metálicos, tales como  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , pueden provocar falsos positivos que surgen de bloqueo incompleto, incluso en cantidades traza, puede catalizar la oxidación de tiol o descomposición de ciertas PTM (Duan *et al.*, 2017).

La estabilidad redox en PTMs es otro factor importante que considerar, muchas formas de PTMs Cys son lábiles y se pueden convertir fácilmente en formas alternativas o se pierden completamente, ya sea enzimática o no enzimáticamente. Por ejemplo, SNOs son UV sensible y no es estable a alta temperatura. Por lo tanto, las muestras de SNOs deben ser procesados en la

oscuridad sin calentamiento significativo. Enfoques de derivación química se aplican a menudo para convertir formas inestables de PTMs de Cys en productos estables y detectables mediante el aprovechamiento de su reactividad química distinta. Marcaje químico directo es otra estrategia atractiva para la detección de modificaciones de Cys, que potencialmente proporcionan un enfoque sencillo en comparación con otros métodos. Sin embargo, la eficiencia de reacción y especificidad química serán críticos para los enfoques de etiquetado directo (Duan *et al.*, 2017).

Existen dos formas cuando se caracterizan PTMs mediante espectrometría de masas; separación en una sola proteína o enfoques proteómicos globales. Cuando se utiliza la técnica de proteínas individuales, la espectrometría de masas se realiza en los péptidos de la proteína después del aislamiento de dicha proteína de interés, este enfoque es útil para la identificación de PTMs en una sola proteína, sin embargo, el éxito de este enfoque depende de aislamiento eficaz de la proteína. Dos estrategias para el aislamiento son la inmunoprecipitación de nivel de proteína usando anticuerpos y la introducción de una etiqueta a la proteína que se puede utilizar para purificar (Swaney & Villen, 2016).

Por otra parte al usar enfoques proteómicos globales permite caracterizar un amplio rango de PTMs de miles de proteínas a la vez, los péptidos que contienen un solo tipo de PTMs que se aíslan de una mezcla compleja de miles de péptidos, los métodos para aislar modificaciones se pueden agrupar en dos categorías; en primer lugar son los métodos basados en propiedades químicas por ejemplo, carga de solución, afinidad, la otra forma de aislamiento consiste en immunoafinidad de enriquecimiento en el que los anticuerpos con especificidad hacia un PTM particular de interés se utilizan para purificar PTM péptidos que contienen anticuerpos (Swaney & Villen, 2016).

Sin embargo, existe una técnica en el campo de la proteómica, en la cual se efectúa el análisis sobre la proteína intacta, eliminando así la etapa de digestión, este método se denomina “top-down”. En este método la fragmentación se lleva a cabo dentro del espectrómetro de masas.

Para el caso de proteínas de bajo peso molecular se determina la masa de la proteína utilizando un espectrómetro de alta resolución, obteniéndose el correspondiente espectro y posteriormente se realiza una búsqueda en una base

de datos, la identidad de la proteína puede ser confirmada mediante la obtención de los iones fragmentados de una secuencia específica de la proteína por espectroscopia de masas en tándem y también proporcionar información sobre las modificaciones postraduccionales.

Para proteínas de alto peso molecular donde la espectroscopia de masas en tándem no es adecuada ya que la cámara de fragmentación CID no es lo suficiente eficiente, la mejor opción es el uso de espectrómetros FT-ICR y Orbitrap que proporcionan más exactitud en las medidas y una alta resolución además de la ionización por electrospray.

Las principales cualidades del top-down es servir de herramienta clave para el estudio de modificaciones postraduccionales y eliminar el proceso de digestión de proteínas, también presenta algunas limitaciones ya que las proteínas deben estar altamente purificadas, proteínas de no más de 50.000 Da y el elevado precio de la instrumentación necesaria.

Existen programas basados en algoritmos que fueron diseñados originalmente para obtener información de la secuencia de aminoácidos de las proteínas a partir de espectros de masas en tándem pero que finalmente se han extendido para identificar modificaciones en las proteínas. Por ejemplo, el programa de base de datos SEQUEST busca identificar modificaciones de las proteínas mediante el cálculo de la correlación entre bases de datos ampliadas que contienen todas las combinaciones posibles de modificaciones y espectros de masas tándem. El número de secuencias de péptidos que deben ser examinados está limitado por las secuencias con una masa calculada que cae dentro de una tolerancia de masas de iones padres. Esta técnica ha sido validado en numerosos estudios experimentales, pero puede ser muy costosa computacionalmente (Gómez & González, 2010).

Otro enfoque consiste en utilizar la secuenciación de novo seguido de un programa de alineación a base de masa, tales como OpenSea, donde secuencias completas o parciales se calculan mediante la identificación de series cortas de iones de fragmentos, las diferencias de masa entre los picos aparecen para que coincida con las masas de los aminoácidos y mediante algoritmos de alineación intentan que coincidan estas secuencias a de las proteínas en bases de datos. Las modificaciones y sustituciones pueden ser identificadas a partir de la diferencia de masa entre la masa ion primario medido y el péptido de masa



calculada. Otro programa, Popitam, combina la secuenciación de novo y la búsqueda de homología por la que atraviesa un gráfico del espectro con secuencias de bases de datos de proteínas en lugar de con secuencias derivadas de novo (Searle *et al.*, 2005).

Una de las modificaciones postraduccionales de proteínas que se está comenzando a caracterizar mediante espectrometría de masas es la nitroalquilación.

El primer artículo que refleja el uso de espectrometría de masas para detectar modificaciones postraduccionales de proteínas por ácidos grasos nitrados es el de Batthyany *et al.*, 2006. En este artículo se trata de caracterizar la reacción de nitroalquilación y la reactividad de ácidos grasos nitrados en su interacción con las proteínas mediante el uso de enfoques cromatográficos y de espectrometría de masas a través, del uso de sistemas de reacción *in vitro*, demostrando que los aductos de ácidos grasos nitrados y el GSH (tripéptido no proteico constituido por tres aminoácidos) están presentes *in vivo* en condiciones basales en los glóbulos rojos humanos sanos. El ácido nitro-linoleico y ácido nitro-oleico reaccionaron con GSH produciendo aductos.

En concentraciones fisiológicas, los nitroalquenos inhiben la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que contiene una Cys catalítica crítica quedando demostrado la presencia de estos en los glóbulos rojos.

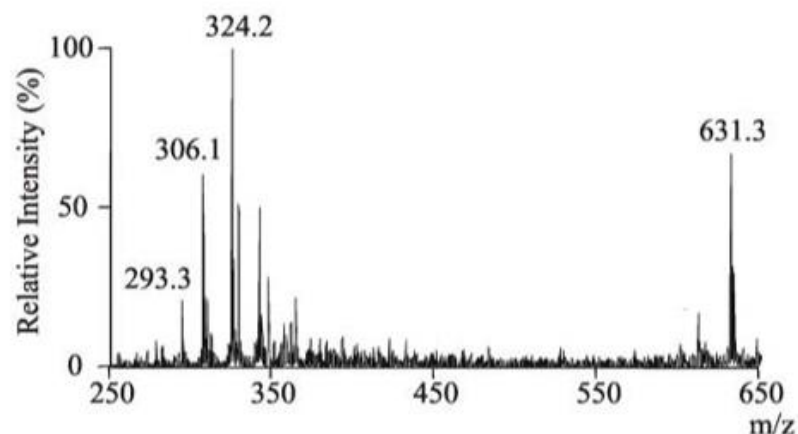
El análisis de glóbulos rojos humanos, basado en la cromatografía líquida y espectrometría de masas, confirmó que los nitroalquenos someten fácilmente a modificaciones postraduccionales covalentes reversibles mediante aminoácidos nucleofílicos a GSH y GAPDH *in vivo*. La aducción de GAPDH y GSH por nitroalquenos aumentó significativamente la hidrofobicidad de estas moléculas.

El análisis con GSH se empleó inicialmente como un sistema modelo. Para su análisis GSH fue solvatado en tampón de fosfato de sodio, pH 7,4, y tratado con nitroalquenos como LNO<sub>2</sub> y OA-NO<sub>2</sub> a 20°C durante 30 min. La mezcla de reacción se analizó mediante ESI-MS con y sin cromatografía líquida. Los aductos sintéticos de nitroalqueno de GSH se utilizaron como estándares para separaciones de cromatografía líquida (LC) y el análisis cuantitativo de MS. Los aductos de GS-nitroalqueno se purificaron a partir de GSH sin reaccionar mediante cromatografía de fase inversa. Las muestras se cargaron en columnas

PrepSep™ C18 (Fisher) equilibradas con ácido fórmico al 0,1%. Después del lavado, los aductos se eluyeron con ácido fórmico al 0,1% en metanol y las fracciones se concentraron a vacío. La concentración de patrones purificados se determinó mediante análisis de nitrógeno elemental después de pirólisis, usando un detector de nitrógeno quimioluminiscente Antek (Houston, TX).

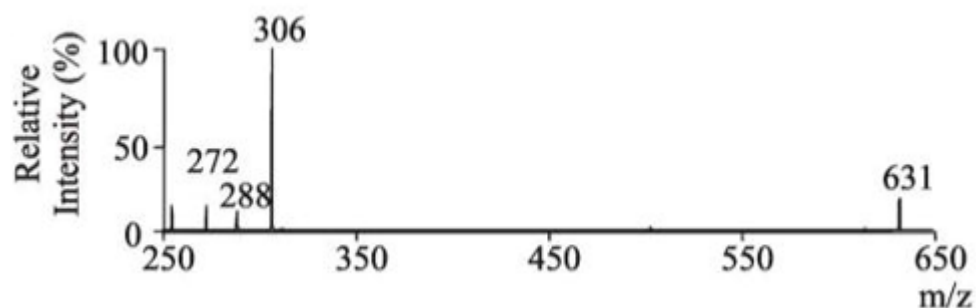
Finalmente se trató de identificar GSH-nitroalqueno en glóbulos rojos humanos. Los glóbulos rojos humanos (RBC) se obtuvieron mediante centrifugación de sangre heparinizada recién extraída de un donante sano. Los glóbulos rojos se lavaron con NaCl 0,15 M, y se lisó una alícuota de glóbulos rojos empacutados diluyendo con 5 volúmenes de ácido fórmico al 0,1% en agua, acidificándose para inhibir reacciones de nitroalquilación adicionales durante el procesamiento de la muestra. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 4°C, y los sobrenadantes se recogieron y se agregaron como estándares GS-LNO<sub>2</sub> y GS-OA-NO<sub>2</sub>. Después, las muestras se cargaron en columnas PrepSep™ C18 (Fisher) equilibradas con ácido fórmico al 0,1% y se eluyeron con ácido fórmico al 0,1% en metanol. Las fracciones eluidas se concentraron a vacío, y los aductos de GSH-nitroalqueno se midieron mediante ESI-LC-MS / MS en el modo de iones positivos usando un modo de exploración de monitorización de reacción múltiple (MRM) en un 4000 Q-Trap (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las transiciones MRM de  $m/z$  635.3/506.3 (GS-[<sup>13</sup>C<sub>18</sub>]OA-NO<sub>2</sub>), 653.3/524.3 (GS-[<sup>13</sup>C<sub>18</sub>]OA-NO<sub>2</sub>), 633.3/504.3 (GS-[<sup>13</sup>C<sub>18</sub>]LNO<sub>2</sub>) y 651.3/522.3 (GS-[<sup>13</sup>C<sub>18</sub>]LNO<sub>2</sub>), de acuerdo con la generación del ion y del glutatión en aducción. La identidad del producto de adición de GSH-nitroalqueno se confirmó adicionalmente mediante la realización de análisis mejorada de iones producto (EPI) y la comparación de patrones de fragmentación con los obtenidos.

El análisis de la reacción *in vitro* de LNO<sub>2</sub> con GSH se llevó a cabo mediante ESI-trampa de iones MS, que reveló el aducto GS-LNO<sub>2</sub> con la aparición de un pico en el espectro  $m/z$  631,3 indicativo de la nitroalquilación de GSH como se muestra en la Figura 8. Además, la fragmentación del aducto da lugar a otros picos como el que aparece con  $m/z$  324.2 correspondiente al LNO<sub>2</sub> residual y el GSH  $m/z$  306.1 que representan los otros iones presentes en el espectro.



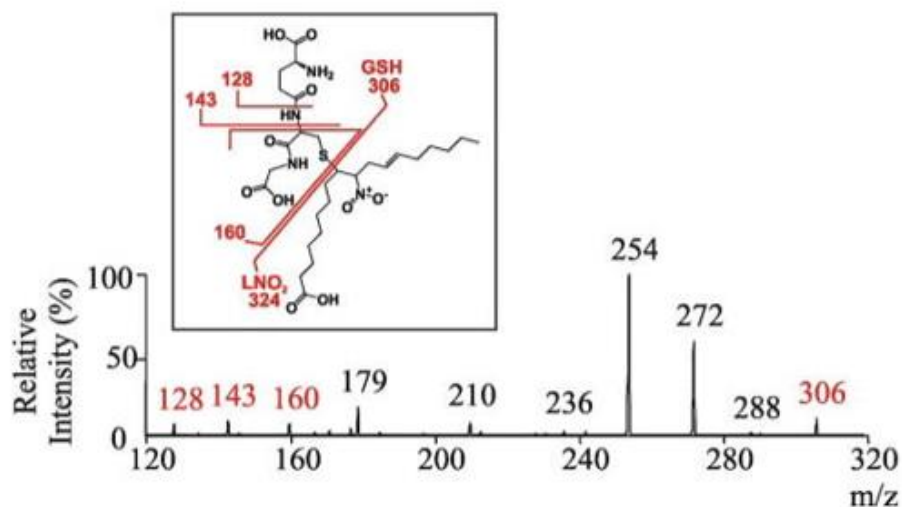
**Figura 8.-** Espectro obtenido mediante ESI-ión trampa MS en modo de ion negativo del producto generado por la reacción de LNO<sub>2</sub> con GSH. Imagen extraída de (Batthyany et al., 2006).

Esto fue comprobado mediante disociación inducida por colisión (CID) del ion del aducto GS-LNO<sub>2</sub> *m/z* 631.3 que produjo un ion del producto principal con *m/z* de 306.1, correspondiente a GSH apreciable en la Figura 9.



**Figura 9.-** Espectro MS / MS en modo de ion negativo del aducto GS-LNO<sub>2</sub>. Imagen obtenida de (Batthyany et al., 2006).

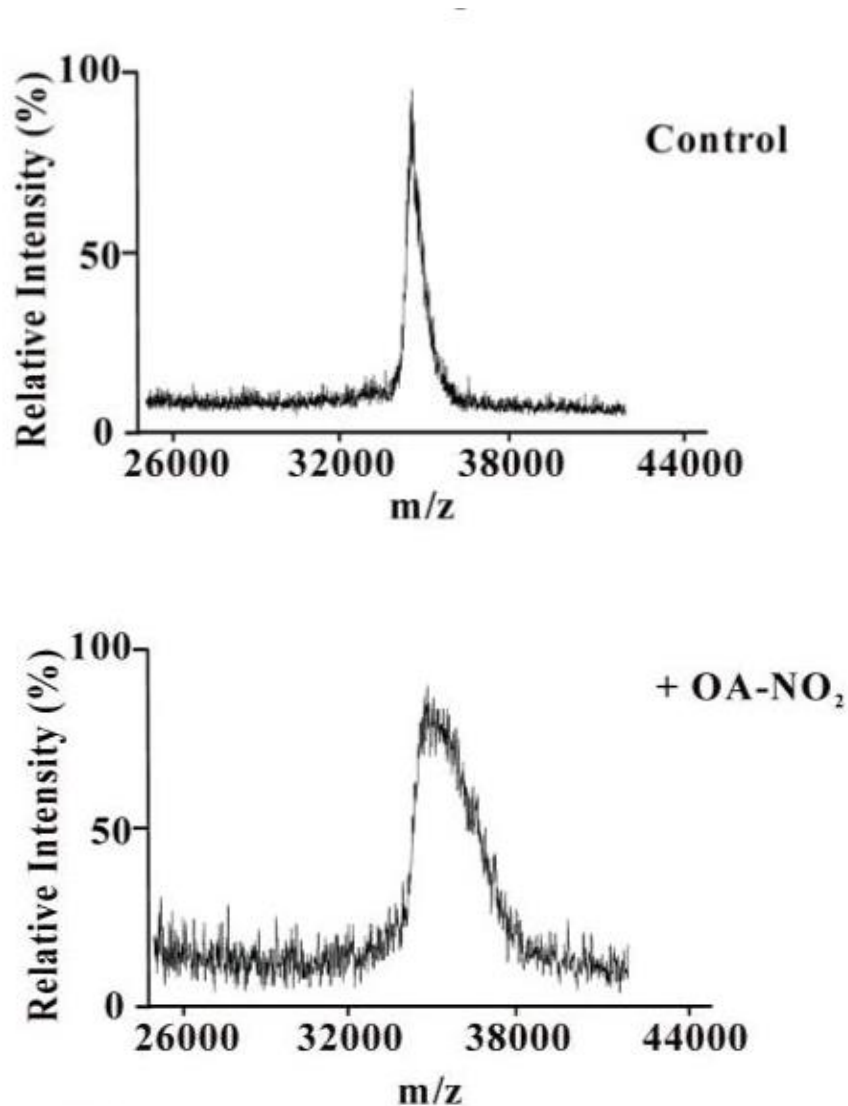
Adicionalmente esto se confirmó mediante MS / MS / MS, (Figura 10) en cuyo espectro se observan los iones de producto específicos característicos de GSH. Se obtuvieron resultados similares para la OA-NO<sub>2</sub> reacción con GSH.



**Figura 10.-** Espectro MS / MS / MS del ion fragmento 306 m/z a partir del aducto GS-LNO<sub>2</sub> (m/z = 631,3). El cuadro de arriba representa un esquema estructural del aducto que muestra los principales sitios de fragmentación. La masa de los iones de los fragmentos principales se muestra en rojo según se detecta en el modo de ionización negativa. Imagen extraída de (Batthyany *et al.*, 2006).

Por otro lado, la inhibición de GAPDH se demostró mediante un análisis de la actividad nativa de GAPDH y posteriormente se trazó el perfil de inactivación de GAPDH por nitroalquenos mediante MALDI-TOF MS usando un sistema de PRO-VOYAGER (Applied Biosystems, Foster City, CA), equipado con una fuente de láser N<sub>2</sub>. La GAPDH, que contiene una cisteína crítica sensible a electrófilos (Cys-149), se incubó con ácidos grasos nitrados, observándose una inactivación de GAPDH dependiente de la dosis tras la incubación de la enzima con LNO<sub>2</sub> u OA-NO<sub>2</sub> durante 15 min. La pérdida de la actividad de GAPDH en función de la concentración de nitroalqueno fue sigmoïdal.

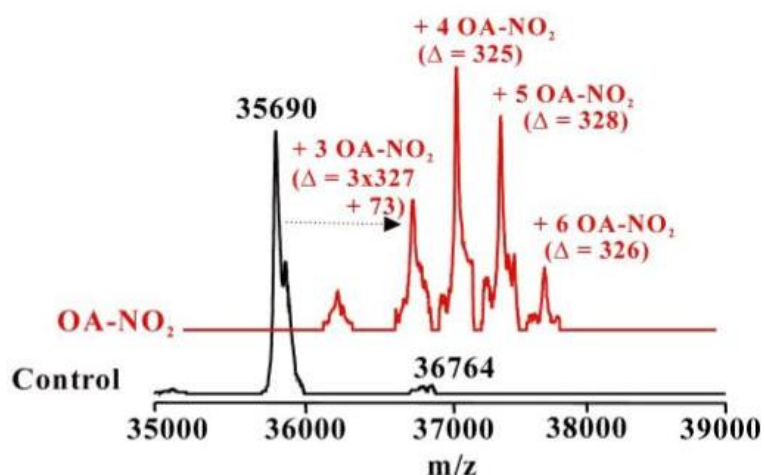
El análisis mediante MALDI-TOF MS de GAPDH tratada con nitroalqueno mostró un cambio en la masa de la enzima observable en la Figura 11 revelando la modificación covalente por nitroalquenos.



**Figura 11.-** Arriba se muestra el espectro de GAPDH nativo. Abajo el espectro de OA-NO<sub>2</sub> tratado con GAPDH. Imagen extraída de (Batthyany *et al.*, 2006).

La capacidad de OA-NO<sub>2</sub> para formar aductos covalentes con GAPDH fue confirmada por LC-MS usando una trampa de iones lineal de dos dimensiones. La mayor resolución de masa de la trampa de iones lineal de dos dimensiones resuelve la masa esperada para GAPDH nativo (Figura 12 negro) y reveló múltiples derivados de GAPDH-OA-NO<sub>2</sub> que diferían por la masa neutral de OA-NO<sub>2</sub>  $m/z$  327 Da. Estos derivados de GAPDH nitroalquilados tenían aductos 3-6 OA-NO<sub>2</sub> (Figura 12 rojo). Una diferencia de 73 Da entre la masa teórica y la masa medida de GAPDH en aducción con 3 OA-NO<sub>2</sub> lo que sugiere que se formaron otras modificaciones posiblemente oxidaciones de Cys y Met. De hecho, tanto

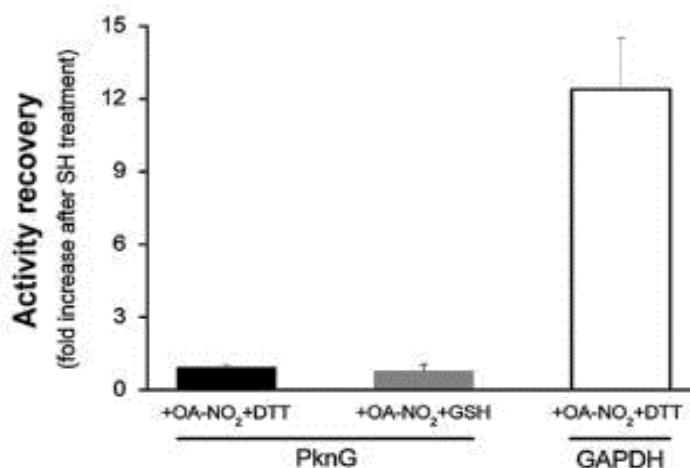
Cys como Met se detectaron en forma nativa y oxidada en el mapeo de péptidos trípticos.



**Figura 12.-** Espectro que sugiere otros tipos de modificaciones. Imagen extraída de (Batthyany *et al.*, 2006).

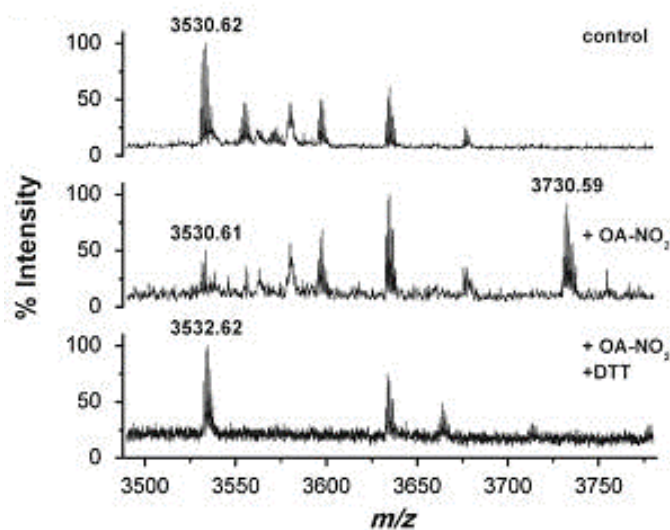
Posteriormente, en el artículo de Gil *et al.*, 2013 se estudió el efecto de los ácidos grasos nitrados sobre la proteína PknG de *Micobacterium tuberculosis*. Esta es una proteína quinasa Ser / Thr que regula los procesos metabólicos clave dentro de la célula bacteriana, así como las vías de señalización de la célula huésped infectada. Se trata de una proteína multidominio. El dominio C-terminal de PknG contiene un motivo de repetición tetratricopeptido (TPR), un dominio que participa en las interacciones proteína-proteína tanto en células eucariotas como procariontas. En este artículo se muestra que OA-NO<sub>2</sub> inhibe la actividad de la quinasa mediante la adyuvación covalente de PknG a distancia del dominio catalítico. El análisis basado en espectrometría de masas estableció que las cisteínas ubicadas en Rbx son los objetivos específicos del nitroalqueno. La nitroalquilación es una reacción de adición de Michael típicamente reversible. Sin embargo, en este caso se trata de una inhibición irreversible ya que la aducción de Cys por OA-NO<sub>2</sub> lleva asociada la liberación de hierro del dominio Rbx. Estos resultados confirman la relevancia del dominio Rbx como un objetivo para la inhibición de PknG y respaldan que las reacciones de lípidos electrofílicos de Rbx-Cys pueden representar una nueva estrategia de fármacos para la inhibición específica de PknG.

Para analizar la reversibilidad de la nitroalquilación de PknG, se trató PknG nitroalquilado con DTT o GSH lo cual no restableció la actividad. En las mismas condiciones, si se restauró la actividad GAPDH, utilizada como control (Figura 13). La actividad de control de PknG se midió en presencia de los reactivos que contienen tiol. Ni DTT ni GSH tienen un efecto *per se* sobre la actividad de la quinasa en estas condiciones experimentales.



**Figura 13.-** Inhibición irreversible de la actividad de PknG por nitroalquilación mediada por OA-NO<sub>2</sub>. Imagen extraída de (Gil *et al.*, 2013).

Para evaluar la reversibilidad de la modificación de His y Cys en residuos de PknG mediante OA-NO<sub>2</sub> las muestras fueron expuestas DTT y GSH antes de la digestión de proteínas y análisis de MS. El péptido que contiene dos residuos de Rbx-Cys (secuencia 122-154) no mostró ningún cambio en la masa después de nitroalquilación y el tratamiento con DTT, apoyando la reversibilidad de esta reacción. Además, los péptidos nativos que contienen cisteína se recuperaron completamente después del tratamiento con DTT (Figura 14). Finalmente, no hubo aductos detectables de ácido graso Cys- o His-nitrados después del tratamiento con DTT o GSH. Aunque nitroalquilación era reversible como se esperaba, el efecto de OA-NO<sub>2</sub> en la actividad PknG era irreversible. Estos resultados indican que OA-NO<sub>2</sub> inactiva PknG por un mecanismo inusual que implica un cambio irreversible en la estructura PknG o función que persiste después de que se invierte la nitroalquilación de Cys.



**Figura 14.-** Espectros de masas MALDI-TOF de péptidos generados por digestión triptica de PknG. El espectro superior muestra PknG no tratado. El espectro central PknG expuesto a OA-NO<sub>2</sub> y el espectro inferior PknG expuesto a OA-NO<sub>2</sub> más TDT. Imagen extraída de (Gil *et al.*, 2013)

Por lo tanto, la actividad de PknG no se restaura tras su exposición a OA-NO<sub>2</sub> aunque la nitroalquilación de Cys o His si se invierte. Esto es debido a que el dominio rubredoxina contiene un ion de hierro coordinado por los átomos de azufre de cuatro residuos de cisteína conservados, formando un tetraedro casi regular donde Fe<sup>3+</sup> es típicamente muy estable y la nitroalquilación de PknG conduce a la liberación de hierro del dominio Rbx.

Recientemente, en el artículo de Koenitzer *et al.*, 2016 se formuló la hipótesis de que los ácidos grasos nitrados tenían un impacto en las reacciones redox mitocondriales induciendo cambios metabólicos protectores de los tejidos en las células. Concretamente el OA-NO<sub>2</sub> inhibió reversiblemente la respiración en mitocondrias de corazón de rata. La nitroalquilación de la subunidad Fp se determinó mediante la captura de BME y el sitio de modificación por OA-NO<sub>2</sub> fue definido por análisis de espectrometría de masas. Estos efectos se tradujeron en una reducción de la respiración basal y máxima, favoreciendo el metabolismo



glucolítico en los cardiomioblastos. La perfusión de cardioprotección aguda se encuentra inducida por NO<sub>2</sub>-FA en un modelo de isquemia / reperfusión (IR). En conjunto, estos hallazgos indican que NO<sub>2</sub>-FA pueden promover la cardioprotección al inducir un cambio de la respiración a la glucólisis y suprimir la formación de especies reactivas en el intervalo posisquémico.

Se conoce sobre la formación de ácidos grasos nitrados en las mitocondrias cardíacas después de ciclos de hipoxia-reoxigenación que inducen el preconditionamiento isquémico. El complejo II se establece como un objetivo sensible, reversible y funcionalmente significativo de la reacción NO<sub>2</sub>-FA en las mitocondrias cardíacas, lo que resulta en inhibición respiratoria, aumento de la glucólisis, supresión de la producción de superóxido y la inducción de cardioprotección aguda en un aislado perfundido modelo de corazón de rata de IR global.

Las mitocondrias se obtuvieron de corazones de rata. Para verificar la reacción de adición de Michael entre OA-NO<sub>2</sub> y complejo II se llevó a cabo una reacción de trans-nitroalquilación para capturar aductos de proteína-OA-NO<sub>2</sub>. Se empleó el complejo intacto II aislado mediante electroforesis nativa azul. Para determinar si la subunidad Fp del complejo II era susceptible a OA-NO<sub>2</sub> se sometió a una reacción de trans-nitroalquilación usando BME como aceptor nucleófilo. Finalmente se concluyó que el complejo II, y particularmente la subunidad Fp, se modifica directamente por OA-NO<sub>2</sub>.

Para definir los sitios de reacción específicos de OA-NO<sub>2</sub> dentro de la subunidad Fp, la proteína recombinante purificada se trató con tripsina y los aductos de péptidos se analizaron por espectrometría de masas. El análisis abarcó 11 de los 17 Cys encontrados en la subunidad Fp de 70 kDa, lo que reveló 7 péptidos diana (Tabla 3) identificados por un aumento m / z de 327,3 y un cambio característico de la hidrofobicidad y tiempos de retención en comparación con el péptido no modificado nativo. Dos péptidos modificados correspondían a residuos de Cys y 5 a residuos de His.

En particular todos los péptidos alquilados muestran tiempos de retención entre 34 y 41 min, mientras que los péptidos nativos eluyen entre 19 y 28 min. Cinco de los 7 péptidos modificados se identificaron con la misma carga que los péptidos nativos y dos mostraron una carga 1 unidad más alta.

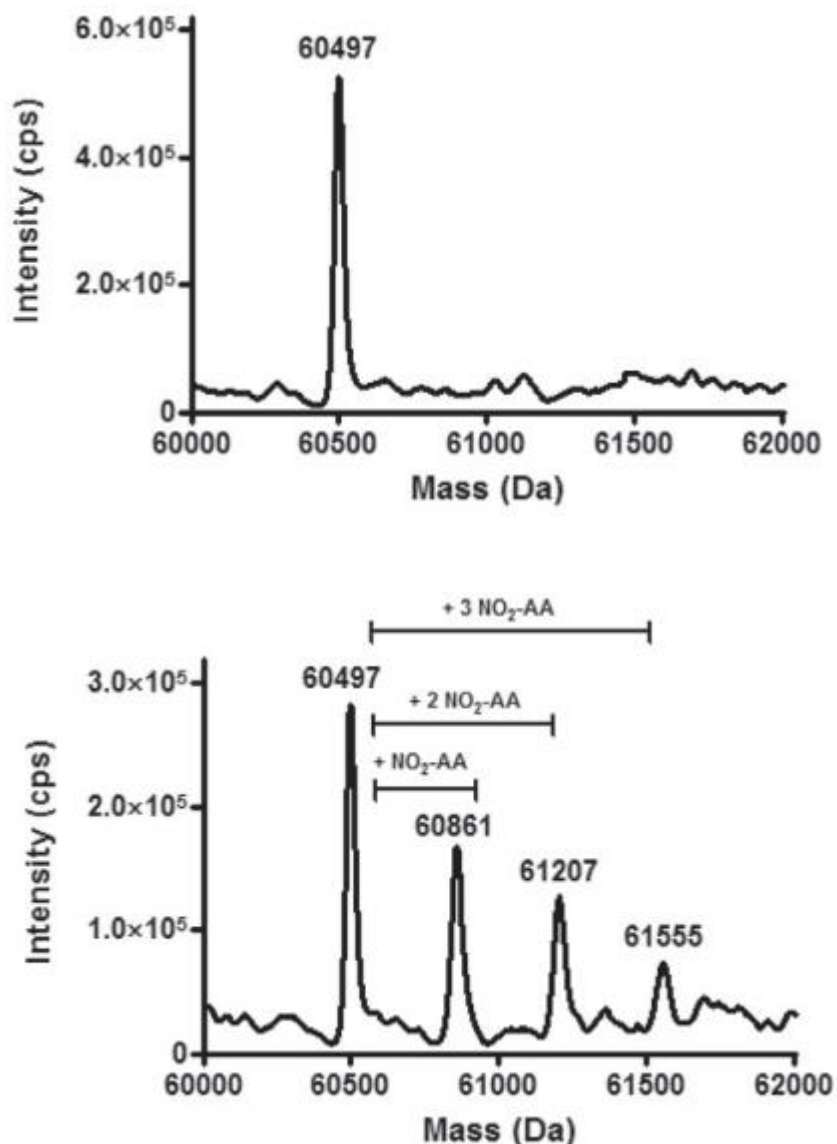
Péptidos dirigidos por OA-NO <sub>2</sub> en la subunidad Fp del complejo II				
Secuencia de péptidos	Tiempo de retención de LC (min)		Masa experimental M + H <sup>+</sup> (z detectada)	
	Nativo	OA-NO <sub>2</sub>	Nativo	OA-NO <sub>2</sub>
SMQN <u>H</u> AAVFR	19.1	35.4	1160.7 (2)	1489.6 (2)
S <u>H</u> TVAAQGGINAALGNMEEDNWR	27.1	37.0	2443.1 (2)	2770.5 (3)
AAFGLSEAGFN <u>T</u> A <u>C</u> VTK	28.1	40.5	1688.2 (2)	2016.3 (2)
K <u>H</u> TLSYVDVGTGK	20.0	34.0	1406.2 (3)	1732.4 (3)
KPFEE <u>H</u> WR	19.7	34.1	1129,1 (2)	1457.2 (3)
VGSVLQEG <u>C</u> GK	20.2	39.3	1076.8 (2)	1404.0 (2)
W <u>H</u> FYDTVK	24.3	38.5	1095.8 (2)	1424.3 (2)

**Tabla 3.-** Análisis por espectrometría de masas de la subunidad Fp del complejo II recombinante humano. Los péptidos detectados modificados por OA-NO<sub>2</sub> se muestran con sus respectivos tiempos de retención, masa M + H + y carga detectada. Imagen extraída de (Koenitzer *et al.*, 2016).

Finalmente, el artículo más reciente escrito sobre nitroalquilación y detección de modificaciones es el de González-Perilli *et al.*, 2017, en este artículo se concluye que el ácido nitroaraquidónico (NO<sub>2</sub>-AA) exhibe acciones antiinflamatorias en una gran variedad de células. El NO<sub>2</sub>-AA inhibe la NADPH oxidasa 2 fagocítica (NOX2) al evitar la formación del complejo activo. Trabajos recientes indican la participación de la actividad de proteína disulfuro isomerasa (PDI) en la activación de NOX2. Los residuos de cisteína de PDI son objetivos para la nitroalquilación de NO<sub>2</sub>-AA lo que explica la inhibición de NOX2. Por lo tanto, el objeto de este estudio es determinar la reacción covalente con PDI, así como el sitio de reacción.

Se utilizó cromatografía de líquidos junto con espectrometría de masas en tándem por ionización por electrospray para analizar la formación de aductos PDI-NO<sub>2</sub>-AA.

Estudios LC / MS mostraron la presencia de la proteína recombinante sin tratar 60.497 Da, además del aumento de otros iones correspondiente a aducción de NO<sub>2</sub>-AA (Figura 15).

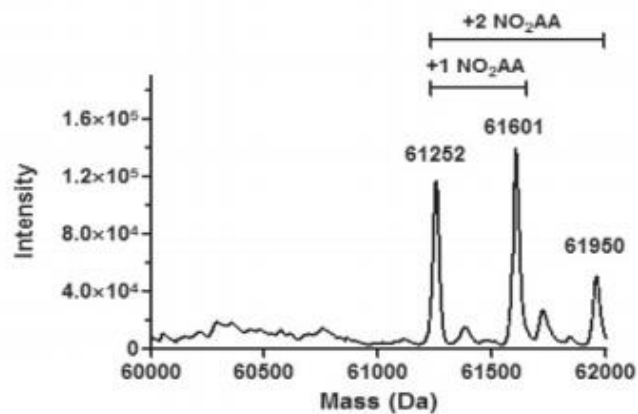
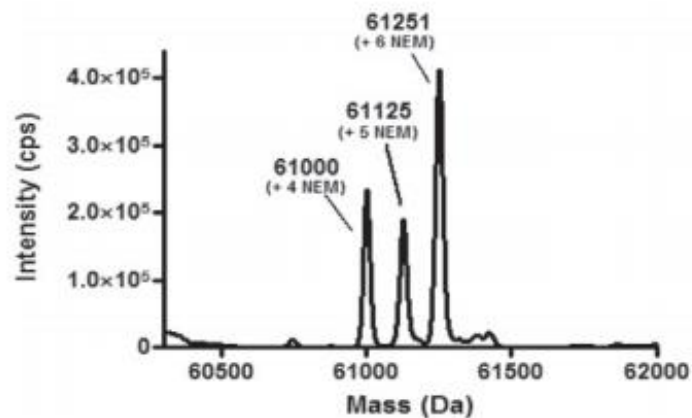


**Figura 15.-** Arriba el espectro de masas de la proteína recombinante reducida (60,497 Da). Abajo la enzima incubada con  $\text{NO}_2\text{-AA}$ . Imagen extraída de (González-Perilli et., al 2017).

La cantidad de moléculas de nitroalqueno aducidas es dependiente del estado redox de la proteína que reacciona preferentemente con tioles reducidos. Dado que los cambios redox de PDI pueden regular la actividad de NOX2, es importante evaluar como el estado redox de PDI conduce a diferentes efectos sobre la interacción de  $\text{NO}_2\text{-AA}$  con PDI. PDI reducido, tiene sus residuos de Cys

como -SH como diana para la reacción de adición de Michael de hasta tres NO<sub>2</sub>-AA, como podemos observar en el grafico inferior de la Figura 15.

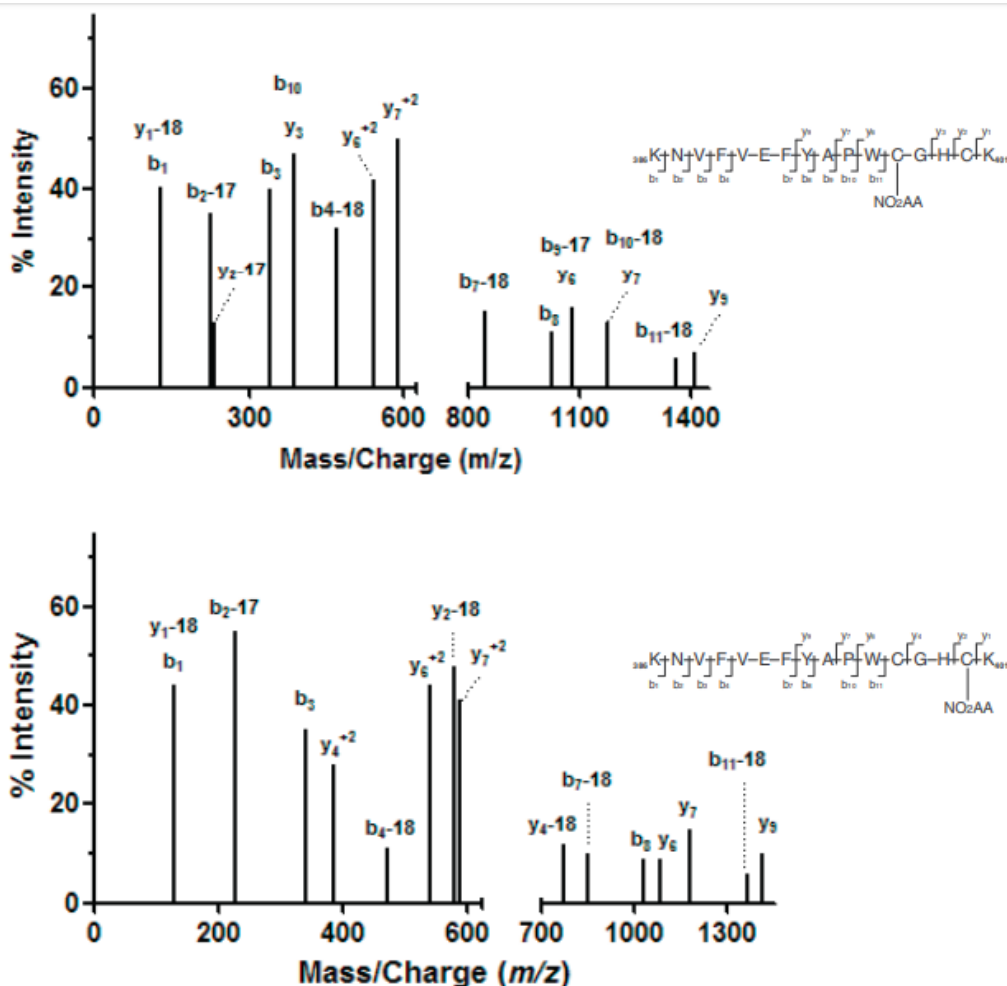
No se puede descartar que el NO<sub>2</sub>-AA puede reaccionar con los residuos de His de la proteína. Para examinar esta cuestión, se han realizado experimentos con NEM, mostrando su capacidad de interactuar con hasta 6 de 8 Cys disponible en PDI (Figura 16 arriba). Cuando PDI se trató con NO<sub>2</sub>-AA después de incubación con NEM, hasta dos moléculas de nitroalqueno hace reaccionar con la enzima (Figura 16 abajo) apoya la hipótesis de que el NO<sub>2</sub>-AA también reaccionar con cualquiera de la His en la proteína.



**Figura 16.-** incubación de NEM-PDI con NO<sub>2</sub>-AA lo que conduce a la formación de una proteína con un NO<sub>2</sub>AA dando lugar a 61,601 Da o con dos dando 61,950.

Imagen extraída de (González-Perilli *et al.*, 2017).

Por otro lado, en la Figura 17 se demuestra la modificación de la Cys397 y Cys400 presente en el sitio activo a' crítico para la actividad.



**Figura 17.-** Detección de residuos de Cys nitroalquilados mediante análisis LC-MS / MS. PDI se hizo reaccionar con  $\text{NO}_2\text{-AA}$  y los péptidos que contienen tanto Cys397 como Cys400 se analizaron mediante MS / MS para determinar la nitroalquilación. El espectro muestra las series y- y b- tratadas del péptido  ${}_{386}\text{KNVFVEFYAPWCGHC}_{401}$ . Imagen extraída de (González-Perilli *et al.*, 2017).

Adicionalmente, también se demostró la importancia del C-terminal del motivo CGHC en un dominio de PDI en la trombosis. Este carbono terminal ayuda a la activación y agregación plaquetaria. Bajo condiciones experimentales se

determinó la aducción de un NO<sub>2</sub>-AA a cada Cys, sin embargo, no se pudo encontrar la aducción de ambos Cys en un mismo péptido. Este resultado sugiere que NO<sub>2</sub>-AA puede modular la agregación plaquetaria mediante nitroalquilación de PDI en la superficie de las plaquetas.

## **10. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Debido a la importancia general de los PTM en los procesos celulares, se han realizado grandes esfuerzos para identificar los PTM e investigar su regulación de la función de las proteínas y su papel en la señalización, estas tareas han demostrado ser desafiantes, por esto los enfoques proteómicos se han desarrollado y mejorado constantemente para identificar y caracterizar proteínas modificadas, actualmente centrándose en la investigación de patrones combinatorios de PTM.

Una estrategia ampliamente utilizada es el uso de biosensores genéticamente codificables basados en proteínas fluorescentes (FP). Estos biosensores se basan en la transferencia de energía de resonancia Förster (FRET) un efecto físico que permite la transferencia no radiactiva de energía entre un donante y un cromóforo aceptor dentro de un rango nanométrico bajo ciertas condiciones. FRET se combina con un dominio de proteína o proteína, traduciendo cambios en eventos celulares.

Este enfoque ofrece muchas ventajas, ya que la maquinaria traslacional celular se utiliza para sintetizar y dirigir estas sondas *in situ de forma* continua, no se requieren factores exógenos para la formación de cromóforos y los PM como un componente principal se estudian intensamente y se refinan constantemente por los investigadores. Estos biosensores incorporan proteínas o dominios evolucionados que están involucrados en los procesos de señalización, para detectar y mediar respuestas celulares distintas, dentro del rango fisiológico. Aunque los sensores basados en proteínas empleados hasta ahora han sido diseñados para observar varios procesos e interacciones, se ha demostrado que el diseño es ampliamente aplicable, se han desarrollado muchos más sensores FRET para investigar una amplia gama de PTM, se utilizaron con éxito para adquirir nuevos conocimientos y se han mejorado continuamente para abordar nuevas preguntas más complejas y detalladas (Hertel & Zhang, 2014).

Las técnicas de enriquecimiento específicas de la modificación combinadas con métodos avanzados de MS / MS y análisis de datos computacionales han revelado una extensión sorprendentemente grande de PTM en proteínas.

Se ha desarrollado una gama de métodos químicos para etiquetar PTM, incluidas las reacciones químicas *in vitro* y el marcado metabólico *in vivo*. La azida, debido a su pequeño tamaño y naturaleza biortogonal, se ha utilizado para el etiquetado metabólico de PTM. Las proteínas PTM químicamente marcadas resultantes pueden conjugarse posteriormente con un enlazador de afinidad, como la biotina.

Los anticuerpos se usan ampliamente para la detección de PTM en una proteína mediante análisis de transferencia Western. El inmunisolación de péptidos antigénicos utilizando un anticuerpo se combinó con MS para la identificación de péptidos hace más de una década. Una extensión podría ser usar anticuerpos pan-PTM para aislar péptidos que portan el PTM de interés. Sin embargo, los anticuerpos de alta calidad no siempre están disponibles para los PTM de interés. Además, puede ser difícil generar anticuerpos contra ciertas PTM antigénicas. Sin embargo, están surgiendo nuevas tecnologías para la generación de reactivos de afinidad no anticuerpos (Zhao & Jensen, 2009).

Muchos desafíos tecnológicos son todavía necesarios en enfoques proteómicos basados en MS para la identificación y cuantificación rigurosa de un gran número de PTM. Las pantallas de PTM aún necesitan hacerse más rápidas, más sensibles y más reproducibles, y necesitan cubrir un rango dinámico aún mayor. El impacto de tal desarrollo es necesario, dada la necesidad de terapias más precisas dirigidas a la naturaleza molecular de la enfermedad individual. La proteómica de PTM se beneficiaría enormemente de un repertorio más completo de herramientas y reactivos de enriquecimiento. Sin embargo, con un mayor desarrollo de capacidades de espectrometría de masas, sería deseable detectar péptidos modificados sin un enriquecimiento específico. Esto permitiría estudiar muchas PTM simultáneamente y estimar su estequiometría directamente (Olsen & Mann, 2013).

## **11. CONCLUSIÓN**

En el presente trabajo se pretendía explicar la capacidad y potencia de la espectrometría de masas para detectar modificaciones postraduccionales en las proteínas y posibles e innovadoras técnicas de detección que en la actualidad están en auge.

Para ello debe conocerse el mecanismo de modificación de dichas proteínas a través de ácidos grasos nitrados, especies electrofílicas producidos durante la inflamación y el metabolismo celular a través de su interacción con especies reactivas de oxígeno. Estos reaccionan con residuos de aminoácidos proteicos, principalmente con tioles y cisteínas que actúan como nucleófilos, modulando la actividad de la proteína, a través de una adición de Michel.

La reactividad de los nitroalquenos de ácidos grasos se debe al carácter electrofílico del carbono  $\beta$ -proximal al grupo  $\text{NO}_2$ .

Se trata de una reacción reversible, lo que normalmente restaura la función nativa de la proteína.

A través de los ejemplos anteriormente citados obtenidos de diferentes artículos, queda demostrado que la espectrometría de masas es capaz de detectar dichas modificaciones.

Sin embargo, una de las principales limitaciones actuales del método se debe a la inexistencia de un método específico de enriquecimiento para este tipo de modificaciones, lo que hace muy difícil realizar estudios *in vivo*.

Por lo tanto, se requieren importantes mejoras para conseguir avanzar particularmente en el análisis cuantitativo de las modificaciones postraduccionales, además el elevado volumen de datos y la complejidad exige métodos estadísticos de gran índole y naturaleza efectiva con el fin de llegar a interpretaciones significativas de los resultados.

## **12. BIBLIOGRAFIA**

Abián, J., Carrascal, M., & Gay, M. (2008). Introducción a la espectrometría de masas para la caracterización de péptidos y proteínas en proteómica.

Baker, L. M., Baker, P. R., Golin-Bisello, F., Schopfer, F. J., Fink, M., Woodcock, S. R., Branchaud, B. P., Radi, R., Freeman, B. A. (2007). Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. kinetic analysis of thiol alkylation by a



michael addition reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 31085-31093.

Batthyany, C., Schopfer, F. J., Baker, P. R., Duran, R., Baker, L. M., Huang, Cerveñansky, C., Branchaud, B.P., Freeman, B. A. (2006). Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 20450-20463.

Chandramouli, K., & Qian, P. Y. (2009). Proteomics: Challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Human Genomics and Proteomics: HGP, 2009*, 10.4061/2009/239204.

Cuéllar Mata, P., Solís Martínez, M. O., Sánchez Leyva, Ma del Carmen, García Nieto, R. M., & Arias Negrete, S. (2010). El óxido nítrico: Una molécula biológica llena de contrastes. *Acta Universitaria*, 20(3)

Cui, T., Schopfer, F. J., Zhang, J., Chen, K., Ichikawa, T., Baker, P. R., Batthyany, C., Chacko, B. K., Feng, X., Patel, R. P., Agarwal, A., Chen, Y. E. (2006). Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 35686-35698.

Duan, J., Gaffrey, M. J., & Qian, W. J. (2017). Quantitative proteomic characterization of redox-dependent post-translational modifications on protein cysteines. *Molecular bioSystems*, 13(5), 816-829. doi:10.1039/c6mb00861e [doi]

Faine, L. A., Cavalcanti, D. M., Rudnicki, M., Ferderbar, S., Macedo, S. M., Souza, H. P., Farsky, S. H., Boscá, L., Abdalla, D. S. (2010). Bioactivity of nitrolinoleate: Effects on adhesion molecules and CD40-CD40L system. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(2), 125-132.

Fazzari, M., Trostchansky, A., Schopfer, F. J., Salvatore, S. R., Sanchez-Calvo, B., Vitturi, D., Valderrama, R., Barroso, J. B., Radi, R., Freeman, B. A., Rubbo, H. (2014). Olives and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes. *PloS One*, 9(1), e84884.

Freeman, B. A., Baker, P. R., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Napolitano, A., & d'Ischia, M. (2008). Nitro-fatty acid formation and signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15515-15519.

Geisler, A. C., & Rudolph, T. K. (2012). Nitroalkylation--a redox sensitive signaling pathway. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1820(6), 777-784.

Gil, M., Grana, M., Schopfer, F. J., Wagner, T., Denicola, A., Freeman, B. A., Alzari, P. M., Batthyány, C., Duran, R. (2013). Inhibition of mycobacterium

tuberculosis PknG by non-catalytic rubredoxin domain specific modification: Reaction of an electrophilic nitro-fatty acid with the Fe-S center. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 150-161.

Gonzalez-Perilli, L., Mastrogiovanni, M., de Castro Fernandes, D., Rubbo, H., Laurindo, F., & Trostchansky, A. (2017). Nitroarachidonic acid (NO<sub>2</sub>AA) inhibits protein disulfide isomerase (PDI) through reversible covalent adduct formation with critical cysteines. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1861(5 Pt A), 1131-1139.

Hertel, F., & Zhang, J. (2014). Monitoring of post-translational modification dynamics with genetically encoded fluorescent reporters. *Biopolymers*, 101(2), 180-187.

Koenitzer, J. R., Bonacci, G., Woodcock, S. R., Chen, C. S., Cantu-Medellin, N., Kelley, E. E., & Schopfer, F. J. (2016). Fatty acid nitroalkenes induce resistance to ischemic cardiac injury by modulating mitochondrial respiration at complex II. *Redox Biology*, 8, 1-10.

Kovacs, I., & Lindermayr, C. (2013). Nitric oxide-based protein modification: Formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science*, 4, 137.

Mata-Perez, C., Padilla, M. N., Sanchez-Calvo, B., Begara-Morales, J. C., Valderrama, R., Chaki, M., & Barroso, J. B. (2018). Biological properties of nitro-fatty acids in plants. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*,

Mata-Perez, C., Padilla, M. N., Sanchez-Calvo, B., Begara-Morales, J. C., Valderrama, R., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2018). Nitro-fatty acid detection in plants by high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1747, 231-239.

Mata-Perez, C., Sanchez-Calvo, B., Padilla, M. N., Begara-Morales, J. C., Luque, F., Melguizo, M., Jiménez-Ruiz, J., Fierro-Risco, J., Peñas-Sanjuán, A., Valderrama, R., Corpas, F. J., Barroso, J. B. (2016). Nitro-fatty acids in plant signaling: Nitro-linolenic acid induces the molecular chaperone network in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 170(2), 686-701.

Mata-Perez, C., Sanchez-Calvo, B., Padilla, M. N., Begara-Morales, J. C., Valderrama, R., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2017). Nitro-fatty acids in plant signaling: New key mediators of nitric oxide metabolism. *Redox Biology*, 11, 554-561.

Olsen, J. V., & Mann, M. (2013). Status of large-scale analysis of post-translational modifications by mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 12(12), 3444-3452.

Patricia Gorocica Rosete Raúl Chávez Sánchez Ricardo Lascurain Ledesma Blanca Espinosa Mancilla Edgar Zenteno Galindo. (1999). Óxido nítrico una molécula multifuncional.

Schopfer, F. J., Batthyany, C., Baker, P. R., Bonacci, G., Cole, M. P., Rudolph, V., Groeger, A., Rudolph, T. K., Nadtchiy, S., Brookes, P. S., Freeman, B. A. (2009). Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: Mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radical Biology & Medicine*, 46(9), 1250-1259.

Schopfer, F. J., Cipollina, C., & Freeman, B. A. (2011). Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chemical Reviews*, 111(10), 5997-6021.

Searle, B. C., Dasari, S., Wilmarth, P. A., Turner, M., Reddy, A. P., David, L. L., & Nagalla, S. R. (2005). Identification of protein modifications using MS/MS de novo sequencing and the OpenSea alignment algorithm. *Journal of Proteome Research*, 4(2), 546-554.

Shekariesfahlan, A., & Lindermayr, C. (2018). Identification of NO-sensitive cysteine residues using cysteine mutants of recombinant proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1747, 183-203.

Shekariesfahlan, A., & Lindermayr, C. (2018). Identification of NO-sensitive cysteine residues using cysteine mutants of recombinant proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1747, 183-203.

Sinha, V., Wijewickrama, G. T., Chandrasena, R. E., Xu, H., Edirisinghe, P. D., Schiefer, I. T., & Thatcher, G. R. (2010). Proteomic and mass spectroscopic quantitation of protein S-nitrosation differentiates NO-donors. *ACS Chemical Biology*, 5(7), 667-680.

Souza, J. M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C. S., & Ischiropoulos, H. (1999). Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 371(2), 169-178.

Swaney, D. L., & Villen, J. (2016). Proteomic analysis of protein posttranslational modifications by mass spectrometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(3), pdb. top077743.

White, P. J., Charbonneau, A., Cooney, G. J., & Marette, A. (2010). Nitrosative modifications of protein and lipid signaling molecules by reactive nitrogen species. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 299(6), E868-78.

Woodcock, S. R., Bonacci, G., Gelhaus, S. L., & Schopfer, F. J. (2013). Nitrated fatty acids: Synthesis and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 59, 14-26.

Yasukawa, T., Tokunaga, E., Ota, H., Sugita, H., Martyn, J. A., & Kaneki, M. (2005). S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7511-7518.

Yasukawa, T., Tokunaga, E., Ota, H., Sugita, H., Martyn, J. A., & Kaneki, M. (2005). S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7511-7518.

Zhao, Y., & Jensen, O. N. (2009). Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics*, 9(20), 4632-4641.