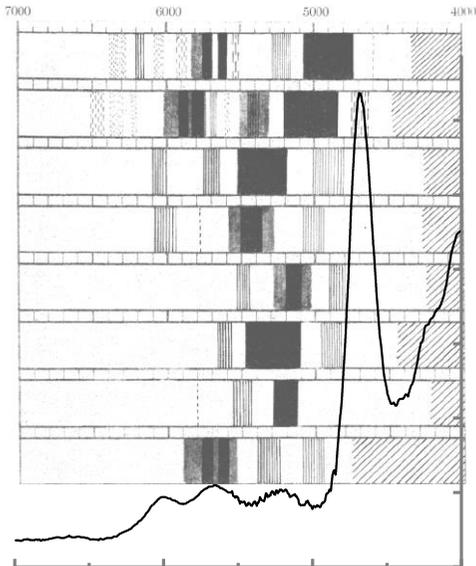


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE CIENCIAS BÁSICAS

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

PORFIRINAS DE MANGANESO COMO
INACTIVADORES DE PEROXINITRITO:
EVALUACIÓN CINÉTICA Y EFECTOS SOBRE
BLANCOS MOLECULARES



Gerardo Ferrer Sueta

Director:
Dr. Rafael Radi
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad de la República

Agradecimientos

Esta tesis se realizó gracias al apoyo económico de:

CSIC
PEDECIBA
CONICYT
SAREC
NIHs Fogarty
ICGEB
TWAS
HHMI

Las siguientes personas participaron directamente en la planificación y realización del trabajo experimental:

Rafael Radi (FM, Universidad de la República)
Ines Batinić-Haberle (Universidad Duke)
Andrés Trostchansky (FM, Universidad de la República)
Darío Vitturi (FC, Universidad de la República)
Luciana Hannibal (FC, Universidad de la República)
Ivan Spasojević (Universidad Duke)
Roberto Hodara (FM, Universidad de la República)
Adriana Cassina (FM, Universidad de la República)
Magdalena Gil (FC, Universidad de la República)
María Victoria Tourn (FC, Universidad de la República)
Celia Quijano (FM, Universidad de la República)
Irwin Fridovich (Universidad Duke)
Gidon Czapski (Universidad Hebrea de Jerusalén)
Sara Goldstein (Universidad Hebrea de Jerusalén)

Esta tesis está dedicada a:

Mi familia

Mis amigos

...

y

...

los estudiantes, algunos de los cuales tuvieron incluso la paciencia de prestar atención en mis clases a lo largo de todos estos años.

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE CIENCIAS BÁSICAS

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

PORFIRINAS DE MANGANESO COMO
INACTIVADORES DE PEROXINITRITO:
EVALUACIÓN CINÉTICA Y EFECTOS SOBRE
BLANCOS MOLECULARES

Gerardo Ferrer Sueta

Director:
Dr. Rafael Radi
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad de la República

Índice

Índice	9
Índice de figuras	11
Abreviaturas	12
Resumen	13
Abstract	14
Prólogo	15
Distancia, olvido y argumentos circulares	15
Introducción	18
Química y bioquímica de porfirinas de manganeso	18
Preámbulo en la química de porfirinas	18
Catálisis de dismutación de superóxido	19
Algunos detalles de las porfirinas aquí empleadas	22
¿Quién necesita SOD?	23
Farmacología de porfirinas de manganeso	24
La inesperada eficiencia de MnTCCP	27
Un modelo de aplicación exitosa	27
Búsqueda de relaciones causales entre la reactividad y la actividad biológica	28
Tres visiones sobre la isquemia-reperusión cerebral	29
Mejor un casco	31
En resumen	31
Química y bioquímica (brevísimas) de peroxinitrito	32
Origen del peroxinitrito	32
Destinos del peroxinitrito	32
Reacción con ácidos de Lewis	33
Reacciones con el grupo tiol	35
Reacciones con selenoproteínas	38
La mayor parte del peroxinitrito se inactiva	39
Inactivadores de peroxinitrito	41
Resultados	43
Experimentos liminares y el trabajo 0	44
Oxidación de MnTCCP	44
Primeros intentos en la cinética	45
Nitración de aromáticos	46

Primer intento estudiar la catálisis	49
Trabajo 1. Un estudio más ordenado de la catálisis	51
Resultados adicionales al trabajo 1	59
La reacción C	60
Las reacciones b	60
Competencia cinética	61
Trabajo 2. Reducción de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y correlaciones de reactividad	63
Aparece el Mn^{II}	63
Correlaciones y falta de correlaciones	64
Trabajo 3. Aplicación de un ciclo $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{IV}}$ a la reducción de ONOO^-	72
Discusión y resultados adicionales al trabajo 3	81
Efectos “antioxidantes” y “prooxidantes”	81
Dos órdenes de magnitud no son tanto (a veces)	82
Trabajo 4. Reducción de Mn^{III} Porfirinas y efectos sobre blancos bioquímicos	85
Antecedentes del trabajo 4	85
La búsqueda de un reductor adecuado	86
¿La absorbancia a 454 nm baja!	86
Resultados adicionales al trabajo 4	99
Otras porfirinas	99
Otros reductores adecuados	100
¿Qué aspectos importan en la reducción de porfirinas?	101
Conclusiones	104
Epílogo	105
Apéndice - Los compuestos usados	107
Referencias	110
Trabajo 0	116

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de Mn ^{II} TM-4-PyP	20
Figura 2. Potenciales redox para algunas porfirinas de manganeso, especies reactivas de oxígeno y superóxido dismutasas.	23
Figura 3. Esquema de la reacción de nitración de tirosina	35
Figura 4. Constantes de velocidad de reacción de peroxinitrito con tioles de diferente pKa.	38
Figura 5. Espectros de MnTCPP y MnTCPP oxidado con ONOO ⁻	45
Figura 6. Rendimientos de nitración de 4-HPA con ONOO ⁻ catalizada por diferentes MnPorfirinas.	46
Figura 7. Rendimientos de nitración de tirosina con ONOO ⁻ catalizada por diferentes MnPorfirinas	48
Figura 8. Esquema de reacciones para la catálisis de reducción de peroxinitrito.	49
Figura 9. Reacción de glutatión con ONOO ⁻ en ausencia y presencia de MnTCPP.	50
Figura 10. Gráfico de Eyring del efecto de la temperatura sobre la constante de velocidad de la reacción a.	60
Figura 11. Movilidad electroforética relativa de LDL en gel de agarosa	82
Figura 12. Formación de hidroperóxidos en ésteres de colesterol presentes en LDL sometida a un flujo de peroxinitrito	83
Figura 13. Distribución de blancos para un flujo de ONOO ⁻ .	84
Figura 14. Reducción de Mn ^{III} Porfirinas con partículas submitocondriales (PSM) y NADH	87
Figura 15. Oxidación de Mn ^{II} TM-2-PyP con ONOO ⁻	89
Figura 16. Esquema de reacciones para la catálisis de reducción de peroxinitrito por dos electrones	100
Figura 17. Potenciales redox para algunas porfirinas de manganeso y flavoenzimas.	102
Figura 18. Reducción de diferentes MnPorfirinas por hipoxantina/xantina oxidasa	102

Abreviaturas

- 4-HPA.** 4-hidroxifenilacetato
AhpC. Alquilhidroperóxido reductasa C
ApoE. Apolipoproteína E
BSA. Albúmina de suero bovino
cTPx. Tiorredoxina peroxidasa citosólica
EGTA. Ácido etilenglicol bis (β -aminoetiléter) *N,N,N',N'*-tetraacético
ELA. Esclerosis lateral amiotrófica
ERO. Especies reactivas de oxígeno
GAPDH. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GSH. Glutati6n
HSA. Albúmina de suero humano
KO. Knock out
LDL. Lipoproteína de baja densidad
MnTB-2-PyP. Manganeso (III) tetrakis (2-*N*-(*n*-butil) piridil) porfirina (5+)
MnTCPP. Manganeso (III) tetrakis (4-carboxilato fenil) porfirina (3-)
MnTDE-1,3-IP. Manganeso (III) tetrakis (1,3-dimetil)2-imidazoliolil) porfirina (5+)
MnTE-2-PyP. Manganeso (III) tetrakis (2-*N*-etilpiridil) porfirina (5+)
MnTHex-2-PyP. Manganeso (III) tetrakis (2-*N*-(*n*-hexil) piridil) porfirina (5+)
MnTM-2-PyP. Manganeso (III) tetrakis (2-*N*-metilpiridil) porfirina (5+)
MnTM-3-PyP. Manganeso (III) tetrakis (3-*N*-metilpiridil) porfirina (5+)
MnTM-4-PyP. Manganeso (III) tetrakis (4-*N*-metilpiridil) porfirina (5+)
MnTOct-2-PyP. Manganeso (III) tetrakis (2-*N*-(*n*-octil) piridil) porfirina (5+)
MnTP-2-PyP. Manganeso (III) tetrakis (2-*N*-(*n*-propil) piridil) porfirina (5+)
MnTSPP. Manganeso (III) tetrakis (4-sulfonato fenil) porfirina (3-)
NADH DH. NADH deshidrogenasa, complejo I
PBS. Soluci6n salina amortiguada con fosfato
PRDX5. Peroxirredoxina 5.
PSM. Partículas submitocondriales
SDH. Succinato deshidrogenasa, complejo II
SOD. Superóxido dismutasa
TPx. Tiorredoxina peroxidasa
TXNPx. Triparredoxina peroxidasa
XO. Xantina oxidasa

Resumen

Hemos caracterizado la cinética de reacción de un conjunto de porfirinas de manganeso (MnPorfirinas) solubles en agua frente a peroxinitrito (ONOO^-) y radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$). La reacción, entre ONOO^- y el complejo de Mn^{III} , tiene constantes de velocidad entre 10^5 y $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 37°C con un comportamiento sigmoide en función del pH, pK_a aparentes cercanos al del par $\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$ y máximos a pH alcalino. La reacción produce el complejo $\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}$ y $\cdot\text{NO}_2$. Los valores de estas constantes de velocidad tienen una relación lineal de energía libre con parámetros fisicoquímicos de la porfirina tales como el potencial redox del par $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{II}}$ o la acidez de Brønsted de los nitrógenos pirrólicos o de las moléculas de agua axiales. La reacción, entre ONOO^- y el complejo de Mn^{II} , tiene constantes de velocidad $<10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37°C y produce estequiométricamente $\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}$ y NO_2^- . La reacción, entre $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y el complejo de Mn^{III} tiene constantes de velocidad extrapoladas a pH neutro entre 2 y $12 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ con un comportamiento ácido base congruente con la ionización de las moléculas axiales de agua presentes en el complejo. La reacción entre $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y el complejo de Mn^{II} tiene constantes de velocidad a pH = 10.4 entre 1 y $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En ambos casos el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ produce oxidaciones por un electrón.

Los complejos de $\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}$ se reducen en forma rápida con ascorbato o urato hasta Mn^{III} en presencia de oxígeno y, con bajas concentraciones de O_2 , la reducción puede llegar hasta Mn^{II} si los reductores son flavoenzimas reducidas, entre ellas succinato deshidrogenasa y NADH deshidrogenasa de la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Estas reacciones de reducción completan dos posibles ciclos para catalizar la reducción de ONOO^- o $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con una eficiencia suficiente para proteger blancos biológicos en concentraciones micromolares de MnPorfirinas.

Se presentan resultados de uso del ciclo catalítico $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{IV}}$ con urato como reductor en la protección de LDL *in vitro* y del ciclo catalítico $\text{Mn}^{\text{II}}/\text{Mn}^{\text{IV}}$ con succinato/succinato deshidrogenasa como reductor para proteger actividades enzimáticas de partículas submitocondriales *in vitro*.

Los resultados obtenidos indican que la interacción de MnPorfirinas con reductores biológicos y en particular con flavoenzimas mitocondriales podría explicar en parte la actividad protectora de estos compuestos en diversos modelos de patología vinculada con estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

Abstract

We have characterized the reaction kinetics of a series of water-soluble manganese porphyrins (MnPorphyrins) toward peroxyxynitrite (ONOO^-) y carbonate radical ($\text{CO}_3^{\cdot-}$). The reaction between ONOO^- and the Mn^{III} complexes has rate constants in the range of $10^5 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 37°C with a sigmoid pH dependence, apparent pK_{a} s close to those of $\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$ and maxima at alkaline pH. The reaction produces the $\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}$ complex plus $\cdot\text{NO}_2$. The values of these rate constants have free energy linear relationships with physical chemical parameters of the porphyrin such as the redox potential of the $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{II}}$ couple, and the Brønsted acidity of the pyrrolic nitrogens or of the axial water molecules. The reaction of ONOO^- with the Mn^{II} complex has rate constants $<10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 7.4 and 37°C and produces stoichiometrically $\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}$ plus NO_2^- . The reaction of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ with the Mn^{III} complexes has rate constants (extrapolated to neutral pH) in the range of 2 to $12 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ with an acid base behavior consistent with the ionization of the axial water molecules present in the complex. The reaction of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ with the Mn^{II} complexes has rate constants at pH = 10.4 in the range of 1 to $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In both reactions $\text{CO}_3^{\cdot-}$ produces one-electron oxidations.

The $\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}$ complexes are rapidly reduced with ascorbate or urate to Mn^{III} in the presence of oxygen and, at low O_2 concentrations, the reduction can go to Mn^{II} when the reductants are reduced flavoenzymes, for instances, succinate dehydrogenase and NADH dehydrogenase from the mitochondrial electron transport chain. These reduction reactions complete two potential cycles to catalyze the reduction of ONOO^- or $\text{CO}_3^{\cdot-}$ with enough efficiency to protect biological targets at micromolar levels of MnPorphyrins.

Results are shown of the use of the catalytic $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{IV}}$ cycle with urate as reductant in the protection of LDL *in vitro*, and of the catalytic $\text{Mn}^{\text{II}}/\text{Mn}^{\text{IV}}$ with succinate/succinate dehydrogenase as reductant to protect enzymatic activities in submitochondrial particles *in vitro*.

The results suggest that the interaction of MnPorphyrins with biological reductants, and particularly with mitochondrial flavoenzymes could partly explain the protective activity of these complexes in various pathology models related to oxidative stress and mitochondrial dysfunction.

Prólogo

Meyer-Betz injected a solution of 200 mg of hematoporphyrin into his own blood. Subsequent exposure to sunlight produced most distressing symptoms. On the spot where the injection had been made under the influence of Finsen light an infiltration developed, which passed into necrosis... The sensitiveness of the skin to light lasted for a long time.

Se dice que la idea de Meyer-Betz, narrada en el epígrafe⁽¹⁾ demoró dos meses en curarse. Si bien es un ejemplo de ensayo clínico decimonónico digno de Pasteur inyectando virus o del Sr. Griffin de fama invisible, también podemos considerarlo el más antiguo de los antecedentes de esta tesis. Una búsqueda de causas y efectos entre las propiedades de una serie de compuestos y algunas de sus numerosas actividades biológicas documentadas, eso mismo es lo que hemos tratado de hacer en los años cubiertos por este trabajo.

El éxito, como siempre en ciencia, ha sido limitado, creemos saber mucho más que al inicio del trabajo, es decir, creemos poder enumerar muchas más cosas que ignoramos aún.

Antes de presentar el trabajo como tal me voy a permitir presentar a un malentendido que de forma casi fantasmal recorre el área de la bioquímica de porfirinas. Sospecho que fantasmas similares habitan en casi cualquier disciplina que convoque, como la bioquímica inorgánica, a especialistas de áreas diversas.

Distancia, olvido y argumentos circulares

Si llegara a ser cierto que de noche todos los gatos son pardos, no es menos cierto que desde la gastroenterología todas las porfirinas son muy parecidas. Podría aventurar que la situación contrapuesta también sucede y que ver la gastroenterología desde la química de coordinación requiere tener muy buena vista. Existen numerosos obstáculos metodológicos y lingüísticos, por mencionar sólo dos, que oscurecen la visión y hacen que el detalle se pierda en la lejanía. Así, para un científico tratar un modelo de colitis en ratas empleando porfirinas de manganeso (el ejemplo es sesgado), una porfirina puede resultar

prácticamente igual a otra, e incluso las puede poner en un amplio cajón donde caben todos los antioxidantes. A tal punto que al escribir su artículo⁽²⁾ el nombre en clave del compuesto aparece mal desde el título, en ningún momento se menciona la fórmula y la única propiedad que aparece es la de “antioxidante”. Este es un ejemplo extremo de descuido debido a la distancia, pero no es para nada el único.

Es bastante común que desde lejos se trate a una colección de compuestos diversos como si fueran idénticos y, por supuesto, las porfirinas de manganeso no se salvan de esta distorsión. A finales de los años 90 las porfirinas de manganeso eran “*Superoxide dismutase (SOD) mimics*”, pero cuando se fueron caracterizando nuevas reacciones, pasaron a ser “*SOD mimics & X*” donde X era generalmente otra propiedad antioxidante. Finalmente, desde hace unos años, la denominación que prevalece es la de “antioxidantes catalíticos”, que en todo caso refleja algo más de madurez dada su amplitud y flexibilidad. Pero también un sesgo disonante con una parte importantísima de la literatura sobre estos compuestos (ver la página 18). Esta distorsión por generalización consiste en considerar que cualquiera de la lista de “antioxidantes catalíticos” se comportará más o menos igual, por lo que da lo mismo cuál se use.

Curiosamente, aunque esta distorsión erosiona la robustez de muchos trabajos, ha tenido al menos un resultado que valdrá la pena analizar en detalle más adelante y que se relaciona con los efectos benéficos inadvertidamente inesperados de un compuesto (ver la página 27).

Para observar otra más de las caras fantasmales de este tipo de distorsión, propongamos una situación: un investigador *supone* que el trastorno A es causado en última instancia por la sustancia X, el investigador lee que la sustancia M es capaz de destruir/atrapar/inactivar a X y somete su propuesta al experimento. Efectivamente, un tratamiento con M alivia el trastorno A. Todo parece indicar un final feliz... pero no siempre es el caso. La superabundancia de información hace imposible haber leído de primera mano todos los detalles acerca de la sustancia M y su interacción con X y la mala información se agudiza con la distancia antes mencionada. A menudo se confía en lecturas de segunda mano, donde se citan datos de fuentes originales. En algunos casos esta cadena de citas se hace muy larga, e incluso atraviesa las fronteras de forma que la revista original está en un área del conocimiento y el especialista que la cita está en otra. Existe entonces el riesgo de que una hipótesis se haya convertido involuntariamente en una certeza en alguno de los eslabones de la cadena. Si en una referencia se cita a cierta porfirina como “inactivador de peroxinitrito” muy a menudo no queda claro si esta cualidad es general, de qué condiciones depende, qué otras reacciones son posibles o si se trata de una hipótesis que extrapola una reacción *in vitro* a una condición *in vivo*. En fin, hay cuestiones de especificidad y eficiencia que no caben en un nombre que debe tener gran “impacto”. No es raro entonces, que lo que parecía un final feliz no sea otra cosa que una hipótesis basada en otra hipótesis que se transforma en un argumento circular. Se puede ver un ejemplo de esto en una referencia reciente⁽³⁾, donde se usa una porfirina de hierro llamada

misteriosamente FP15 como inactivador de peroxinitrito específico y exclusivo, ignorando que tal compuesto puede estar involucrado y/o catalizar muchas otras reacciones incluso en condiciones de ausencia de oxígeno donde la formación de peroxinitrito se dificulta sobremañera⁽⁴⁾.

En una ocasión un colega se horrorizó de forma manifiesta al saber que las porfirinas se empleaban como catalizadores de oxidación. Durante un congreso internacional después de que John Groves presentara un trabajo sobre la inactivación de peroxinitrito por porfirinas metálicas⁽⁵⁾ este colega preguntó en forma casi impertinente si eran las mismas porfirinas que catalizaban la oxidación de ADN, en referencia a un trabajo anterior de Groves⁽⁶⁾. Sí, eran las mismas porfirinas, e incluso podría pensarse que era *grosso modo* la misma reacción: reducción de peroxinitrito por una molécula catalizada por porfirinas de manganeso. Lo que este colega soslayó en la distancia que va desde su área de especialidad hasta la cinética química, es que las reacciones beneficiosas o contraproducentes sólo existen en la opinión del experimentador. Para un oxidante, un antioxidante, un blanco crítico o un catalizador que medie entre ellos sólo habrá cinética y termodinámica, la conveniencia o inconveniencia de las reacciones no cuentan en ese ámbito.

A riesgo de que el lector se canse de mi forma de pontificar necesito expresar estas opiniones aquí por haber escuchado en repetidas oportunidades preguntas que parecen ignorar la verdadera naturaleza y posibilidades de modestos compuestos como las porfirinas de manganeso. También como advertencia de que son compuestos de bajo peso molecular, diseñados y sintetizados en varios laboratorios con la idea de optimizar algunas de sus propiedades. Son catalizadores de *muchas* reacciones redox, de tal suerte que se acelerarán *todas* las reacciones para las cuales las condiciones sean favorables. No han pasado por el fino tamiz de la evolución, capaz de seleccionar la exquisita especificidad de tantas reacciones bioquímicas. Acaso poco más de una década en un puñado de laboratorios no puede hacernos esperar especificidad, en este caso y por el momento tal vez lo más razonable sea acumular conocimientos y procurar tendencias y correlaciones, más que salir a la búsqueda del *gran antioxidante catalítico*.

Finalmente, como advertencia para el lector, dejaré de escribir en singular y de aquí en adelante usaremos el plural en primera persona, para mencionar en todo momento que si bien hay un solo autor que firmará este trabajo de tesis, lo que aquí se presenta siempre se hizo en equipo, con la participación de colegas y amigos en las fases de diseño, experimentación e interpretación de resultados.

Introducción

Química y bioquímica de porfirinas de manganeso

Preámbulo en la química de porfirinas

Parece un poco injusto el tratamiento que la bioquímica actual le da a Jacques-Louis Soret. En tanto que podemos revisar los textos más populares de bioquímica universitaria y encontrar menciones a la banda de Soret es muy difícil encontrar en dichos textos (y en casi cualquier otro) tan siquiera uno que mencione el nombre y nacionalidad de este señor. Jacques-Louis Soret nació en Ginebra en 1827 y trabajó como químico en la universidad local, además de dar su nombre a la característica más notable del espectro de las porfirinas, fue codescubridor del holmio y quien propuso que O_3 era la fórmula molecular del ozono. Su trabajo sobre porfirinas⁽⁷⁾ consistió en ubicar el máximo de absorción de la hemoglobina sanguínea con los instrumentos de la época, por ejemplo, lo ubicó entre las bandas G (430.6 nm) y H (396.96 nm) del espectro solar, pero más cerca de ésta última y menciona que al agregar monóxido de carbono la banda se desplaza ligeramente hacia el rojo.

Tras esta primera caracterización espectroscópica de un compuesto porfirínico siguieron trabajos dedicados a la síntesis del anillo porfirínico, sin que se supiera demasiado de su estructura, incluso en 1935, Paul Rothemund lo menciona como “*the as yet hypothetical tetracyclic parent ring system of the porphyrins*”, en referencia su producto de síntesis por la reacción de pirrol con aldehídos⁽⁸⁾. Más adelante se caracterizaron mejor los espectros y las constantes de acidez de los macrociclos⁽⁹⁾ y antes de la mitad del siglo pasado se emprenden caracterizaciones químicas y espectroscópica exhaustivas de complejos metal porfirina⁽¹⁰⁾.

Existen diversas vertientes en la justificación de los estudios sobre porfirinas metálicas, como la comprensión de estructura y función de hemoproteínas o de la clorofila y la fotosíntesis. No es nuestra intención extendernos más de la cuenta en una exposición minuciosa de los centenares de estudios acerca de las porfirinas y sus complejos metálicos. Parece importante, no obstante, mencionar el conjunto de estudios realizados entre otros por el grupo de Bernard Meunier en Toulouse, donde se estudian las características de las porfirinas como catalizadores en reacciones de oxidación, sea con interés biológico o sintético⁽¹¹⁾.

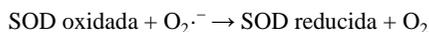
Catálisis de dismutación de superóxido

En el origen mismo del área de bioquímica de especies reactivas del oxígeno está el superóxido. Antes de 1969 había varios informes de producción biológica de radicales libres entre los cuales el superóxido es central. Incluso en lugares remotos y exóticos como Uruguay⁽¹²⁾ se proponía la producción enzimática de superóxido como una reacción normal. No obstante, apenas en 1969 con la publicación del artículo de McCord y Fridovich⁽¹³⁾ comenzó el proceso de aceptación de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO) como especies presentes dentro de la fisiología normal. El superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es tan sólo la primera especie reactiva del oxígeno, no sólo históricamente sino también términos de causalidad de las demás. La formación de las demás ERO casi siempre está directa o indirectamente relacionada con la formación previa de superóxido.

La formación de superóxido *in vivo* que fue tan resistida hace 40 años⁽¹⁴⁾ aparece, en la visión del comienzo del siglo XXI, no sólo fácil sino inevitable. Además de la producción enzimática por la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa, se propone su generación por “fuga” de electrones hacia el oxígeno, por ejemplo en la cadena mitocondrial de transporte de electrones o en la sintasa de óxido nítrico desacoplada. Finalmente, el superóxido puede ser producto de la reducción monoelectrónica y no enzimática de oxígeno por parte de diversas sustancias principalmente exógenas que incluso pueden catalizar esta reacción mediante ciclos redox.

Esta aparente imposibilidad de evitar la formación proviene del conocimiento de la existencia de una serie de enzimas llamadas superóxido dismutasas (SOD) cuya función principalísima es transformar el superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Desde la primera evidencia presentada por Fridovich hasta la fecha se han encontrado al menos tres orígenes evolutivos para proteínas con actividad SOD, en mamíferos dos de esos orígenes han dado lugar las enzimas que contienen cobre y cinc (citósólica y extracelular) y las que contienen manganeso (de la matriz mitocondrial).

A pesar de sus grandes diferencias estructurales y evolutivas, las SOD tienen en común el mecanismo de acción que se puede resumir como una reacción ping-pong donde el superóxido es el sustrato de los dos pasos:



Donde SOD oxidada se refiere a la que contiene Cu^{II} o Mn^{III} y SOD reducida a la que contiene Cu^I o Mn^{II} .

El primer artículo que encuentra que algunas porfirinas de manganeso catalizan la dismutación de superóxido data de 1981⁽¹⁵⁾, emplea la técnica ya casi abandonada de la competencia con nitroazul de tetrazolio y lo hace a un pH cercano a 10. Casi de inmediato,

otro grupo⁽¹⁶⁾ publicó experimentos de radiólisis de pulso donde se caracteriza la reacción a través de la desaparición de superóxido. En ambos trabajos se utilizó el complejo MnTM-4-PyP (ver la Figura 1)* y la velocidad medida de dismutación de superóxido se interpretó como una constante para la dismutación del orden de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Al medir la velocidad de desaparición de superóxido, ya sea por competencia o en forma directa, ambos grupos estaban evaluando una constante global para la dismutación catalítica para la cual, con base en la reacción enzimática, se proponía un mecanismo ping-pong como sigue:

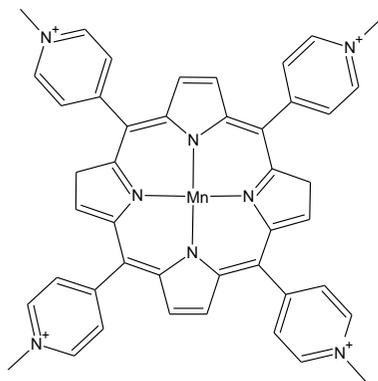


Figura 1. Estructura de MnTM-4-PyP

Fue la primera porfirina en que se estudió la actividad SOD.

manganeso eran a fines de dicha década sólo una de las varias familias de compuestos con esa capacidad.

En 1994⁽¹⁸⁾, uno de los artículos acerca de estos compuestos que modelan la reactividad de la SOD fue un paso más allá y su importancia es crucial para el desarrollo de este trabajo, así que nos detendremos en él por algunos párrafos. La idea de una molécula que “imite” o, mejor dicho, modele la reactividad de la SOD simplemente porque puede catalizar la dismutación de superóxido es bastante limitada. Si bien la reacción catalizada por la SOD es aparentemente sencilla, la función redox de esta enzima separa, de acuerdo con la hipótesis de McCord y Fridovich, los organismos anaeróbicos estrictos de aquellos

Una exploración más detallada de la secuencia de reacciones, nuevamente mediante radiólisis de pulso⁽¹⁷⁾, permitió determinar que la reacción (1) limita la velocidad del ciclo, mientras que la reacción (2) es tan rápida como la reacción de la SOD con superóxido (aproximadamente $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Esta información será central en el desarrollo posterior de los compuestos.

Fue en esta época, en la segunda mitad de los años 80 que aparecieron en la literatura científica términos como “SOD mimic” o “SOD mimetic” (éste último particularmente inapropiado) para denominar a compuestos que catalizan la dismutación de superóxido en forma similar a la enzima. Las porfirinas de

* Los nombres completos y la estructura de las porfirinas se detallan en el Apéndice I

que pueden soportar concentraciones apreciables de oxígeno⁽¹⁹⁾, por lo tanto cabe esperar varios requisitos adicionales de especificidad y estabilidad para que un compuesto pueda funcionar como la enzima.

El artículo de 1994 recoge ese reto, para ser un modelo de la enzima SOD, un compuesto debe permitir que un organismo anaeróbico estricto crezca en una atmósfera con oxígeno de manera similar a un organismo aeróbico.

Los resultados de ese artículo son, cuando menos, sorprendentes. Faulkner, Liochev y Fridovich usan cinco porfirinas de manganeso, para dos de ellas logran medir constantes de catálisis modestas (MnTM-4-PyP es la mejor con una constante corregida* de $3.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (4,20)), otras dos no tienen actividad y la quinta (MnT_CPP) interfiere con el ensayo de actividad de competencia con citocromo *c*(Fe^{III}). A pesar de esto, los dos compuestos probados, MnTM-4-PyP y MnT_CPP, fueron capaces de proteger a una cepa de *Escherichia coli* carente de SOD de la presencia de oxígeno.

Este artículo constituye el punto de partida para el estudio bioquímico de las porfirinas de manganeso. Las razones son varias:

- Plantea la posibilidad de realizar la reacción “lenta” de la dismutación (reacción 1) con otros reductores en lugar de superóxido, de forma que el $\text{O}_2^{\cdot-}$ se transforma completamente en H_2O_2 y así supera la limitación catalítica de los compuestos.
- Encuentra varios reductores intracelulares posibles: reductores químicos como glutatión y reductores enzimáticos que emplean NADPH, cualquiera de ellos más abundante que el superóxido.
- Indica por primera vez que el estado de oxidación predominante *in vivo* es Mn(II), al menos para MnTM-4-PyP.
- Retira parcialmente el énfasis de la búsqueda de la eficiencia catalítica y lo coloca en la interacción con biomoléculas en un entorno intracelular con sus particulares características de abundancia de reductores y baja concentración de O_2 .

A partir de los dos compuestos usados en bacterias en este artículo (MnT_CPP y MnTM-4-PyP) se generaron en los siguientes 10 años dos líneas de investigación bastante bien definidas sobre porfirinas de manganeso y estrés oxidativo.

La primera línea, que tiene entre sus autores más importantes a Brian Day y John Crapo ha puesto más énfasis en MnT_CPP, que es el compuesto con menor actividad SOD y lo han empleado en muchos estudios con modelos celulares, tisulares e *in vivo* de estrés oxidativo (existe una revisión actualizada de estos estudios⁽²¹⁾).

La otra línea, liderada desde el laboratorio de Irwin Fridovich por Ines Batinić-Haberle se ha dedicado a innovar en la síntesis de compuestos catiónicos similares al MnTM-4-PyP pero con mayor actividad catalítica⁽²²⁻²⁵⁾, a tratar de comprender las

* Los autores cometieron un error al utilizar una constante de velocidad inadecuada para la reacción de cit c^{3+} con $\text{O}_2^{\cdot-}$, los valores corregidos se publicaron posteriormente.

propiedades fisicoquímicas que afectan la catálisis^(4,20,26) y más recientemente a probar dichos compuestos en modelos de patologías asociadas con el estrés oxidativo⁽²⁷⁻³⁰⁾.

Entre ambas líneas de investigación existe cierta separación, pero es más perceptible la separación que existe entre la caracterización cinética de los catalizadores y su utilización en modelos biológicos. No es evidente que haya una preferencia por parte de los investigadores para escoger los compuestos con mayor eficiencia catalítica, por ejemplo, en un sistema de ratones nulicigotos para la SOD mitocondrial, se emplea MnTCPP⁽³¹⁾ sin considerar que es de los compuestos más lentos para catalizar la dismutación.

Por otra parte, el éxito que se ha logrado en numerosos estudios de protección frente a estrés oxidativo con porfirinas que tienen una limitada actividad SOD lleva a pensar que la catálisis de la dismutación de superóxido no es el único ni el principal mecanismo de protección.

Algunos detalles de las porfirinas aquí empleadas

La búsqueda de mayor actividad SOD llevó al desarrollo de nuevas porfirinas en las cuales el cambio de los sustituyentes meso lograba cambios en el potencial redox del manganeso. El primer paso en la optimización de la actividad SOD consistió en utilizar sustituyentes metilpiridinio con el nitrógeno piridínico en posición orto a la sustitución con lo que se obtiene un aumento de 160 mV en el potencial redox del par Mn^{II}/Mn^{III} y un aumento de un orden de magnitud en la velocidad de dismutación de superóxido⁽²⁰⁾. La búsqueda de correlaciones de la actividad SOD se extendió a potenciales redox y otros parámetros fisicoquímicos y la idea subyacente era que una porfirina con un potencial redox similar al de la SOD tendría una actividad máxima⁽⁴⁾. La búsqueda ha continuado modificando la longitud de las cadenas sustituyentes de alquilpiridinio también para modificar el potencial redox⁽²⁴⁾, posteriormente incluyendo cadenas más polares que las de alquilo utilizadas originalmente y grupos alquilimidazolío (simétricos) en lugar de los 2-alquilpiridinio (asimétricos) lo que evita la necesidad de separación de isómeros⁽²²⁾. Se han encontrado excelentes constantes de velocidad de dismutación de superóxido pero también se ha observado que al aumentar el potencial redox disminuye la estabilidad del complejo⁽³²⁾. También se ha encontrado que hay otros factores que afectan la constante de dismutación de superóxido. Nuestro trabajo incluye la reacción de las porfirinas de manganeso con otras especies reactivas de oxígeno más oxidantes que el superóxido, por lo que el estado de oxidación Mn^{IV} también debe considerarse. En la Figura 2 se presentan un esquema con algunos potenciales redox de porfirinas representativas, junto con potenciales de superóxido, SOD, peroxinitrito y radical carbonato. En el apéndice se presenta una lista más completa para los pares redox Mn^{II}/Mn^{III} .

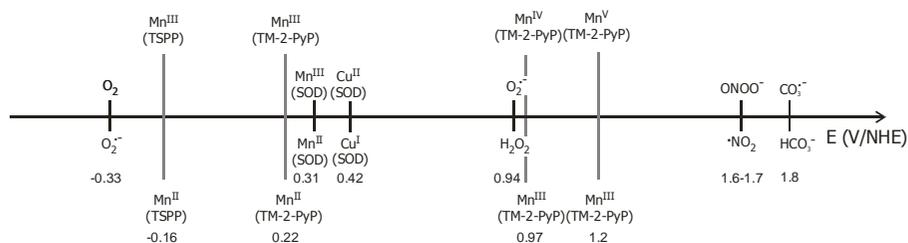


Figura 2. Potenciales redox para algunas porfirinas de manganeso, especies reactivas de oxígeno y superóxido dismutasas.

Los potenciales redox se obtuvieron de la literatura para $ONOO^{\cdot-}$ (33), MnPorfirinas (4,34,35), SOD y $O_2^{\cdot-}$ (36) y $CO_3^{\cdot-}$ (37).

¿Quién necesita SOD?

La idea de “suplir” con fármacos dotados de actividad SOD implica situaciones de carencia o deficiencia. La implicación podría simplificarse de la siguiente manera: el superóxido es el precursor de las especies reactivas del oxígeno, entonces si se aumenta la actividad SOD podremos evitar al menos una parte del consecuente estrés oxidativo. Una pregunta que podríamos hacer es ¿cuánto debemos aumentar? Dado que la SOD es abundante y eficiente resulta difícil pensar en una suplementación eficiente. Si usamos la más eficiente de las porfirinas de manganeso conocida hasta la fecha, (MnTDTEG-2-ImP⁵⁺, $k_{cat} = 3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (38)) habría que lograr concentraciones cercanas a 100 μM en citoplasma y/o mitocondria para lograr algún aumento significativo respecto a la actividad SOD basal y esto no parece ser algo factible en un desarrollo farmacéutico.

No queda duda de que la actividad SOD de estos compuestos puede ser utilizada en sistemas carentes de la enzima, se ha descrito el uso en *E. coli* carente de SOD (18). Otro caso donde la deficiencia se puede rescatar en parte con porfirinas de manganeso es el de ratones nulicigotos para SOD mitocondrial(39) cuya supervivencia aumenta marcadamente si se tratan con MnTCPP y con otros compuestos que también poseen actividad SOD. Posiblemente se pueda justificar el agregado de compuestos con actividad SOD a sistemas donde el sistema inmunitario hace que el estrés oxidativo se genere fuera de las células en compartimientos pobres en actividad SOD propia.

Por otra parte, un aumento marcado en la actividad SOD no representa una ventaja tan evidente. En los modelos de sobreexpresión de CuZnSOD citosólica en mamíferos(40) se observan algunos casos de mejor resistencia al estrés oxidativo agudo(41), no obstante el resultado observado de aumento de la longevidad en insectos (42) no se reprodujo en ratones, incluso con los mayores índices de sobreexpresión se observa una pequeña disminución de la supervivencia(43). En el caso de la MnSOD mitocondrial, la

sobreexpresión genera protección nuevamente en modelos de estrés oxidativo agudo y la sobreexpresión diferencial en pulmones produce una protección marginal contra la toxicidad del oxígeno hiperbárico ⁽⁴⁴⁾. Finalmente, la sobreexpresión de la SOD extracelular ocasiona un marcado aumento en la toxicidad del oxígeno hiperbárico ⁽⁴⁵⁾ y también afecta el aprendizaje a largo plazo en ratones ⁽⁴⁶⁾.

Entonces, una actividad SOD aumentada extracelular, citosólica o mitocondrial puede mejorar situaciones donde el estrés oxidativo aumenta súbitamente, pero no siempre. En algunos casos, dicho aumento produce efectos nocivos que no son fácilmente previsible.

Farmacología de porfirinas de manganeso

Hemos dicho que diversas porfirinas de manganeso han resultado útiles para aliviar diversos efectos nocivos relacionados con estrés oxidativo, en las Tablas 1-3 aparece un resumen de referencias, basado en la revisión publicada por Brian Day en Drug Discovery Today⁽²¹⁾. Tengamos en cuenta esta visión antes de abordar algunos ejemplos interesantes.

Tabla 1 Porphirinas de manganeso utilizadas para bloquear el estrés oxidativo en modelos *in vitro*

Sistema modelo	Tipo celular afectado	Complejos usados	Ref.
<i>Citotoxicidad</i>			
Peróxido de hidrógeno	Fibroblastos	MnTCPP	(47)
Privación de oxígeno y/o glucosa	Neuronas	MnTCPP	(48)
		MnTE-2-PyP	
		MnTDE-1,3-IP	(28)
		MnOBTCPP	(49)
Citotoxicidad mediada por neutrófilos	Linfocitos	MnTCPP	(50)
Paraquat	Epitelial	MnOBTCPP	(49)
SOD2 KO	Neuronas	MnTCPP	(51)
		MnTE-2-PyP	
<i>Apoptosis</i>			
Activación del receptor de los linfocitos T	Linfocitos	MnTCPP	(52)
Tensión cíclica	Miocitos	MnTM-4-PyP	(53)
MPP	Neuronas	MnTCPP	(54)
Óxido de estireno	Neuronas	MnTCPP	(55)

Tabla 2 Porphirinas de manganeso utilizadas para bloquear el estrés oxidativo en modelos *ex vivo*

Sistema modelo	Órgano y/o tejido	Complejos usados	Refs
Hipertrofia cardiaca	Corazón aislado	MnTM-4-PyP	(56)
Endotoxina	Macrófagos peritoneales	MnTCPP	(57)
Disfunción vascular	ApoE KO	MnTCPP	(58)
Lesión por compresión	Cartilago	MnTE-4-PyP	(59)
Peroxidación lipídica	Homogeneizado de cerebro	MnOBTCPP	(49)
		MnTDM-1,3-IP	(60)
		MnTDE-1,3-IP	
	LDL	MnTDP-1,3-IP	
		MnTE-2-PyP	(61)
		MnTCPP	
		MnTOct-2-PyP	

Tabla 3. Porfirinas de manganeso utilizadas para bloquear el estrés oxidativo en modelos *in vivo*

Sistema modelo	Especie utilizada para el sistema modelo	Complejos usados	Refs
<i>Pulmón</i>			
Fibrosis por bleomicina	Ratón	MnTCPP	(62)
Fibrosis por radiación	Rata	MnTE-2-PyP	(27)
Lesión por humo de tabaco	Rata	MnTDE-1,3-IP	(63)
Asma inducida por antígeno	Ratón	MnTE-2-PyP	(64)
Lesión inducida por hemorragia	Ratón KO SOD3	MnTDE-1,3-IP	(65)
Displasia broncopulmonar	Babuino	MnTE-2-PyP	(66)
<i>Cardiovascular</i>			
Tolerancia al nitrato	Rata	MnTCPP	(67)
<i>Sistema nervioso central</i>			
Lesión por kainato	Ratón KO SOD2	MnTCPP	(68)
Vasoconstricción cerebral	Ratón tg proteína amiloide	MnTCPP	(69)
	Rata	MnTCPP	(70)
Vasoconstricción cerebral por péptidos A- β	Ratón	MnTCPP	(71)
Lesión de médula espinal	Rata	MnTCPP	(72)
Isquemia-reperusión	Rata	MnTE-2-PyP	(73)
	Ratón	MnTDE-1,3-IP	(28)
Pérdida auditiva por meningitis	Rata	MnTCPP	(74)
Supervivencia en modelo de ELA	Ratón mutante hSOD G93A	MnTDE-1,3-IP	(75,76)
<i>Hígado</i>			
Lesión por acetaminofén	Ratón	MnTCPP	(77)
Lesión inducida por Fas	Ratón	MnTCPP	(78)
Isquemia-reperusión	Rata	MnTDE-1,3-IP	(79)
<i>Digestivo</i>			
Colitis inducida por ácido acético	Rata	AEOL11201	(2)
<i>Renal</i>			
Endotoxina	Ratón	MnTE-2-PyP	(80)
<i>Endócrino</i>			
Diabetes	Ratón	MnTE-2-PyP	(30)
<i>Inmunitario</i>			
Infección por virus de coriomeningitis linfocítica	Ratón	MnTCPP	(81)
<i>Multiorgánico</i>			
Sepsis por ligación cecal	Rata	MnTE-2-PyP	(82)

La inesperada eficiencia de MnTCCP

Si se observa en detalle el artículo ya discutido de Faulkner de 1994⁽¹⁸⁾ y después se realiza una búsqueda bibliográfica como la resumida en las tablas 1-3 es al menos sorprendente que tantos investigadores hayan decidido emplear MnTCCP como reactivo antioxidante. Si bien se evidencia cierta actividad SOD in vivo, dado que la cepa de *E. coli* deficiente en SOD crece al doble de velocidad con 37 μM MnTCCP, dicha velocidad es aun la mitad que la lograda con 25 μM de MnTM-4-PyP.

Por otra parte, en prácticamente todos los estudios donde se compara la reactividad de MnTCCP con la de otras porfirinas, se encuentra que es la más lenta para interceptar especies reactivas del oxígeno. La única excepción hasta el momento es la reacción con radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$ ⁽⁸³⁾) pero esa reacción se publicó apenas en 2003 por lo que no podría explicar artículos que pueblan la literatura desde finales de los años 90. La elección de MnTCCP es entonces sorprendente en sí misma, pero también por sus resultados, la mayoría de los ejemplos de protección no son explicables en términos de dismutación de superóxido o de reducción de peroxinitrito, simplemente no hay suficiente porfirina como para interceptar a estas especies reactivas. No hay pues una explicación que vincule la reactividad química conocida de MnTCCP con su actividad biológica. Pero eso es sólo un fragmento de un panorama más amplio, es muy probable que la asignación de la actividad biológica de otras porfirinas de manganeso a la interceptación de superóxido, peroxinitrito, radical carbonato y otras especies reactivas del oxígeno sea sólo una asignación parcial.

Nuestra opinión es que quedan por descubrir eslabones cruciales en el vínculo entre la reactividad y la actividad biológica de las MnPorfirinas y este trabajo intenta abordar ese problema inconcluso para, al menos, angostar la brecha.

Para terminar este apartado, una confesión, como veremos más adelante (pág. 44), cuando comenzamos a estudiar porfirinas de manganeso en nuestro laboratorio, también comenzamos con MnTCCP. Nuestra elección fue hija de la facilidad para obtener este compuesto.

Un modelo de aplicación exitosa

Quizá el ejemplo extremo de utilización de porfirinas de manganeso en una patología es la intervención en el modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Resulta extremo en varios aspectos. En primer término, dicho modelo trata de imitar una fracción pequeñísima de los casos de ELA, la llamada variante hereditaria que expresa una proteína mutante de SOD (G93A). En segundo lugar porque hay evidencia de que la patología de la ELA es concomitante con la sobreproducción de especies reactivas, pero no hay una causalidad implicada, de hecho, los ratones que expresan la SOD humana G93A tienen una actividad SOD aumentada 4 veces⁽⁸⁴⁾ lo que hace sospechar una disminución del superóxido y por ende, no es de esperar *a priori* que las porfirinas de manganeso puedan

atenuarla. En tercer lugar, se han empleado dos porfirinas diferentes con resultados similares, a pesar de que los dos compuestos difieren en reactividad frente a superóxido y peroxinitrito. En un estudio publicado en 2003⁽⁸⁵⁾ se informa que los ratones tratados con FeTCPP desde el momento de la aparición de los síntomas sobreviven en promedio 9 días más (54%) que los no tratados. Este resultado va acompañado de mejoras en el desempeño motor de los ratones y en disminución de índices de oxidación como el contenido de carbonilos proteicos y la formación de proteínas modificadas por malondialdehído. En un trabajo más reciente⁽⁷⁵⁾, el uso de AEOL 10150 (MnTDE-1,3-IP) permite aumentar la supervivencia casi 200% al mismo tiempo que disminuye tanto los marcadores bioquímicos de oxidación como las evidencias de deterioro tisular. A modo de comparación, las constantes catalíticas de dismutación de superóxido son $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para FeTCPP y $6.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para MnTDE-1,3-IP.

La interpretación de datos como estos da para pensar que puede haber una multitud de efectos en juego sólo algunos de los cuales se relacionan con la capacidad de las porfirinas como antioxidantes catalíticos, no obstante lo cual la compañía farmacéutica que posee la patente de MnTDE-1,3-IP ha comenzado un ensayo clínico en Fase I en pacientes con ELA (<http://www.rideforlife.com/archives/001295.html>).

Búsqueda de relaciones causales entre la reactividad y la actividad biológica

En un artículo reciente⁽⁸⁶⁾ se intenta sustentar la hipótesis de que algunas porfirinas de manganeso resultan benéficas debido a su actividad SOD. El diseño experimental es sumamente interesante, veámoslo en resumen. Uno de los grupos de investigación había encontrado que ratones que sobreexpresan MnSOD resisten mejor un modelo de carcinogénesis cutánea en dos etapas. El 78% de los ratones no transgénicos padecieron papilomas (en promedio 2.1 por ratón) mientras que 50% de los ratones que sobreexpresan MnSOD (aproximadamente 200% de actividad) padecieron menos papilomas (en promedio 0.75 papilomas por ratón)⁽⁸⁷⁾. De manera sorprendente, la subexpresión de MnSOD (aproximadamente 50% de la actividad) no afecta la incidencia de papilomas⁽⁸⁸⁾.

Ante esta aparente contradicción, la observación más detallada revela que las células de la piel sometidas al tratamiento de carcinogénesis en dos etapas tienen una fase de apoptosis con un máximo alrededor de las 6 horas después de aplicación del promotor tumoral y una fase de mitosis que comienza después de las 12 horas de la aplicación. Tanto la apoptosis como la mitosis aumentan en los ratones que tienen 50% de actividad SOD, de manera que los efectos se compensan a la hora de evaluar la incidencia de la proliferación. Sin embargo, la diferencia temporal entre las dos fases permite la intervención con actividad SOD exógena en forma de aplicación de MnTE-2-PyP tópico después de la apoptosis pero antes de que comience la mitosis.

Efectivamente, la intervención produce resultados diferentes si la aplicación de MnTE-2-PyP se realiza 30 minutos antes de la promoción tumoral (disminución de 20% en

la incidencia y de 50% en el promedio de papilomas por ratón) respecto a la aplicación 12 horas después de la promoción tumoral (disminución de 51% en la incidencia y de 80% en el promedio de papilomas por ratón).

Este interesantísimo experimento no necesariamente demuestra que la actividad SOD de MnTE-2-PyP es la responsable del efecto, pero la compensación de la falta de MnSOD con el suplemento de MnTE-2-PyP apunta a dos conclusiones importantes:

- a) MnTE-2-PyP logra suplir el defecto de actividad SOD *o contrarrestar efectos ulteriores a la sobreproducción de superóxido.*
- b) Este efecto se aprecia en la mitocondria, dado que la actividad SOD citosólica es constante en este modelo.

¿Cómo diseccionar mejor la conclusión a? Sería necesario contar con una porfirina que difiriera de MnTE-2-PyP **únicamente** en su actividad SOD y realizar de nuevo el experimento. Hemos visto en el prólogo que esperar ese tipo de especificidad en compuestos de bajo peso molecular es esperar demasiado.

Tres visiones sobre la isquemia-reperusión cerebral

Mencionaremos tres artículos que consideramos importantes por sus conclusiones e implicaciones y que emplean modelos de isquemia-reperusión cerebral y evalúan la eficacia de dos porfirinas de manganeso para aliviar el daño neurológico causado. En el primer artículo ⁽⁷³⁾ se emplean ratas a las cuales se les obstruye la arteria cerebral media durante 90 minutos y se les dan 7 días de recuperación. Los animales se tratan con MnTE-2-PyP intracerebroventricular en diferentes tiempos según el grupo de tratamiento, a saber: 60 minutos antes de la isquemia o 5 minutos, 1.5, 6 o 12 horas después de la reperusión. La administración de 300 ng de MnTE-2-PyP en el periodo comprendido entre 1 hora antes de la isquemia y 6 horas después de la reperusión tiene efectos positivos. Se nota la reducción del tamaño del infarto y la protección de la aconitasa mitocondrial. Los autores también hacen experimentos con administración intravenosa de MnTE-2-PyP también con resultados auspiciosos pero los autores mencionan que las cinco cargas positivas de la porfirina de manganeso podrían interferir con la transferencia a través de la barrera hematoencefálica. La interpretación de los resultados del artículo se hace principalmente con base en la capacidad de dismutar el superóxido del complejo, aunque los parámetros bioquímicos estudiados no son necesariamente específicos de superóxido (oxidación de guanina, disminución de actividad aconitasa).

Un punto digno de resaltar se refiere a actividad de enzimas mitocondriales. Los autores miden actividad aconitasa como marcador de superóxido y fumarasa como referencia. Como ya se había observado la actividad aconitasa medida 4 y 10 horas post isquemia es menor que en el hemisferio no isquémico y en ambos casos la enzima se protege por la administración de MnTE-2-PyP. La actividad fumarasa no cambia a las 4 horas pero disminuye a las 10 horas post isquemia y notablemente, esta disminución tardía

se previene con la administración de MnTE-2-PyP. Dado que la fumarasa no se inactiva fácilmente por oxidación los autores interpretan la disminución en esta actividad enzimática como indicio de disfunción mitocondrial generalizada y muerte celular. La protección con MnTE-2-PyP indicaría en este caso que hay mecanismos adicionales a la dismutación de superóxido.

El segundo artículo⁽²⁸⁾ tiene varios puntos de contacto con el primero, sobre todo en lo referente al modelo usado. Las diferencias principales se encuentran en los compuestos usados para tratar la isquemia-reperfusión cerebral (MnTE-2-PyP y MnTDE-1,3-IP), que los animales tratados son casi siempre ratas pero en algunos casos ratones y que se extiende la observación de los efectos del tratamiento a la expresión de proteínas mediante electroforesis bidimensional y a un estudio del transporte de los compuestos desde el hemisferio donde se realiza la inyección al contralateral. Nuevamente se observa protección en forma de disminución del volumen de infarto, del déficit neurológico. El análisis proteómico no es demasiado específico ya que se limita a números de proteínas con expresión atenuada o aumentada y ni siquiera se menciona si las atenuaciones y aumentos son coincidentes o contrapuestos. Alcanza sin embargo para hacer notar que la administración de MnTDE-1,3-IP es capaz de cambiar la expresión de proteínas por sí mismo, independientemente de la isquemia reperfusion. No es evidente que los cambios en la expresión proteica obedezcan a un mecanismo de regulación redox aunque sin duda se trata de una hipótesis plausible.

El tercer artículo⁽⁸⁹⁾ se centra específicamente en la expresión de genes en cerebro de ratón después de isquemia reperfusion con y sin tratamiento con MnTDE-1,3-IP. Se emplea una metodología de microarreglos de genes para observar ARNc a las seis horas después de la isquemia reperfusion. Los resultados de este artículo son poco terminantes, a pesar de que en el título se menciona que el MnTDE-1,3-IP atenúa la expresión de genes inflamatorios se puede ver que sólo hay cambios significativos en la expresión de una de las seis interleucinas buscadas y en tres de las nueve citocinas y sus receptores buscados. No se observan cambios en genes que codifican proteínas antioxidantes ni proteínas de respuesta al estrés por el tratamiento con MnTDE-1,3-IP.

En conjunto, los tres artículos ponen de manifiesto varios aspectos de la intervención con porfirinas de manganeso en la isquemia reperfusion cerebral, podríamos resumirlos como:

- a) Los efectos se observan incluso seis horas después de la reperfusion.
- b) Hay protección de blancos (fumarasa) cuya inactivación no es directa por especies reactivas del oxígeno.
- c) Hay cambios en la expresión de genes y proteínas sin que sean muy evidentes las relaciones ni el mecanismo de acción.
- d) Los efectos observados no necesariamente están vinculados con la dismutación de superóxido.

- e) Dos compuestos muy similares en reactividad así como en carga eléctrica y liofilia se comportan de manera similar en los modelos estudiados, excepto por una toxicidad marcadamente mayor del MnTE-2-PyP.

Muy recientemente se ha propuesto una alternativa a la administración de porfirinas de manganeso para atenuar los efectos de la isquemia reperusión⁽⁹⁰⁾, pero nos atrevemos a pronosticar que habrá pocos voluntarios para la intervención propuesta.

Mejor un caso

De vez en cuando resulta gratificante ver que se pueden publicar artículos en los que alguna molécula no tiene el maravilloso efecto esperado, dichos resultados llamados peyorativamente “negativos” son escasos en la literatura, aunque ciertamente no en la investigación científica. La tendencia de publicar principalmente los “éxitos” puede llegar a dificultar una interpretación global de (por ejemplo) la acción de un fármaco, donde los “fracasos” también son importantes. En un artículo reciente⁽⁹¹⁾ se describe un modelo de traumatismo de cráneo sin fractura en ratones, su efecto sobre marcadores de motricidad (tiempo de permanencia en rotarod), lesión neuronal (tinción con Fluoro-Jade) e inactivación de aconitasa mitocondrial. Los ratones tratados con 3 o 6 mg/kg IV de MnTE-2-PyP no tienen diferencias significativas respecto a los inyectados con PBS. Los autores interpretan esta ausencia de efectos por la aparente dificultad que tiene el MnTE-2-PyP para atravesar la barrera hematoencefálica, pero no presentan experimentos para sustentar su interpretación.

En resumen

Para concluir esta sección nos gustaría hacer explícito que existen numerosos modelos de aplicación exitosa de porfirinas de manganeso, principalmente para la atenuación de los efectos nocivos en modelos de estrés oxidativo agudo. La mayoría de estos efectos se han atribuido a la actividad SOD, a alguna otra propiedad “antioxidante catalítica” y esta atribución suele hacerse de manera vaga y apresurada. Los efectos encontrados se corresponden poco o nada con la reactividad conocida de los compuestos y en contadísimos casos existe alguna comparación donde dicha reactividad sea la variable de comparación de resultados. Falta un vínculo, existe una brecha entre la reactividad *in vitro* y la actividad *in vivo* de las porfirinas de manganeso y esta tesis tiene entre sus objetivos acercar un poco esos dos extremos mediante la acumulación de datos en el extremo de la reactividad. No debemos soslayar, sin embargo, que será prácticamente imposible encontrar una relación causa-efecto lineal para la influencia de una molécula con reactividad múltiple en un sistema complejo. Nos queda entonces, acumular causas probables y tratar de separar los efectos encontrados con una dosis generosa de humildad.

Química y bioquímica (brevísimas) de peroxinitrito

Nuestro equipo de investigación⁽⁹²⁻⁹⁵⁾ y varios otros⁽⁹⁶⁻⁹⁹⁾ han revisado los avances en el conocimiento de la química y la bioquímica del peroxinitrito desde su redescubrimiento dentro de la bioquímica en 1990⁽¹⁰⁰⁾. A raíz de la superabundancia de fuentes secundarias de información al respecto, haré aquí un resumen mínimo de las reacciones más importantes que determinan el destino y los efectos del peroxinitrito.

Origen del peroxinitrito

La vía de formación de peroxinitrito en que todos los investigadores concuerdan es la reacción de superóxido con óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). Es una reacción muy rápida entre dos radicales, su constante de velocidad se ha determinado por diversos métodos y ha llevado a discusiones extensas, nuestro grupo considera que el valor de $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ es el más adecuado⁽¹⁰¹⁾.

Hablamos ya acerca del superóxido (ver la página 19) así que aprovecharemos aquí para mencionar brevemente al óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). Este precursor fue descubierto por sus efectos y finalmente identificado a principios de los años 90. Existe una familia de enzimas llamadas sintasas de óxido nítrico que catalizan la oxidación de arginina para producir óxido nítrico y citrulina. Esta reacción es la principal responsable de la formación de $\cdot\text{NO}$ *in vivo* y está cuidadosamente regulada dadas las funciones de este radical en la vasodilatación, la agregación plaquetaria, la neurotransmisión y la respuesta inmunitaria.

La naturaleza de los dos reactivos que dan lugar al ONOO^- ($\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$) difiere en cuanto a sus posibilidades de atravesar membranas lipídicas, de tal suerte que el superóxido está prácticamente recluido en su sitio de formación, mientras que el $\cdot\text{NO}$ puede pasar de un compartimiento celular a otro sin mayor impedimento. La implicación es que el sitio de formación de ONOO^- coincidirá en general con el sitio de formación de superóxido.

Destinos del peroxinitrito

Se ha escrito mucho y se ha discutido hasta el cansancio acerca del destino del peroxinitrito “solo” en un amortiguador de fosfato, aun cuando dicha situación no se parece demasiado a ninguna situación biológicamente relevante, dado que la “ausencia de blancos” es una situación artificial. No obstante, dado que es relevante para la planificación de experimentos, es necesario recordar que el peroxinitrito se protona con un pK_a de 6.8 y el ácido conjugado (ONOOH) se descompone por homólisis del enlace $\text{O}-\text{O}$ y produce los

radicales $\cdot\text{OH}$ y NO_2 en una jaula de disolvente. Aproximadamente el 30% de los radicales difunden hacia fuera de la jaula y el resto se recombina dentro de ella para producir nitrato y H^+ . La constante de velocidad de esta reacción de homólisis (5 s^{-1} a 37°C) indica que es suficiente rápida como para complicar el diseño de algunos experimentos, pero suficientemente lenta como para no competir con las reacciones del ONOO^- *in vivo*.

El repertorio de reactividad del peroxinitrito con biomoléculas es suficientemente limitado como para que lo pongamos aquí en tres incisos, con la pertinente aclaración de que se hace referencia sólo a las reacciones directas del sistema peroxinitrito/peroxinitroso y no a reacciones posteriores de productos de estas reacciones directas.

Reacción con ácidos de Lewis

El ONOO^- es, por supuesto, una base de Lewis y reacciona con algunos ácidos de Lewis disponibles en sistemas biológicos. Entre ellos los más importantes son el dióxido de carbono y los iones hierro de hemoproteínas. La reacción de formación del aducto de Lewis en general produce la ruptura de enlace peróxido.

La reacción con CO_2 fue caracterizada cinéticamente en 1995⁽¹⁰²⁾ y sus productos se hicieron evidentes en 1999⁽¹⁰³⁾, a grandes rasgos, la reacción es moderadamente rápida ($k = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1(104)}$) y se propone que produce un aducto de vida corta que se descompone a radicales ($\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$) en una jaula de disolvente, de los cuales un 35% se libera a la solución, mientras que el resto se recombina para dar CO_2 y NO_3^- .

La reacción con CO_2 se vuelve relevante dada la elevada concentración de CO_2 , resulta conveniente tener a esta reacción como una referencia cinética para comparar las demás vías de desaparición de peroxinitrito, sean vías fisiológicas o ayudadas por la presencia de inactivadores. Considerando una concentración de CO_2 de 1.3 mM, la constante aparente de desaparición de ONOO^- por causa del CO_2 es aproximadamente 60 s^{-1} a 37°C y $\text{pH} = 7.4$, esto es unas 60 veces más rápido que la desaparición de ONOO^- por protonación y homólisis.

La reacción con el hierro de hemoproteínas es mucho más diversa, por la sencilla razón de que las hemoproteínas son muy diversas y no queremos aquí cometer la distorsión de la generalización. Un trabajo pionero caracterizó la reacción de ONOO^- con diversas hemoperoxidasas en 1993⁽¹⁰⁵⁾ y encontró constantes de velocidad diferentes para diferentes proteínas. Desde entonces la reacción con hemoproteínas ha sido un tema recurrente en el estudio del peroxinitrito, en la Tabla 4 se presentan algunos ejemplos de constantes de velocidad.

Tabla 4. Reacciones de peroxinitrito con algunas hemoproteínas

Hemoproteína	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	condiciones	Referencia
Mieloperoxidasa	2 x 10 ⁷	12°C independiente de pH	(105)
Peroxidasa de rábano	3.2 x 10 ⁶	25°C independiente de pH	(105)
Lactoperoxidasa	3.3 x 10 ⁵	25°C, pH 7.4	(105)
Citocromo c	2.3 x 10 ⁵	25°C independiente de pH	(106)
Metamioglobina	1.4 x 10 ⁴	20°C pH 7.4	(107)
Oxihemoglobina	1 x 10 ⁴	25°C, pH 7.4	(108)
Catalasa	No detectable		(105)

Las constantes de velocidad que aparecen en la Tabla 4 denotan la variabilidad de la reacción entre ONOO⁻ y el grupo hemo, al menos respecto a la velocidad de la reacción. No se ve en la tabla, pero los productos de las reacciones también son diferentes, mieloperoxidasa, lactoperoxidasa y citocromo c (Fe^{II}) se oxidan por un electrón y liberan dióxido de nitrógeno^(105,106,109), la peroxidasa de rábano se oxida por dos electrones⁽¹⁰⁵⁾ y libera nitrito, mientras que oxihemoglobina y metamioglobina producen nitrato con⁽¹⁰⁸⁾ o sin⁽¹⁰⁷⁾ oxidación evidente del hierro.

La eficiencia de las hemoproteínas como blancos de reacción del peroxinitrito es relativa. Si bien algunas constantes de velocidad son muy grandes, las proteínas están localizadas en compartimientos específicos, lo que transforma a sus reacciones con peroxinitrito en eventos de importancia local.

Una de las consecuencias más estudiadas de la reacción de peroxinitrito con ácidos de Lewis es la reacción de nitración de tirosina y de aromáticos en general. Hablando estrictamente, la nitración **NO** es una reacción **directa** del peroxinitrito y el peroxinitrito **NO** nitra tirosina (directamente). Lo que sí puede observarse es la formación de 3-nitrotirosina como consecuencia de la formación previa de peroxinitrito y eso ha dado lugar a la idea de observar y cuantificar la 3-nitrotirosina como un producto estable que evidencia la formación previa de peroxinitrito.

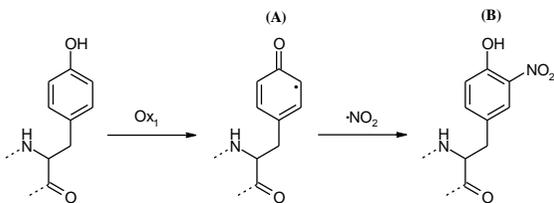


Figura 3. Esquema de la reacción de nitración de tirosina. Si la nitración está precedida por ONOO⁻ el primer oxidante Ox₁ es normalmente el producto de la reacción de ONOO⁻ con algunos ácidos de Lewis (AL, por ejemplo, H⁺, CO₂ o Mn^{III}Porfirina) seguida por la homólisis del aducto para dar un oxidante fuerte (Ox₁ = ·OH, CO₃·⁻ o O=Mn^{IV}Porfirina, respectivamente). El radical tirosilo (A) formado puede a su vez reaccionar con el ·NO₂ que es el otro radical formado en la homólisis para formar 3-nitrotirosina (B).

La nitración de aromáticos precedida por peroxinitrito siempre implica la reacción entre el ONOO⁻ y un ácido de Lewis (por ejemplo, H⁺, CO₂ o Mn^{III}Porfirina) a consecuencia de la cual se forma un oxidante

fuerte (Ox₁: ·OH, CO₃·⁻ o O=Mn^{IV}Porfirina respectivamente) y ·NO₂ de manera que la reacción proporciona los dos reactivos necesarios para la formación de nitroaromático. Es importante notar que la tirosina no tiene parte en la primera reacción y que la nitración es sólo una de las múltiples reacciones posibles entre los radicales formados y por ende la reacción tiene productos múltiples y rendimientos de difícil interpretación. En la Figura 3 se presenta la secuencia de reacciones más simple que puede originar la formación de nitrotirosina. Es importante recalcar una vez más que el esquema presentado en la Figura 3 no representa un esquema general y se han omitido múltiples reacciones adicionales. Este y otros aspectos de la nitración de tirosina y el posible involucramiento del ONOO⁻ se abordan en detalle en una revisión reciente⁽¹¹⁰⁾.

Reacciones con el grupo tiol

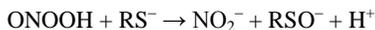
La primera reacción caracterizada entre ONOO⁻ y una biomolécula fue la reacción con cisteína⁽¹¹¹⁾, durante varios años se consideró que los tioles intra y extracelulares eran los principales reductores del peroxinitrito formado *in vivo*. No obstante, las constantes de velocidad relativamente pequeñas ($k < 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para los tioles más abundantes como cisteína, glutatión o albúmina (Cys 34) hacían difícil esta consideración, sobre todo a la luz de la reacción con dióxido de carbono antes mencionada. Se podría pensar que durante todo el siglo pasado el peroxinitrito fue un oxidante biológico sin un mecanismo conocido de reducción *in vivo*, lo que explica en parte el gran impulso que tuvo el desarrollo de inactivadores sintéticos en los años 90 (esta tesis es un pequeño producto de dicho impulso).

En el año 2000, meses antes del cambio de siglo se publica por primera vez un mecanismo enzimático de reducción para el peroxinitrito: al menos⁽¹¹²⁾ *S. typhimurium*, *M. tuberculosis* y *H. pylori* estaban protegidas del oxidante por peroxidasas dependientes de tioles llamadas peroxirredoxinas. No tardaron en aparecer nuevas peroxirredoxinas con elevadas constantes de velocidad de reacción con peroxinitrito, hasta el momento las que están publicadas aparecen en la Tabla 5.

Tabla 5 Constantes de velocidad de reacción de peroxirredoxinas con peroxinitrito

Peroxirredoxina	Especie	k (M⁻¹ s⁻¹)	Referencia
AhpC	<i>S. typhimurium</i>	1.5×10^6	(112)
AhpC	<i>M. tuberculosis</i>	1.3×10^6	(112)
AhpC	<i>H. pylori</i>	1.2×10^6	(112)
TPx	<i>M. tuberculosis</i>	1.3×10^6	(113)
TXNPx	<i>T. brucei</i>	9×10^5	(114)
TXNPx	<i>T. cruzi</i>	7×10^5	(114)
PRDX5	<i>H. sapiens</i>	7×10^7	(115)
TPx1	<i>P. falciparum</i>	1×10^6	(116)
cTPxI	<i>S. cerevisiae</i>	5.3×10^6	(117)
cTPxII	<i>S. cerevisiae</i>	3.9×10^6	(117)

La reacción de peroxinitrito con tioles (RSH) sucede aparentemente entre el ácido peroxinitroso y el tiolato⁽¹¹⁸⁾:



Debido a la selectividad de las especies ácido/base respecto a su reactividad, la reacción siempre es dependiente del pH y la constante de velocidad observada tiene un máximo a mitad de camino entre los pKa del peroxinitrito y el tiol. Por otra parte, la reactividad “intrínseca” o independiente del pH del grupo tiolato parece disminuir junto con su basicidad de Brønsted, de la misma manera que disminuye su potencial redox. Del trabajo de Trujillo y Radí⁽¹¹⁸⁾ hemos extraído la parte sombreada de la **Tabla 6**, y con esos resultados especularemos un poco más acerca de esta reacción. Hemos agregado a la tabla las fracciones de ONOOH y RS⁻ presentes a pH 7.4 (columnas 3 y 5) para calcular rápidamente la constante independiente del pH en la columna final. Además, agregamos cuatro datos⁽¹¹⁷⁻¹¹⁹⁾ acerca de tioles de proteínas algunos de los cuales son especialmente reactivos.

Tabla 6 Constantes de velocidad de reacción de tioles con peroxinitrito y su relación con el pKa del tiol

Tiol	pH	[ONOOH] [ONOOH] _T	pKa _{SH}	[RS ⁻] [RSH] _T	k _{2nd} (M ⁻¹ s ⁻¹ , 37°C)	k _{2nd} pH indep (M ⁻¹ s ⁻¹ , 37°C)
Cisteína etil éster	7.4	0.1368	6.6	0.8632	6830	5.78 x 10 ⁴
Cisteína metil éster	7.4	0.1368	6.7	0.8337	7120	6.24 x 10 ⁴
Penicilamina	7.4	0.1368	7.9	0.2403	6420	19.5 x 10 ⁴
Cisteína	7.4	0.1368	8.3	0.1118	4500	29.4 x 10 ⁴
Glutatión	7.4	0.1368	8.8	0.0383	1360	26 x 10 ⁴
Homocisteína	7.4	0.1368	8.9	0.0307	700	16.7 x 10 ⁴
N-Acetilcisteína	7.4	0.1368	9.5	0.0079	415	38.5 x 10 ⁴
Dihidrolipoato	7.4	0.1368	10.7	5.01x 10 ⁻⁴	250	365 x 10 ⁴
HSA-SH	7.4	0.1368	8.3	0.1118	3800	24.8 x 10 ⁴
GAPDH	7.4	0.1368	7.5	0.44269	2.5 x 10 ^{5*}	413 x 10 ^{4*}
AhpC	6.6	0.2847	5	0.99603	1.5 x 10 ^{6**}	529 x 10 ^{4**}
cTPxI	7.4	0.1368	5.4	0.99099	7.4 x 10 ^{5*}	530 x 10 ^{4*}
cTPxII	7.4	0.1368	6.3	0.92641	5.1 x 10 ^{5*}	390 x 10 ^{4*}

* 25 °C

** T amb

Entre los tioles de bajo peso molecular, e incluso con la albúmina (HSA) se nota una ligera tendencia hacia una mayor constante al aumentar el pKa del par RSH/RS⁻ (ver la Figura 4), es decir, una mayor basicidad del tiolato parece favorecer la reactividad con el ONOOH evidenciada en k_{2nd} (independiente de pH).

Si aproximamos la tendencia a una recta obtenemos una pendiente de aproximadamente 0.4. El otro factor que influye sobre la constante observable (o dependiente de pH) a pH neutro es la concentración efectiva de RS⁻ y esa varía con una pendiente de 1 (un orden de magnitud por unidad de pH). De manera que el factor de concentración tiene mayor influencia y hace que las constantes observadas a pH neutro para tiolatos más básicos sean menores ya que la diferencia pKa_{SH} - pKa_{ONOO⁻} es grande.

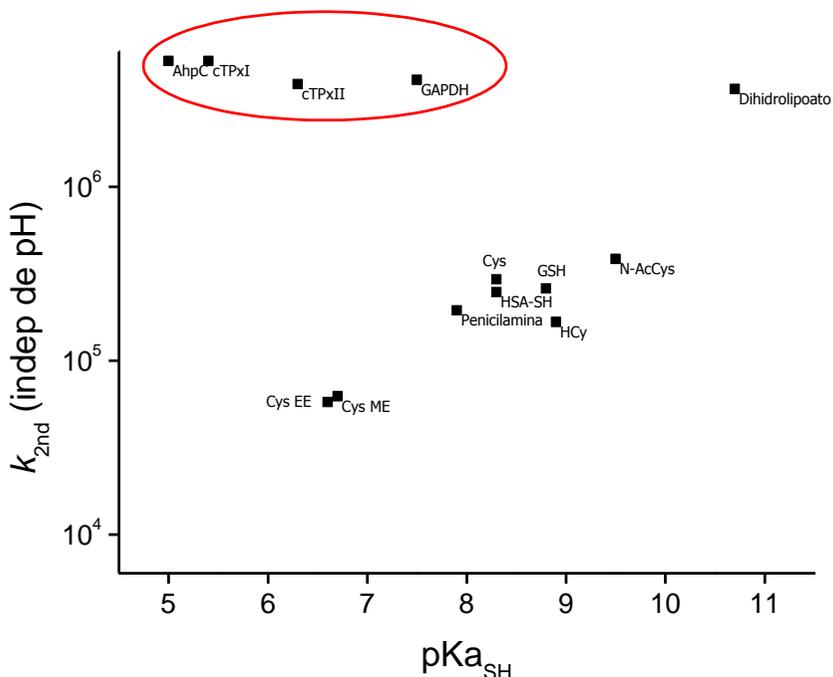


Figura 4. Constantes de velocidad de reacción de peroxinitrito con tioles de diferente pKa.

Podemos pensar que si la ventaja evolutiva radica en una reacción rápida entre el tiolato y el ácido peroxinitroso para tener una peroxinitrito reductasa eficiente, la presión evolutiva seleccionará tioles cuya reactividad intrínseca sea independiente de la basicidad del tiolato y que a la vez se encuentren en concentración alta a pH neutro (es decir, tengan un $pK_{aSH} < 7$). Es decir, en los tioles particularmente reactivos de peroxirredoxinas y otras enzimas se ha separado la reactividad frente al peroxinitrito de la acidez de Brønsted como resulta evidente en la Figura 4. Aún no sabemos en qué propiedad electrónica consiste esa reactividad magnificada ante ONOOH y quizá valga la pena dedicarse a buscarla.

Reacciones con selenoproteínas

A raíz de la determinación de una elevada constante de velocidad para la reacción de un compuesto sintético llamado Ebselen con $ONOO^{-}$ ⁽¹²⁰⁾ se inició la búsqueda de biomoléculas que también contuvieran selenio y que reaccionaran rápidamente con peroxinitrito. En términos cinéticos, la única biomolécula digna de mención es la glutatión peroxidasa cuya constante de velocidad es $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $\text{pH} = 7.4$ y 25°C ⁽¹²¹⁾. Otros

compuestos con selenio y selenoproteínas se mencionan a menudo en relación con la protección frente a peroxinitrito, pero los datos que se presentan son de protección de blancos en reacciones complejas, por ejemplo, hidroxilación de benzoato y nitración de proteínas⁽¹²²⁾ u oxidación de dihidrorrodamina 123⁽¹²³⁾. Curiosamente, la cinética de la reacción entre selenocisteína y peroxinitrito no se ha caracterizado en la literatura.

Regresando a la glutatión peroxidasa, además de reaccionar muy rápido con peroxinitrito en una reacción de dos electrones, la forma reducida de la enzima se recupera por la reacción con glutatión, de forma que la enzima puede funcionar con peroxinitrito como sustrato y podría constituir una defensa antioxidante catalítica, si no fuera por la concentración limitada de la proteína.

La mayor parte del peroxinitrito se inactiva

Si consideramos los conocimientos que se tienen hasta la fecha respecto a la cinética de reacciones de peroxinitrito con biomoléculas podemos establecer *grosso modo* un mapa de la reactividad y los blancos factibles para este oxidante. Eso es lo que intentamos hacer en la Tabla 7. Para facilitar las comparaciones hemos extrapolado la velocidad de todas las reacciones a 37°C cuando los datos disponibles están a otra temperatura. Dividimos los blancos de peroxinitrito en tres categorías,

- los que redirigen hacia otro oxidante fuerte;
- los que inactivan al peroxinitrito;
- los que se pueden considerar blancos críticos o difíciles de reemplazar

Tabla 7 Patrones de reactividad del peroxinitrito con biomoléculas en términos de constantes de velocidad de reacción.

	Blanco	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	Conc. (μM)	k _{ap} (s ⁻¹) (37°C)	Observación	Resultado	Ref
REDIRECCIÓN	CO ₂	4.6 x 10 ⁴	1,300	60	ubiuco	CO ₃ ⁻ y ·NO ₂ (35%) CO ₂ y NO ₃ ⁻ (65%)	(124)
	Mieloperoxidasa	4.6 x 10 ⁷ⁿ	500	23,000	en neutrófilos	Compuesto II de la peroxidasa	(105)
INACTIVACIÓN	Hemoglobina	2.3 x 10 ⁴ⁿ	5,000	115	sólo en eritrocitos	Isomerización a nitrato	(125)
	Glutati6n peroxidasa	1.8 x 10 ⁷ⁿ	2	36	calculado para hepatocitos	Reducci6n catalítica a nitrito	(121)
	Peroxirredoxina 5	1.6 x 10 ⁸ⁿ	> 1	>160	ubiuco intracelular	Reducci6n catalítica a nitrito	(115)
	TXNPx	8 x 10 ⁵	250	200	en tripanosomátidos	Reducci6n a nitrito	(114)
	Glutati6n	1.4 x 10 ³	5,000	7	ubiuco intracelular	Reducci6n a nitrito	(126)
DAÑO	Aconitasa	1.4 x 10 ⁵	20	2.8	mitocondria	Inactivaci6n	(127)
	MnSOD	1 x 10 ⁵	20	2.0	mitocondria	Inactivaci6n	(128)

*Valores extrapolados a 37°C suponiendo un aumento de 2.3 veces cada 12°C

Una comparaci6n de los valores de k_{ap} , es decir, la constante de velocidad aparente de desaparici6n de ONOO⁻ con esa concentraci6n de blanco, permite observar que para blancos como la mieloperoxidasa la competencia es imposible, aunque se trata de un blanco de distribuci6n restringida a algunos tipos celulares y sus alrededores. El di6xido de carbono puede tomarse como un blanco ubiuco referente y se ve que biomoléculas “protectoras” o inactivadoras del peroxinitrito pueden competir bien con él en espacios intracelulares, las peroxirredoxinas parecen ser las moléculas que se encargan de la mayor parte del peroxinitrito. Finalmente, hemos incluido en la tabla dos enzimas mitocondriales que podrían llegar a evidenciar el daño causado por ONOO⁻, resulta claro que su reactividad es uno o dos órdenes de magnitud menor que la de los inactivadores y por ende se encuentran bien protegidas siempre y cuando los mecanismos de inactivaci6n funcionen correctamente.

Inactivadores de peroxinitrito

Dado que esta tesis se ocupa de la caracterización de una serie de inactivadores sintéticos de peroxinitrito es conveniente mencionar antes de terminar la introducción otras familias de moléculas que también se han caracterizado como inactivadores de peroxinitrito.

Se han presentado en la literatura algunas porfirinas de hierro que podrían catalizar la isomerización de peroxinitrito para producir nitrato además de llevar a cabo un ciclo redox análogo al que se presenta en la Figura 8 (pág. 49), estos compuestos se han caracterizado cinéticamente⁽¹²⁹⁾ y aplicado en modelos de patología relacionada con el estrés oxidativo⁽¹³⁰⁻¹³²⁾.

Otro abordaje a la inactivación de peroxinitrito emplea un compuesto de selenio llamado Ebselen que ya hemos mencionado. Este compuesto reduce el peroxinitrito a nitrito y el ciclo catalítico se completa usando al glutatión como reductor. La reacción de este compuesto con peroxinitrito también se ha caracterizado cinéticamente⁽¹²⁰⁾ y también se ha empleado en modelos de patología⁽¹³³⁻¹³⁵⁾.

Dado el conocimiento actual sobre los inactivadores biológicos de peroxinitrito que comprende principalmente compuestos con grupos tiol especialmente reactivos, cabe esperar que los esfuerzos en la biomimética se enfoquen en el futuro hacia el diseño de tioles y ditiolos capaces de reducir rápidamente al peroxinitrito. Para esto, no obstante, se hace imperativo comprender en términos electrónicos qué significa “especialmente reactivos”, como ya se mencionó en la página 38.

Un enfoque alternativo consiste en el empleo de compuestos diseñados para interceptar los precursores del peroxinitrito, en esta categoría caben los modelos funcionales de SOD, entre los cuales los más exitosos contienen manganeso y diversos ligandos⁽¹³⁶⁻¹³⁸⁾.

Otra línea de pensamiento, ha consistido en sintetizar algunos compuestos con características de reductores biológicos, como coenzima Q o α -tocoferol también con trifenílfosfonio. Este catión atraviesa fácilmente las membranas biológicas dado su carácter relativamente hidrófobo y se acumula a favor del potencial electroquímico en la matriz mitocondrial, lo cual dirigiría los antioxidantes hacia donde posiblemente son más necesarios⁽¹³⁹⁻¹⁴¹⁾. No se trata, en este caso, de inactivadores de peroxinitrito ni de superóxido sino de antioxidantes en un sentido amplio, los resultados obtenidos en modelos animales son auspiciosos e incluso uno de los compuestos está en pruebas de fase II contra la enfermedad de Parkinson. También se ha explorado la posibilidad de conjugar el grupo director trifenílfosfonio con Ebselen para generar una “peroxidasa sintética” dirigida a la mitocondria⁽¹⁴²⁾. La misma estrategia se ha empleado para sintetizar nitróxidos que contienen un grupo trifenílfosfonio que les facilitaría el acceso y la acumulación en la matriz mitocondrial^(143,144) donde podrían realizar la dismutación de superóxido.

Muy recientemente se han informado de una serie de porfirinas de manganeso similares a MnTM-4-PyP conjugadas con diversos sustituyentes a fin de dirigir su

capacidad de antioxidante catalítico hacia el interior de la célula⁽¹⁴⁵⁾, al interior de la mitocondria⁽¹⁴⁶⁾ o con el objetivo de asociarla a otra actividad catalítica antioxidante⁽¹⁴⁷⁾. Los resultados de los efectos en modelos de estrés oxidativo son aún muy preliminares.

La lista completa de antioxidantes sintéticos y naturales caracterizados y marginalmente relacionados con el peroxinitrito es extensa y excede el ámbito de esta tesis.

Resultados

Los resultados centrales de esta tesis se presentan en los trabajos publicados que se irán intercalando en el texto. El texto adicional de este capítulo los reúne con algunos resultados no publicados e hipótesis, y pretende, sobre todo, a dar un hilo conductor a la lectura de los artículos.

Experimentos liminares y el trabajo 0

Oxidación de MnTCPP

Antes de comenzar el trabajo de tesis propiamente dicho recibimos una muestra de MnTCPP de parte de Homero Rubbo que por entonces estaba en la Universidad de Alabama en Birmingham. Era la segunda mitad de los años noventa, cuando quedaba mucho por explorar de la reactividad de peroxinitrito, así que hicimos algunos experimentos que se pueden reinterpretar en perspectiva y revelan algunas propiedades de MnTCPP y del peroxinitrito que hemos utilizado *a posteriori*. Uno de estos experimentos intentaba determinar la estequiometría de la reacción de MnTCPP con ONOO^- a pH alcalino para evitar la isomerización a nitrato.

La estequiometría obtenida fue incorrecta dado que no consideramos los cambios espectrales resultantes del pH alcalino, estos cambios son evidentes en las diferencias entre el espectro de la izquierda y de la derecha (Figura 5). A pesar de esto, pudimos obtener dos datos importantes de este experimento:

1. La porfirina reacciona muy rápidamente con ONOO^-
2. La porfirina tiene un espectro dependiente del pH que se podría usar para estudiar sus propiedades ácido base.

Independientemente del resultado erróneo que obtuvimos para la estequiometría, la posibilidad de observar la reacción entre ONOO^- y MnTCPP, y sobre todo del producto de reacción fue un primer paso en la comprensión de dicha reacción.

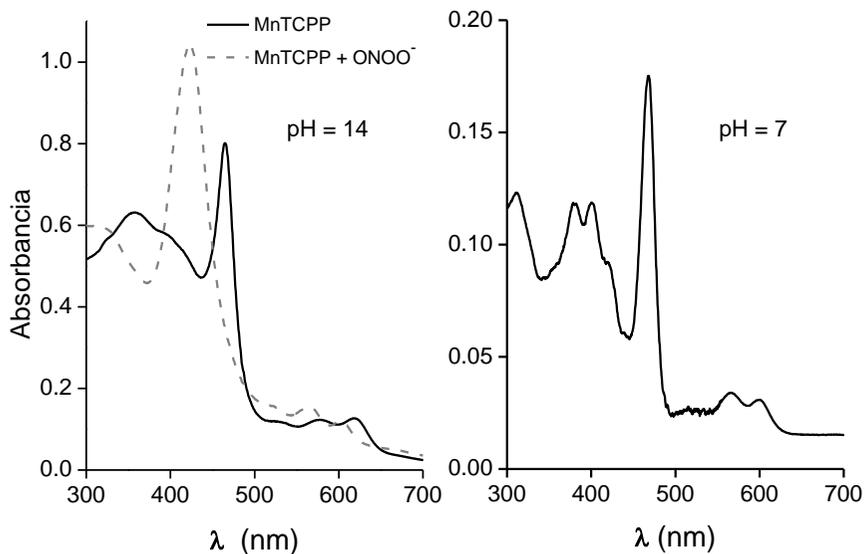


Figura 5. Espectros de MnTCPP y MnTCPP oxidado con ONOO⁻

Izquierda espectros obtenidos a pH = 14. Derecha, espectro obtenido a pH neutro. Las concentraciones no son iguales en los dos experimentos.

Primeros intentos en la cinética

Nuestro primer intento de acercarnos a la estequiometría fue fallido, poco dudará entonces el lector si le decimos que el primer abordaje de la cinética también fue un fracaso. Las razones de estos primeros experimentos erróneos son históricas, la costumbre en el laboratorio era hacer reaccionar al ONOO⁻ con un blanco en exceso en condiciones de pseudo primer orden y seguir la reacción a 302 nm. Esas condiciones son muy difíciles de alcanzar con MnPorfirinas ya que su absorbancia en todo el intervalo ultravioleta y visible impide usar concentraciones elevadas mientras que si se usan concentraciones muy pequeñas resulta difícil observar el cambio de absorbancia debido al ONOO⁻. Cuando hicimos un experimento con peroxinitrito en exceso y MnTCPP en concentraciones micromolares encontramos comportamientos complejos y muy dependientes de la longitud de onda estudiada. Afortunadamente, la forma más sencilla de estudiar las constantes de velocidad de MnPorfirinas con ONOO⁻, estaba ya publicada⁽¹⁰⁵⁾ y fue la que aplicamos posteriormente.

Nitración de aromáticos

El trabajo 0 que aparece como un anexo al final de la tesis incluye algunos de los datos de nitración de 4-hidroxifenilacetato (4-HPA) con MnTCPP. Dicha publicación fue incluida a pesar de ser previa al inicio de la tesis por la relevancia que tuvo la reacción de nitración en la generación de ideas acerca de la catálisis de la reducción de peroxinitrito. La idea de probar la nitración, provino de una nota al pie en un trabajo del grupo de Groves ⁽⁶⁾, donde se lee:

Nitration was initiated by the addition of ONOO⁻ or HSO₅⁻ (0.5 – 1 mM) to a mixture of the metalloporphyrin (2.5 – 25 μM) and HPA (1 mM) in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.4). The NO₂⁻ concentrations in the HSO₅⁻ system were varied between 1 and 100 mM with MnTMPyP 10 μM, resulting in HPA–NO₂ (8 – 60% yields). In the ONOO⁻ system, yields of HPA–NO₂ were between 30% and 60%, depending on the MnTMPyP concentration.

Después de ver esos datos, abordamos la reacción de nitración con MnTCPP como catalizador y una parte de los resultados aparece en la figura 6 del trabajo 0. Hicimos también experimentos de nitración con otras MnPorfirinas que no se publicaron pero que pueden servir aquí como indicios para plantear la primera hipótesis de esta tesis. En la **Figura 6** se muestran los resultados de nitración de 4-HPA con tres MnPorfirinas.

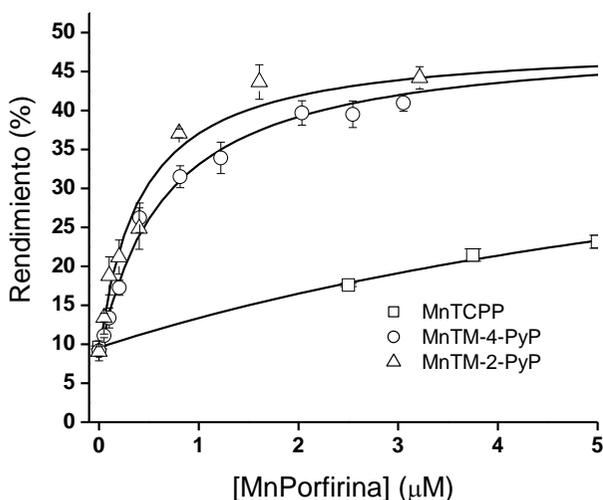


Figura 6. Rendimientos de nitración de 4-HPA con ONOO⁻ catalizada por diferentes MnPorfirinas. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: amortiguador fosfato 50 mM, temperatura ambiente, 4-HPA 5 mM, los rendimientos se calcularon a partir de la concentración inicial de ONOO⁻.

MnPorfirina	[ONOO ⁻] ₀
MnTCPP*	0.79 mM
MnTM-4-PyP	0.49 mM
MnTM-2-PyP	0.48 mM

Resultados del ajuste hiperbólico a los datos de rendimiento:

MnPorfirina	Rend ₀ (%)	ΔRend _{máx} (%)	C ₅₀
MnTCPP	9.6 ± 1.5	40 ± 4.7	10 ± 2.9
MnTM-4-PyP	8.6 ± 1.2	41 ± 1.8	0.67 ± 0.12
MnTM-2-PyP	9.3 ± 1.3	39 ± 1.7	0.42 ± 0.07

* La gráfica completa para MnTCPP aparece como la Fig 6 del trabajo 0.

Se puede ver en la Figura 6 y su tabla anexa que los parámetros de los rendimientos de nitración son esencialmente iguales para los tres complejos, excepto en lo referente a C₅₀, es decir, la concentración que causa el 50% del aumento en el rendimiento. Veremos más adelante que la disminución de C₅₀ se relaciona con la reactividad del complejo frente a ONOO⁻.

Por ese tiempo comenzábamos a encontrar ejemplos en nuestro laboratorio de que la afirmación de que el 4-HPA es un “buen modelo” para la reactividad de la tirosina no pasaba de ser una *distorsión de la distancia* (cfr. prólogo), además de constatar una y otra vez que la nitración por peroxinitrito es una reacción compleja y con resultados casi siempre difíciles de interpretar. Eso no obstó para que empleáramos nuestro nuevo sistema de catálisis de nitración a la tirosina, con un nuevo resultado sorprendente que se muestra en la Figura 7.

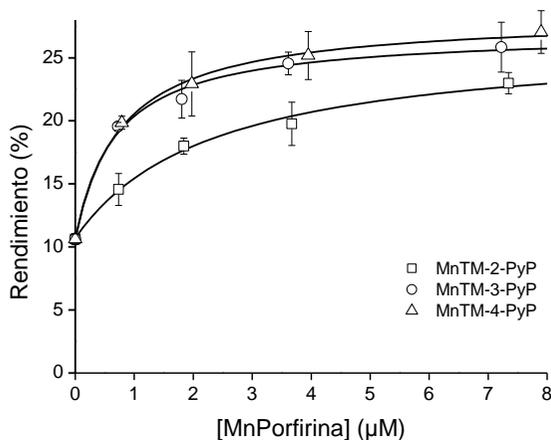


Figura 7. Rendimientos de nitración de tirosina con ONOO^- catalizada por diferentes MnPorfirinas. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: amortiguador fosfato 50 mM, temperatura ambiente, tirosina 1 mM, $[\text{ONOO}^-]_0 = 0.43$ mM, pH 7.47. Los rendimientos se calcularon a partir de la concentración inicial de ONOO^- .

Resultados del ajuste hiperbólico a los datos de rendimiento:

MnPorfirina	Rend ₀ (%)	$\Delta\text{Rend}_{\text{máx}}$ (%)	C_{50}
MnTM-2-PyP	10.7 ± 0.5	15.8 ± 1.4	2.3 ± 0.6
MnTM-3-PyP	10.7 ± 0.6	16.3 ± 0.9	0.69 ± 0.13
MnTM-4-PyP	10.7 ± 0.6	17.6 ± 0.9	0.78 ± 0.14

En este caso la tendencia antes observada para C_{50} se invierte, la porfirina más reactiva ante el ONOO^- es la que tiene un C_{50} mayor, es decir, hay variables no consideradas entre el primer y el segundo experimento de nitración. No entra en los objetivos de esta tesis discutir en detalle la catálisis de la nitración de aromáticos, pero sí pretendemos dar pie a la presentación de la primera hipótesis de trabajo a partir de dicha catálisis.

Dado que observamos tendencias en la nitración de 4-HPA que dependen marcadamente de la reactividad de la porfirina frente al ONOO^- y tendencias de la nitración de aromáticos que dependen marcadamente de la identidad del blanco, podemos plantear la siguiente hipótesis:

SE PUEDE CATALIZAR LA REDUCCIÓN DE PEROXINITRITO CON PORFIRINAS DE MANGANESO DE TAL SUERTE QUE LA VELOCIDAD GLOBAL DE LA REACCIÓN DEPENDERÁ DE LA VELOCIDAD DE OXIDACIÓN DE LA PORFIRINA Y DE LA VELOCIDAD DE OXIDACIÓN DEL SEGUNDO REDUCTOR.

De esta hipótesis se desprende que para obtener un buen catalizador de la reducción de ONOO^- es necesario evaluar tanto la velocidad de la reacción entre peroxinitrito y

MnPorfirina como la velocidad entre la porfirina oxidada y diferentes reductores, ya que esta segunda reacción es la que indicará la redirección de la oxidación por peroxinitrito.

La hipótesis aparece en forma esquemática en la Figura 8.

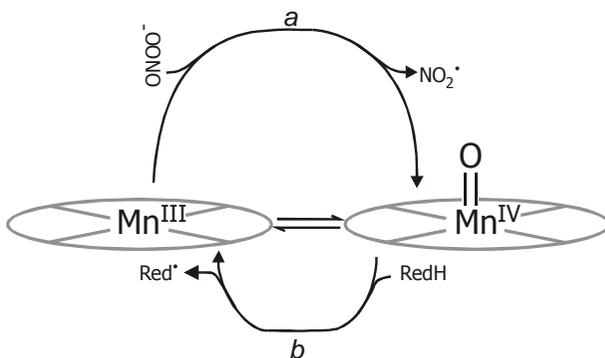


Figura 8. Esquema de reacciones para la catálisis de reducción de peroxinitrito.

Primer intento por estudiar la catálisis

A partir de nuestra primera hipótesis e ignorantes de la publicación del trabajo⁽¹⁴⁸⁾ nos dispusimos a estudiarla a finales de 1997, hacía falta elegir un reductor y la elección evidente en ese momento era glutatión por varias razones. Conocíamos bastante bien la cinética de su reacción con peroxinitrito, tiene fama de ser el reductor intracelular más abundante y resulta medianamente sencillo trabajar con él en soluciones amortiguadas a pH neutro.

El primer diseño de catálisis intentaba detectar una aceleración en la reducción de ONOO⁻ por GSH al aumentar la concentración de MnTCPP. Las condiciones de experimentales eran 37°C, pH = 7.4, [ONOO⁻]₀ = 200 μM, [GSH]₀ = 2.5 a 20 mM y [MnTCPP]₀ = 0 a 2.8 μM. Ignorábamos por entonces los valores de las constantes de velocidad para las reacciones a y b de la Figura 8, pero las concentraciones elegidas parecían adecuadas para detectar a un buen catalizador. Los resultados de este experimento nunca se publicaron y aparecen en la Figura 9.

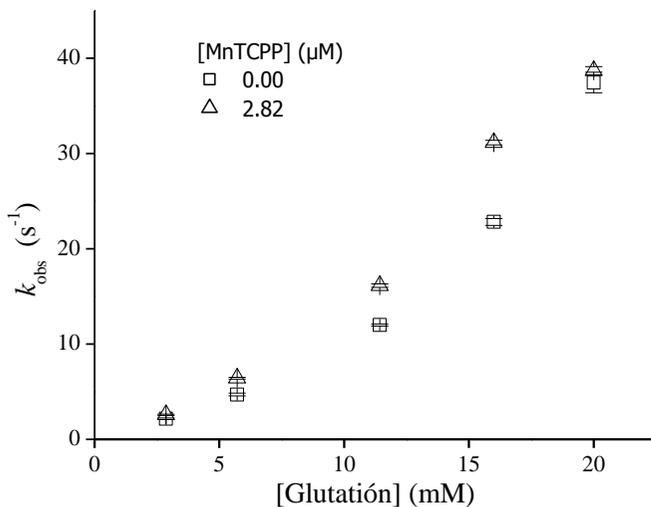


Figura 9. Reacci3n de glutati3n con ONOO^- en ausencia y presencia de MnTCCP. $\text{pH} = 7.4$ y $37\text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{ONOO}^-]_0 = 200\text{ }\mu\text{M}$.

Se aprecia un muy t3mido aumento en la constante observada por la inclusi3n de $2.8\text{ }\mu\text{M}$ de MnTCCP. Flaco catalizador, aunque, como veremos m3s adelante, los resultados obtenidos son correctos.

Trabajo 1. Un estudio más ordenado de la catálisis

Ferrer-Sueta, G., I. Batinić-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): 442-9

Thus, the scavenger should react with peroxynitrite faster than does CO_2 and/or scavenge ONOOCO_2^- as well.

Hacia el final de 1997 comenzamos a colaborar con la Dra. Ines Batinić-Haberle quien no sólo nos proveyó de nuevas porfirinas, sino que fue un estímulo constante a la inventiva y el ansia de descubrimiento a través de su incesante correspondencia. Los primeros compuestos que envié, en diciembre de 1997 fueron tres isómeros de posición de MnTMPyP que son los compuestos centrales del Trabajo 1.

El Trabajo 1 debe poder leerse en forma autónoma, así que aquí solo se incluirá un resumen general antes del trabajo mismo y algunos resultados que no aparecieron en la revista después.

La idea central del Trabajo 1 fue determinar en forma independiente las constantes de velocidad de las reacciones α y β de la Figura 8. Para ello se perfeccionó la técnica para estudiar la reacción entre MnPorfirina y ONOO^- en exceso de este último y se eligieron cuatro reductores: ascorbato (para entonces ya sabíamos de su eficiencia⁽¹⁴⁸⁾), glutatión (nuestro reductor intracelular favorito), ácido úrico (un importante reductor extracelular) y tirosina (para comprender mejor la catálisis de nitración que habíamos estudiado previamente). Intentamos también caracterizar un sistema de catálisis completa donde observar la desaparición del ONOO^- en presencia de reductor y catalizador. Esto último no fue del todo posible dado que se observaron reacciones laterales e interferencia en los métodos de seguimiento de las reacciones.

Como se indica en el epígrafe, nuestro objetivo era caracterizar la cinética de inactivadores de peroxinitrito capaces de superar la velocidad de la reacción con dióxido de carbono y así redirigir la capacidad oxidante hacia las preferencias de reactividad de los complejos MnPorfirina oxidados.

Catalytic Scavenging of Peroxynitrite by Isomeric Mn(III) *N*-Methylpyridylporphyrins in the Presence of Reductants

Gerardo Ferrer-Sueta,[†] Ines Batinić-Haberle,[‡] Ivan Spasojević,[§]
Irwin Fridovich,[¶] and Rafael Radi*^{||}

Unidad Asociada Enzimología and Departamento de Fisiología Biológica, Facultad de Ciencias, and Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay, Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710, and Department of Chemistry, Duke University, Durham, North Carolina 27708

Received November 9, 1998

Three isomers of manganese(III) 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridyl)porphyrin (MnTMPyP) were evaluated for their reaction with peroxynitrite. The Mn(III) complexes reacted with peroxynitrite anion with rate constants of 1.85×10^7 , 3.82×10^6 , and $4.33 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 37 °C for MnTM-2-PyP, MnTM-3-PyP, and MnTM-4-PyP, respectively, to yield the corresponding oxo-Mn(IV) complexes. Throughout the pH range from 5 to 8.5, MnTM-2-PyP reacted 5-fold faster than the other two isomers. The oxo-Mn(IV) complexes could in turn be reduced by glutathione, ascorbate, urate, or oxidize tyrosine. The rate constants for the reduction of the oxo-Mn(IV) complexes ranged from $> 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for ascorbate to 10^3 – $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for tyrosine and glutathione. Cyclic voltammetry experiments show that there is no significant difference in the $E_{1/2}$ of the Mn(IV)/Mn(III) couple; thus, the differential reactivity of the three isomeric complexes is interpreted in terms of electrostatic and steric effects. Micromolar concentrations of MnTM-2-PyP compete well with millimolar CO_2 at reacting with ONOO⁻, and it can even scavenge a fraction of the ONOOCO₂⁻ that is formed. By being rapidly oxidized by ONOO⁻ and ONOOCO₂⁻ and reduced by antioxidants such as ascorbate, urate, and glutathione, these manganese porphyrins, and especially MnTM-2-PyP, can redirect the oxidative potential of peroxynitrite toward natural antioxidants, thus protecting more critical targets such as proteins and nucleic acids.

Introduction

Peroxynitrite¹ is a powerful oxidant that can be formed *in vivo* by the reaction of superoxide radical with nitrogen monoxide. Peroxynitrite has been shown to react with all classes of biomolecules, including lipids (1), proteins (2), DNA (3), and low molecular weight antioxidants (4–6). The oxidative chemistry of peroxynitrite in biological systems depends on the availability of targets (7), but the most serious risks posed by this oxidant are the inactivation of enzymes (2, 8, 9), lipid peroxidation and membrane disruption (1), DNA modification (10), and nitration of protein Tyr residues (11). Some of these deleterious activities of peroxynitrite are driven by its rapid reaction with CO_2 ($k = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 37 °C; 12, 13) which yields 1-carboxylato-2-nitrosodioxidane

(ONOOCO₂⁻), another powerful oxidizing and nitrating agent especially able to promote one-electron oxidations (16, 17).

Protection against peroxynitrite-mediated oxidations in biological systems can be partially provided by low-molecular weight antioxidants such as glutathione (6), ascorbate (9), and uric acid (18). However, these molecules react too slowly with peroxynitrite to prevent ONOOCO₂⁻ formation (7) given the ubiquity of CO_2 and its high concentration (1–2 nM in human tissues). Thus, in searching for a proficient scavenger of peroxynitrite, one should consider the reaction with carbon dioxide. Thus, the scavenger should react with peroxynitrite faster than does CO_2 and/or scavenge ONOOCO₂⁻ as well.

It was recently (19, 20) reported that two iron porphyrins accelerate peroxynitrite isomerization to nitrate with catalytic constants on the order of 10^5 – $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Such an activity is highly desirable as it would transform peroxynitrite in a much less toxic species. Nevertheless, competition calculations predict that such a "peroxynitrite isomerase" at 30–100 μM would be needed to inhibit only half of the ONOOCO₂⁻ formation in the presence of 1 nM carbon dioxide. Such levels of these iron porphyrins would result in toxicity (21, 22). While these iron porphyrins have proven to be beneficial in

* To whom correspondence should be addressed. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Av. Carl Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay. Fax: (5982) 9249563. E-mail: radi@fmed.edu.uy

[†] Unidad Asociada Enzimología and Departamento de Fisiología Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

[‡] Department of Biochemistry, Duke University Medical Center.

[§] Department of Chemistry, Duke University.

[¶] Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

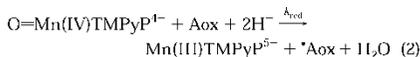
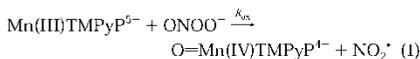
The term peroxynitrite is used to refer to both peroxynitrite anion (ONOO⁻) and peroxynitrous acid (ONOOH). The IUPAC-recommended names are oxoperoxonitrate(1⁻) and hydrogen oxoperoxonitrate, respectively.

Scavenging of ONOO⁻ Catalyzed by Mn Porphyrins

Chem. Res. Toxicol., Vol. 12, No. 5, 1999 443

vivo models of acute inflammation (23) and in cellular culture experiments (24), the mechanism of peroxynitrite detoxification by these complexes has recently been reported to include the redox cycling of the iron center using biological reductants as well as peroxynitrite isomerization (20).

Another approach to the scavenging of peroxynitrite is based on the fast oxidation of some selenium compounds such as ebselen (25) and glutathione peroxidase (26) that can be reduced back to the original compound by glutathione. Another example is the catalytic action of a Mn(III) 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4'-yl)porphyrin (MnTM-4-PyP)⁺ that accelerates the reaction of ONOO⁻ with antioxidants (Aox) such as ascorbate, glutathione, and Trolox (27, 28) according to the following catalytic cycle:



The catalytic constants for MnTM-4-PyP, as reported by Lee et al., range from 1 to $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (27, 28) which are not sufficiently fast to outcompete, at micromolar concentrations, the reaction of ONOO⁻ with CO₂. Furthermore, MnTM-4-PyP is also able to intercalate into DNA and cause strand breaks (27), given its planar structure.

Because of the structure-reactivity relationships found in the catalytic dismutation of superoxide (29), and the relative inability of MnTM-2-PyP to intercalate into nucleic acids (21, 29), we compared the activities of the three isomeric Mn porphyrins in catalyzing the reduction of peroxynitrite by antioxidants such as ascorbate, glutathione, and urate. Tyr was also studied as a reductant as it has been previously reported that Mn porphyrin complexes can catalyze the nitration of phenols by peroxynitrite (22, 30).

Experimental Procedures

Chemicals. Isomeric MnTMPyPs were synthesized as previously described (29). We used the complexes listed in Table 1. Peroxynitrite was synthesized from hydrogen peroxide and sodium nitrite in acidic solution (3, 31); the extent of nitrite contamination in our preparations was typically 50% of the concentration of peroxynitrite.

1-Ascorbic acid, potassium urate, glutathione, L-tyrosine, potassium peroxymonosulfate (OXONE), phosphate, and inorganic salts were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Perchloric acid was from Fluka (Buchs, Switzerland). Bovine erythrocyte Cu-Zn superoxide dismutase (Cu-Zn SOD) was obtained from DDI Pharmaceuticals, Inc. (Mountain View, CA) and had a specific activity of ~3000 units/mg (28).

Assays. Urate was identified by its absorbance at 292 nm at pH 9.4 in carbonate buffer ($\epsilon_{292} = 12\,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (32). Ascorbate was identified by reduction of dichlorophenolindophenol at pH 7.4 followed at 600 nm ($\epsilon = 22\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (33). Glutathione was quantified by Ellman's method (34). The Tyr

Table 1. Complexes That Were Used

Complex	R—	λ_{Soret} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
MnTM-2-PyP		453.4	129 000
MnTM-3-PyP		459.8	138 000
MnTM-4-PyP		462.2	130 000

concentration was determined from its absorbance at 274.5 nm in 0.1 M HCl ($\epsilon = 1340 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (35). Peroxymonosulfate was identified by iodide oxidation in 1 mM HClO₄ at 353 and 287.5 nm ($\epsilon_{353} = 26\,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{287.5} = 40\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (36). Peroxynitrite was quantified at 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

All spectrophotometric determinations were performed on a Milton Roy 3000 diode array spectrophotometer.

Kinetics. All kinetic runs were performed in an Applied Photophysics SF17 MV, stopped flow spectrofluorimeter.

Oxidation of Mn(III) porphyrins with peroxynitrite was carried out under pseudo-first-order conditions with peroxynitrite in excess over the manganese porphyrin. In all cases, peroxynitrite (dissolved in a known solution of NaOH) was mixed with the Mn porphyrin dissolved in an acidic phosphate buffer from which CO₂ was eliminated by boiling and purging with argon. The Mn porphyrin concentration was between 1 and 2 μM , and peroxynitrite was in excess by at least 15 fold. The final phosphate concentration was in all experiments 50 mM ($T = 37 \pm 0.1^\circ \text{C}$), and the pH was measured at the outlet of the stopped flow apparatus. Conditions were set so that the observed rate constant of Mn porphyrin oxidation was always more than 10 times larger than the known rate constant of the proton-catalyzed decay of peroxynitrite at that pH. The second-order rate constants were also determined under pseudo first order conditions with Mn porphyrin (3–18 μM) in excess by 10-fold over peroxynitrite at pH 7.4.

For the oxidation of Mn(III) porphyrins with peroxynitrite in the presence of CO₂, the complexes were dissolved in buffer containing a known concentration of total carbonate; this solution was mixed in the stopped flow apparatus with ONOO⁻ dissolved in dilute NaOH. Initial concentrations of both ONOO⁻ and Mn porphyrins were 5 μM , and the initial CO₂ concentration ranged from 0 to 2 mM.

Reduction of O=Mn(IV) porphyrins (1–7 μM) was carried out under pseudo first order conditions with the reductants in excess over the porphyrin. Mn(IV) porphyrins were prepared immediately before the stopped flow experiment by mixing with

⁴ Abbreviations: MnTMPyP, manganese(III) 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridyl)porphyrin, with charges omitted for simplicity; Cu-Zn SOD, bovine erythrocyte Cu-Zn superoxide dismutase; GS, glutathione; GS[•], glutathione thyl radical; GS(SG)[•], glutathione disulfide radical anion; CV, cyclic voltammetry.

approximately 0.9 equiv of potassium peroxymonosulfate. Under these conditions, all peroxymonosulfate is consumed to yield initially Mn(V) that decays rapidly to Mn(IV) (37); this Mn(IV) porphyrin solution decayed with a $t_{1/2}$ of >10 min (not shown).

MnTMPyP-catalyzed reduction of peroxyxynitrite was performed under conditions that prevented or minimized the spectral interference presented by each reductant to the detection of peroxyxynitrite decay. In every case, the reductant was mixed with the porphyrin immediately before the experiment directly in the stopped-flow syringe. Glutathione was used in a 15–100 fold excess over peroxyxynitrite, and the reaction was followed at 302 nm. For ascorbate, the reaction was monitored at 320 nm with ascorbate concentrations ranging from equimolar to 20 fold excess with respect to peroxyxynitrite. Tyr was used in a 5-fold excess over ONOO $^-$, and detection was performed at 430 nm to follow the nitration of Tyr (38). Rate oxidation was followed at an equimolar concentration (80 μ M) at 292 nm.

Computer simulations of the kinetic systems were performed using GEPASI v3.1 (39, 40).

Cyclic Voltammetry. Measurements were taken using a CH Instruments model 600 voltammetric analyzer and a three-electrode CV experimental setup. The working electrode was a button glassy carbon electrode (3 mm diameter, Bioanalytical Systems). The reference electrode was a standard Ag/AgCl electrode (Bioanalytical Systems, 3 M NaCl gel filling solution), and the auxiliary electrode was a 0.5 mm platinum wire. Prior to each measurement, the working electrode was cleaned with 0.3 μ M alumina, rinsed with a stream of distilled water, wiped with tissue paper, and immersed in 2.5 mL of the solution containing 0.05 M phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 M NaCl, and 0.5 mM Mn porphyrin. When needed, a NaOH solution (1 M) was used to adjust the pH to 11. Humidified ultrapure argon (<1 ppm oxygen) was purged through the solution for 30 min prior to each measurement. The scan rate was 100 mV/s, and the voltammograms were obtained by scanning the potential from the most positive to the most negative values and back, typically in the region of 0.6 to -0.6 V versus the Ag/AgCl electrode. The potentials were standardized against the potassium ferricyanide/ferricyanide couple. The redox potentials that are reported were calculated as a midpoint value of the potentials at the peaks of the cathodic and the anodic voltammetric waves; i.e., $E_{1/2} = (E_{pc} + E_{pa})/2$. Control experiments were performed using the metal free porphyrin at pH 7.8 and 11, and in the region of 0.2–0.9 V, no redox chemistry occurred.

Results

Oxidation of Mn(III) Porphyrins by Peroxyxynitrite. The reaction of Mn(III)TMPyP with peroxyxynitrite is a one electron redox process yielding O=Mn(IV)TMPyP and NO $_2^-$. Mn(V) could not be detected in neutral or alkaline (pH 14) solution by stopped-flow diode-array spectrophotometry. Control experiments were performed with peroxyxynitrite as an oxidant known to yield Mn(V) (37) and with mixtures of SO $_3^{2-}$ and nitrite to rule out the possible interference of NO $_2^-$ in Mn(V) detection.

Kinetic traces of manganese porphyrin reactions with excess peroxyxynitrite display a biphasic pattern when measured at the wavelength of the Soret peak (Table 1): a first-order descent, followed by a slow recovery of the initial absorbance (Figure 1A).

The initial part was used to determine the rate constant for the oxidation of the complexes. Under these conditions, the peroxyxynitrite concentration (measured at 302 nm) was not significantly diminished during the reaction, ensuring pseudo-first-order kinetics (Figure 1A). The observed rate constants were plotted versus peroxyxynitrite concentration to obtain the second-order rate constant (k_{ox}) at a given pH. Figure 1B shows that at

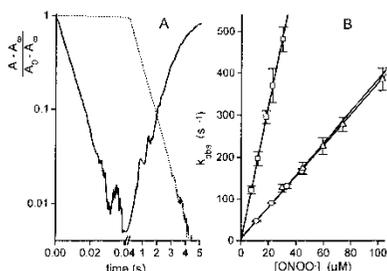


Figure 1. (A) Time course of the reaction of MnTM-4-PyP with peroxyxynitrite (150 μ M) was mixed with MnTM-4-PyP (1.9 μ M) at 37 $^{\circ}$ C, and the reaction was followed at 462.2 (solid line) and 302 nm (dotted line). (B) Second-order plots for the reaction of peroxyxynitrite with Mn porphyrins: (□) MnTM-2-PyP at pH 7.46 ($k_{ox} = 1.6 \times 10^7$ M $^{-1}$ s $^{-1}$, $r = 0.9998$), (○) MnTM-3-PyP at pH 7.3 ($k_{ox} = 3.8 \times 10^6$ M $^{-1}$ s $^{-1}$, $r = 0.9988$), and (Δ) MnTM-4-PyP at pH 7.46 ($k_{ox} = 3.7 \times 10^6$ M $^{-1}$ s $^{-1}$, $r = 0.9991$).

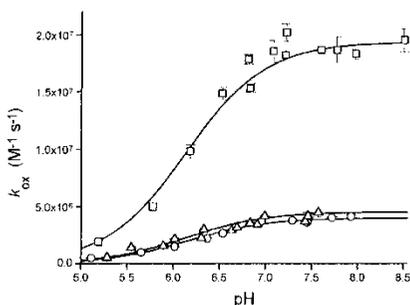


Figure 2. pH dependence of the second order rate constant for the reaction of peroxyxynitrite with Mn porphyrins at 37 $^{\circ}$ C: (□) MnTM-2-PyP, where $k_{ox} = (1.95 \pm 0.02) \times 10^7$ M $^{-1}$ s $^{-1}$, and $pK_a = 6.13 \pm 0.05$; (○) MnTM-3-PyP, where $k_{ox} = (4.05 \pm 0.20) \times 10^6$ M $^{-1}$ s $^{-1}$, and $pK_a = 6.17 \pm 0.05$; and (Δ) MnTM-4-PyP, where $k_{ox} = (4.58 \pm 0.21) \times 10^6$ M $^{-1}$ s $^{-1}$, and $pK_a = 6.15 \pm 0.09$.

pH 7.4 ± 0.1 , MnTM-2-PyP reacts around 5 times faster than the other two isomers.

Experiments carried out at pH 7.4 under pseudo-first-order conditions with a 10-fold excess of MnTMPyP over peroxyxynitrite (not shown) yielded identical second order rate constants.

The second-order rate constant was determined as a function of pH in the range of 5–8.5 (Figure 2). At pH >7 , k_{ox} reaches maximal values, displaying an inflection point at pH ≈ 6.15 , and drops significantly in more acidic solutions. This behavior is consistent with Mn(III) porphyrins reacting fast with ONOO $^-$, and much more slowly or not at all with ONOOH. Again, MnTM-2-PyP reacts faster than its isomers with peroxyxynitrite throughout the pH range that was studied.

The rate of oxidation of Mn(II) could not be determined accurately at acidic pH (<5) since the oxidized form [oxo-Mn(IV)] becomes more readily reducible (presumably by NO $_2^-$) and interferes with the kinetic determination.

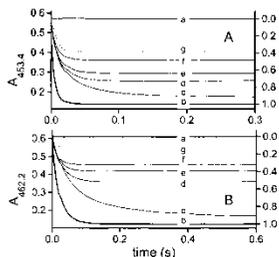


Figure 3. Time course of peroxynitrite-mediated oxidation of Mn porphyrins in the presence of CO₂ at 37 °C. (A) MnTM-2-PyP (5 μM) was exposed to phosphate buffer (a) and to 15 μM ONOO⁻ (b), and oxidation by 5 μM ONOO⁻ (c) in the presence of 0.5 (d), 1 (e), and 2 mM CO₂ (f). Computer simulation of the reaction in the presence of 2 mM CO₂ (g). The right axis represents the fraction of peroxynitrite reduced by MnTM-2-PyP. (B) Equivalent experiments and simulation with MnTM-4-PyP.

The pH profiles of k_{ox}' were fitted to the following equation:

$$k_{ox}' = k_{ox} \left(\frac{K_n}{K_n + [H^+]} \right)$$

where k_{ox} is the second-order rate constant for the reaction between ONOO⁻ and the Mn(III) porphyrin and K_n is an ionization constant presumably associated with the ionization of ONOOH as it is very similar for all three complexes that were studied. In the nonlinear regression, the rate constants for the reactions of ONOOH with MnTMPyP were assumed to be zero.

Oxidation of Mn(III) Porphyrins by Peroxynitrite and CO₂. Carbon dioxide competes with Mn(III) porphyrins for reacting with ONOO⁻. This is shown in Figure 3 where a lower yield of Mn(IV) and a shorter lifetime of ONOO⁻ are observed with increasing concentrations of CO₂. We ran control experiments without and with a 3 fold excess of ONOO⁻ to measure the absorbance change produced by the complete oxidation of Mn(III). In agreement with the kinetic measurements, MnTM-2-PyP was the best scavenger. MnTM-2-PyP intercepted around 50% of the peroxynitrite-related oxidants in the presence of 2 mM CO₂ (Figure 3A), whereas MnTM-4-PyP (Figure 3B) and MnTM-3-PyP (not shown) intercepted only about 30%. A computer simulation was employed to estimate the yield of the reaction. The only reactions considered in the simulation were those of ONOO⁻ with MnTMPyP and CO₂ (12). The simulation results in a yield of manganese oxidation (Figure 3, dotted lines) that is lower than that experimentally observed. This suggests a reaction between ONOOCO₂⁻ and the reduced porphyrin.

Reduction of Oxo-Mn(IV) Porphyrins. Kinetic traces of oxo-Mn(IV) porphyrins reacting with excess reductants followed first-order decays as shown in Figure 4 (traces b and c). Two exceptions were found. Thus, the reactions of O=Mn(IV)TM-2-PyP with urate (Figure 4a) and ascorbate (not shown) were biphasic, and two first order rate constants can be obtained by fitting the traces

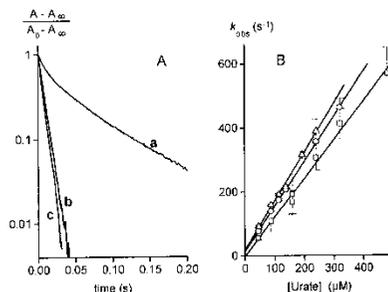


Figure 4. (A) Time course for the reduction of O=Mn(IV)TMPyP by urate at 37 °C: (a) O=Mn(IV)TM-4-PyP, (b) O=Mn(IV)TM-3-PyP, and (c) O=Mn(IV)TM-2-PyP. (B) Second-order plots for the reduction of O=Mn(IV)TMPyP with urate: (□) O=Mn(IV)TM-2-PyP, where $k_{red} = (1.22 \pm 0.05) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; (○) O=Mn(IV)TM-3-PyP, where $k_{red} = (1.42 \pm 0.01) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; and (Δ) O=Mn(IV)TM-4-PyP, where $k_{red} = (1.53 \pm 0.05) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

to a double-exponential function. However, we only report the rate constant for the faster reaction.

The observed rate constants were plotted versus antioxidant concentration to obtain second-order rate constants (k_{red}). Figure 4 shows such plots obtained at pH 7.48 for the three O=Mn(IV)TMPyP isomers reacting with urate. In Table 2, we present the k_{red} values for the reduction of O=Mn(IV)TMPyP with the four reductants that were used. Something to notice from these values is that k_{red} is always lower for MnTM-2-PyP than for the other two isomers, which in turn are very similar to each other.

The reduction of O=Mn(IV)TMPyP isomers with ascorbate is very fast in all cases ($>3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), approaching the upper detection limit of the stopped-flow technique. With urate, the reduction is also quite fast for O=Mn(IV)TM-3-PyP and O=Mn(IV)TM-4-PyP ($\approx 1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

The constants for reactions with glutathione and Tyr are in the range of 10^3 – $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Table 2). It should be noted that the k_{red} of O=Mn(IV)TM-4-PyP with glutathione determined herein ($6.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 37 °C) is lower than the one previously reported by Lee et al. ($1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25 °C) (27, 28). However, in those studies, equivalent concentrations of oxo-Mn(IV) and glutathione were used and the data analyzed by second order analysis. That is reportedly complicated by the difficulty of attaining exactly equal concentrations of reactants (4), especially when working with a transient system. Thus, our result, obtained under pseudo-first-order conditions, may be more reliable and is consistent with the rate constants found for O=Mn(IV)TM-2-PyP and O=Mn(IV)TM-3-PyP reacting with glutathione.

Catalytic Reduction of Peroxynitrite. The rate of reduction of peroxynitrite by ascorbate and glutathione is greatly enhanced by the presence of micromolar concentrations of MnTMPyP (Figure 5A). The time courses displayed first-order behavior. When using glutathione as a reductant in excess, the reduction of oxo-Mn(IV) back to Mn(III) interfered with the final part of

Table 2. Second Order Rate Constants for the Oxidation and Reduction of MnTMPyP at 37 °C

complex	k_{ox} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^a	k_{red} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^b			
		urate	ascorbate	tyrosine	glutathione
MnTM-2-PyP	1.85×10^7	$(1.22 \pm 0.05) \times 10^6$	$(3.5 \pm 0.1) \times 10^7$	$(4.94 \pm 0.06) \times 10^7$	$(4.21 \pm 0.11) \times 10^4$
MnTM-3-PyP	3.82×10^6	$(1.42 \pm 0.01) \times 10^6$	$(5.2 \pm 0.1) \times 10^7$	$(4.83 \pm 0.03) \times 10^7$	$(5.34 \pm 0.08) \times 10^3$
MnTM-4-PyP	4.33×10^6	$(1.53 \pm 0.05) \times 10^6$	$(3.5 \pm 0.1) \times 10^7$	$(6.54 \pm 0.11) \times 10^4$	$(6.77 \pm 0.18) \times 10^3$

^a Interpolated values at pH 7.4. ^b Values at pH 7.4 ± 0.1.

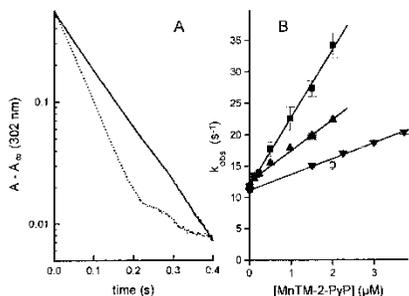


Figure 5. (A) Time course of the reaction of peroxynitrite with glutathione: (solid line) no catalyst added and (dotted line) 1.45 μ M MnTM-2-PyP. [GSH] = 7.7 mM; [ONOO⁻]₀ = 410 μ M, with 50 mM phosphate buffer at pH 7.42 and 37 °C. (B) Second order plots for the reduction of peroxynitrite by glutathione (7.7 mM) catalyzed by MnTM-2-PyP. The peroxynitrite initial concentrations were 410 (\blacktriangledown), 270 (\blacktriangle), 72 (\blacksquare), and 72 μ M in the presence of 200 units/mL SOD (\square).

the reaction (Figure 5A, dotted line). A linear dependence was observed between the rate constants for peroxynitrite decay and MnTM-2-PyP concentration under these conditions. However, the slope of these lines depended on the concentration of peroxynitrite and the reductant (Figure 5B), indicating that no simple catalytic constant can be obtained from these experiments.

The reaction between urate and peroxynitrite is also catalyzed by Mn porphyrins; in this case, increases both in the yield of urate oxidation and in the rate were observed under second order conditions at 292 nm (not shown).

The reaction of peroxynitrite with Tyr is more complex. Under uncatalyzed conditions, the peroxynitrite decay rate is independent of Tyr concentration and is very similar to the rate of nitrotyrosine formation (42). In the presence of Mn porphyrins, the decay of peroxynitrite cannot be observed directly since there are at least four species absorbing at 302 nm and reacting at different rates. Thus, we observed the reaction indirectly through the appearance of nitrotyrosine at 430 nm (not shown) as previously done for nitrotryptophan (43). Both the nitration yield and rate were augmented with MnTMPyP micromolar concentrations. The reaction profiles in the presence of catalyst exhibit an initial steep increase (in a few milliseconds) in A_{430} , followed by a slower increase and a final descent which is attributed to the reduction of the MnTMPyP once the peroxynitrite is exhausted. Though complicated by the absorption of both reduced and oxidized catalysts, the time of the maximum absorbance can be understood as the time of peroxynitrite consumption.

Cyclic Voltammetry. For all three isomers of MnTMPyP at pH 7.8, reversible CVs were obtained at half-

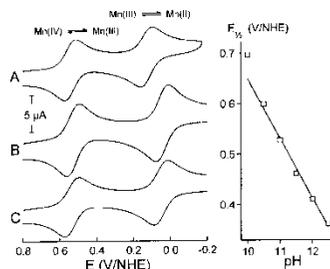


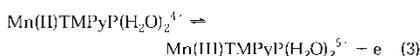
Figure 6. (Left) Cyclic voltammetry of isomeric MnTMPyP in phosphate buffer at pH 11, with a scan rate of 100 mV/s using a glassy carbon electrode: MnTM-2-PyP (A), MnTM-3-PyP (B), and MnTM-4-PyP (C). (Right) pH dependence of the $E_{1/2}$ of the Mn(IV)/Mn(III) couple of MnTM-3-PyP.

Table 3. Half-Wave Potentials for MnTMPyP^a

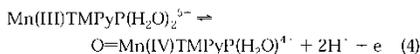
isomer	O=Mn(IV) - e = Mn(III) Mn(III) + e = Mn(II)		
	pH 11	pH 11	pH 7.8 ^b
MnTM-2-PyP	540	126	220
MnTM-3-PyP	526	42	52
MnTM-4-PyP	532	50	60

^a Values in millivolts vs the NHE. ^b From ref. 30.

wave potentials already reported (29). They correspond to the simple one electron redox process:



However, in aqueous medium, the oxo-Mn(IV) state can only be accessed through a proton-dependent redox process:



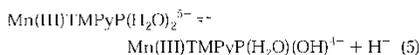
It is expected that such a reaction will be thermodynamically favored in basic solutions. Indeed, in the case of the MnTM-3-PyP as the pH was increased above 7.8, we observed the appearance of a cathodic wave at pH 9.0. At pH \geq 10, we obtained quasi-reversible and reversible CVs from which meaningful $E_{1/2}$ values could be obtained (Figure 6). The Nernst equation, applied to a two-proton, one electron redox reaction, predicts a change of the redox potential by -118 mV/pH unit (44). The value we obtained from our $E_{1/2}$ versus pH data is -118.4 mV/pH unit (Figure 6, right panel), in accordance with a two-proton, one-electron process (eq 4).

As shown in Table 3, there is also a slight shift in $E_{1/2}$ toward negative potentials for the Mn(III)/Mn(II) couple with an increase in pH. This potential shift is related to

Scavenging of ONOO⁻ Catalyzed by Mn Porphyrins

Chem. Res. Toxicol., Vol. 12, No. 5, 1999 447

the proton dissociation equilibrium:

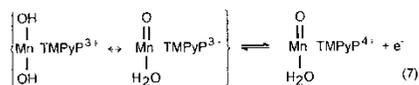
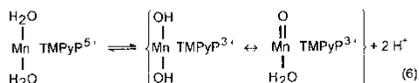


Namely, at higher pHs, the CVs obtained are admixtures of voltammograms of aquo and monohydroxo species of MnTMPyP. On the basis of the observations described herein (Figure 6 and data not shown) and elsewhere,³ we may estimate the $pK_a(\text{Mn(III)-2-PyP})$ to be ~ 10.5 , and $pK_a(\text{Mn(III)-3-PyP})$ and $pK_a(\text{Mn(III)-4-PyP})$ to be ~ 12.5 .

Figure 6 (left) shows the CVs of all three isomers of MnTMPyP, at pH 11. The Mn(III)/Mn(II) couple of the MnTM-2-PyP is at a significantly more positive potential than is the case for both MnTM-3-PyP and MnTM-4-PyP. However, because of a higher concentration of the monohydroxo species at a given pH (lower pK_a), the apparent voltammogram of MnTM-2-PyP at pH 11 is shifted negatively and, more importantly, by a greater amount than in the case of MnTM-3-PyP and MnTM-4-PyP. Consequently, the difference in $E_{1/2}$ between MnTM-2-PyP (mainly monohydroxo) and MnTM-4-PyP (mainly aqua) is 75 mV at pH 11 (Table 3), while it is 160 mV at pH 7.8 (28) where both porphyrins have water on both axial positions.

Under the same conditions (pH 11), however, there is only an 8 mV difference in $E_{1/2}$ for the Mn(IV)/Mn(III) couple between MnTM-2-PyP and MnTM-4-PyP (Figure 6 and Table 3). Therefore, the notable "ortho effect", observed for the Mn(III)/Mn(II) couple, is greatly diminished in the case of the Mn(IV)/Mn(III) couple.

Equation 4 may be divided into a two-proton loss (eq 6 of ref 43), followed by a one-electron loss (eq 7).



It is expected that transient dihydroxo species (eqs 6 and 7) of MnTM-2-PyP will cause a more negative shift of the redox potential of the Mn(IV)/Mn(III) couple relative to the shift induced by the monohydroxo species (eq 5) on the redox potential of the Mn(III)/Mn(II) couple. This negative shift may reach the magnitude of the positive shift caused by the ortho effect, making the redox potential of the Mn(IV)/Mn(III) couple the same for all three isomers.

Discussion

We have shown that Mn(III) porphyrins react very fast with ONOO⁻, yielding O=Mn(IV) and NO₂⁻, but the corresponding reaction with ONOOH was not detectable. It should be noted that the only previous determination of k_{ox}' was performed at pH 7.4 for Mn(III)TM-4-PyP (27).

The pH dependence of k_{ox}' is particularly relevant because it shows that the reaction rate is optimal at pH ≥ 7.0 (Figure 2). The lower reactivity against ONOOH could help explain why some similar Mn porphyrins embedded in phospholipid bilayers exhibited rate constants as low as $10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (46, 47); in a low-dielectric constant medium, ONOOH would be the predominant species and the reactivity would decrease accordingly.

The shift of ca. -0.6 unit in the pK_a of peroxyinitrite indicates an association between the anion and the cationic porphyrin complex.

In comparing the three isomers of MnTMPyP, we find that MnTM-2-PyP is the most reactive with a k_{ox} of $1.95 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, nearly 5 times greater than the values found for the other two isomers (Figure 2 and Table 2). Cyclic voltammetry revealed that redox potentials for the Mn(IV)/Mn(III) couple (Figure 6) for the three isomers are very similar at pH 11. Thus, there is no thermodynamic driving force making MnTM-2-PyP the most easily oxidizable. To account for the trend in k_{ox} , electrostatic facilitation could be crucial; MnTM-2-PyP, by having the *N*-methylpyridinium groups oriented axial to the plane of the porphyrin, displays a charge distribution that is less symmetrical and more closely packed around the metal that could position the anionic peroxyinitrite closer to the redox active metal center.

Additionally, the effect of temperature on k_{ox} revealed that the increase in the rate constant in changing from the para to the ortho isomer is only due to an increase in ΔS^\ddagger (the ΔH^\ddagger being identical within experimental error)⁴ which can be understood in terms of a small proximity effect as described for enzymatic catalysis (48).

When the reaction with peroxyinitrite is carried out in the presence of excess CO₂ (2 mM), competition kinetics predicts that $\sim 40\%$ of the peroxyinitrite will react with $5 \mu\text{M}$ Mn(III)TM-2-PyP and $\sim 60\%$ with CO₂ (Figure 3A, dotted line). We found that the measured yield of Mn(III) oxidation was higher than predicted, implying that a fraction of ONOOCO₂⁻ is further reduced by Mn(III). Previous studies (16, 17) of the reactivity of ONOOCO₂⁻ indicate that at most 35% of this species can oxidize substrates while the remaining 65% decays to NO₃⁻ and CO₂. Thus, we can estimate that $\sim 43\%$ of the scavengable ONOOCO₂⁻ reacted with Mn(III).

The reductions of O=Mn(IV)TMPyP isomers by ascorbate, GSII, urate, and Tyr display a trend that is the opposite of that found for the oxidation of the complexes by peroxyinitrite; namely, O=Mn(IV)TM-2-PyP is the slowest, while O=Mn(IV)TM-3-PyP and O=Mn(IV)TM-4-PyP have similar rate constants. Reduction by Tyr displays the largest difference (Table 2), and in this case, electrostatic facilitation should not contribute significantly to the reactivity as Tyr is a neutral molecule at pH 7.4. The main contribution to the different reactivities should arise then from the steric hindrance of *N*-methyl groups. With the anionic reductants ascorbate, glutathione, and urate, the electrostatic attraction by the more concentrated positive charge around the metal in MnTM-2-PyP can partially compensate for the steric hindrance, thus diminishing the differences in k_{red} .

A reaction cycle, described by reactions 1 and 2, has been proposed (27, 28) for the reduction of peroxyinitrite

³I. Batinić-Haberle, unpublished observations.

⁴G. Ferrer-Sueta and R. Radl, unpublished observations.

by the antioxidants catalyzed by Mn porphyrins. It can be demonstrated that for such a mechanism the rate of peroxynitrite decay obeys the rate law in eq 8, assuming that the Mn(III)/Mn(IV) porphyrin species rapidly attain steady-state concentrations

$$\frac{d[\text{ONOO}^-]}{dt} = \frac{k_{\text{ox}}k_{\text{red}}[\text{Aox}][\text{ONOO}^-][\text{Mn}]_{\text{total}}}{k_{\text{ox}}[\text{ONOO}^-] + k_{\text{red}}[\text{Aox}]} + k_{\text{Aox}}[\text{Aox}][\text{ONOO}^-] \quad (8)$$

where k_{ox} is the second-order rate constant for the uncatalyzed reaction between peroxynitrite and the antioxidant and $[\text{Mn}]_{\text{total}}$ is the sum of the Mn(III)TMPyP and O=Mn(IV)TMPyP concentrations.

From the expression in eq 8, it is evident that there is no simple "catalytic constant" for the cycle unless the conditions of rate constant and concentration of reagents make either $k_{\text{ox}}[\text{ONOO}^-]$ or $k_{\text{red}}[\text{Aox}]$ predominate in the denominator. For instance, if $k_{\text{ox}}[\text{ONOO}^-] \ll k_{\text{red}}[\text{Aox}]$, eq 8 reduces to eq 9.

$$\frac{d[\text{ONOO}^-]}{dt} = (k_{\text{ox}}[\text{Mn}]_{\text{total}} + k_{\text{Aox}}[\text{Aox}])[\text{ONOO}^-] \quad (9)$$

In this case, the apparent catalytic constant should be equal to k_{ox} .

When trying to determine the apparent catalytic constants, we encountered a number of complications. In the case of glutathione, according to the values for k_{ox} , k_{red} , and k_{Aox} (6), one should expect peroxynitrite to undergo a decay that is initially mixed zero- and first-order and becomes pure first order near the end of the reaction. Nevertheless, we obtained nearly perfect first-order decay plots when monitoring the reaction at 302 nm for five half lives (Figure 5A). The observed rate constant for this decay depends linearly upon catalyst concentration but also depends on the concentrations of both peroxynitrite (Figure 5B) and glutathione (not shown), implying that the proposed reaction cycle is an oversimplification of the kinetic system. Moreover, the second-order rate constants that were obtained ranged from 4×10^6 to $1.09 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for MnTM-2-PyP (Figure 5B), 2 orders of magnitude larger than k_{red} . This was previously observed by Lee et al. (27) and interpreted in terms of axial ligation of glutathione to Mn(III). However, the poor reactivity of Mn(III) porphyrins to ward axial ligation² does not support this interpretation. In fact, it has been recently proposed that some redox reactions of these metal complexes occur through outersphere electron transfer.⁶ We think there are other reactions at play once GSH, peroxynitrite, and the catalyst get together. The formation of sulfur-centered radicals (such as GS[•] and GSSG^{••}) during the direct and catalyzed reactions of glutathione with peroxynitrite and nitrogen dioxide has been shown previously (6, 48) to initiate chain reactions in the presence of oxygen. Some of the species implicated in these chain reactions such as GSSG^{••} and O₂^{••} are reducing intermediates that could

be responsible for the faster reduction of the oxo-Mn(IV) complex (28). Also, superoxide can be formed during the catalytic autooxidation of glutathione. To support these hypotheses, experiments were carried out in the presence of Cu-Zn SOD (Figure 5B), and the scavenging of superoxide by 200 units/ml Cu-Zn SOD caused a 7-fold decrease in the apparent catalytic constant, demonstrating the involvement of O₂^{••}.

The case of ascorbate is also complex; at the concentrations that were used and according to the rate constants that were determined (Table 2), we should have obtained an apparent catalytic constant similar to k_{ox} in agreement with eq 9. Instead, we found rate constants that depend strongly on the concentrations of both peroxynitrite and ascorbate in the range of 10^6 – $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for MnTM 2 PyP (not shown).

The catalytic system in the cases of ascorbate and glutathione should be expanded to include side reactions such as the reduction of Mn(III) to Mn(II) by the reductant and its concomitant catalytic autooxidation (27–29) yielding superoxide.

In the systems containing urate and Tyr, no efforts were made to measure an apparent catalytic constant as these reductants interfered with the detection of peroxynitrite and have a limited solubility.

It appears from the results presented herein that ascorbate, urate, or glutathione can drive the reduction of peroxynitrite in the presence of MnTMPyP more rapidly than Tyr. In this way, any of these reductants can prevent peroxynitrite-mediated Tyr nitration in the presence of MnTMPyP. The ability of the complexes to catalyze Tyr nitration depends on the rate of oxidation of the phenol by O=Mn(IV)TMPyP. According to the values of k_{red} that were determined, MnTM 4 PyP and MnTM-3-PyP would be better catalysts of nitration than MnTM-2-PyP.

Even though the catalytic cycle is more complex than previously thought, under conditions of low peroxynitrite concentrations and high concentrations of ascorbate, urate, and glutathione, as found in biological systems, the oxidation of MnTMPyP would become rate limiting and the efficiency of the peroxynitrite scavenging would only depend on k_{ox} . This makes MnTM-2-PyP the most promising isomer for catalyzing the reduction of peroxynitrite. This conclusion is reinforced by the fact that MnTM 2 PyP is also the most effective in intercepting oxidants in a ONOO[•]/CO₂ system.

In summary, manganese porphyrins and especially MnTM-2-PyP can redirect peroxynitrite-mediated oxidations toward biological reductants such as glutathione, uric acid, and ascorbate, diverting it from potentially more critical targets such as DNA and proteins. Of particular importance is the fact that micromolar levels of MnTM-2-PyP can partially inhibit the formation of ONOOCO₂^{••}. These observations open the possibility for evaluation of MnTM-2-PyP's ability to relieve situations of O₂^{••} and peroxynitrite mediated oxidative stress, such as in ischemia-reperfusion, inflammation, or septic shock (50–52).

² I. Batimic-Haberle, unpublished observation.

³ I. Batimic-Haberle, I. Spasojevic, F. Baumgart, L. Benov, A. J. Gamblino, and I. Fridovich (in preparation). Water soluble iron and manganese porphyrin mimics of superoxide dismutase. Metal centered redox potential and pK_a of pyrrolic nitrogen as indicator of SOD-like activity.

Acknowledgment. This work was supported by grants from ICGEB (Italy), CONICYT (Uruguay), and SARFC (Sweden) to R.R. and by the Council for Tobacco Research-USA, Inc., and the Aeolus/Intercardia (L.F.).

References

- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 461–487.
- Castro, I., Rodriguez, M., and Radi, R. (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**, 29409–29415.
- King, P. A., Anderson, V. L., Edwards, J. O., Gustafson, G., Plumb, R. C., and Suggs, J. W. (1992) A stable solid that generates hydroxyl radical upon dissolution in aqueous solutions: reaction with protein and nucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 5430–5432.
- Bartlett, D., Church, D. F., Bouras, P. L., and Koppenol, W. H. (1995) The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxynitrite. *Free Radical Biol. Med.* **18**, 85–92.
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite-oxidation of sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244–4250.
- Quijano, C., Alvarez, H., Cauti, R., Augusto, O., and Radi, R. (1997) On the pathways of peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *Biochem. J.* **322**, 167–173.
- Radi, R. (1998) Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 720–721.
- MacMillan-Crow, L. A., Crow, J. P., Kerby, J. D., Beckman, J. S., and Thompson, J. A. (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 11853–11858.
- Suzua, J., and Radi, R. (1998) Glycerolaldehyde 3 phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **360**, 187–194.
- Yermilov, V., Yoshie, Y., Rubio, J., and Oshima, H. (1996) Effects of carbon dioxide/bicarbonate on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-paired nucleides by peroxynitrite. *FEBS Lett.* **399**, 67–70.
- Cow, A., Burn, J., Thom, S., and Ischiropoulos, H. (1990) Carbon dioxide-enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 42–48.
- Donicula, A., Freeman, B., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 49–58.
- Lyman, S. V., and Hurst, J. K. (1995) Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8867–8868.
- Lyman, S. V., Jiang, Q., and Hurst, J. K. (1996) Mechanism of carbon dioxide catalyzed oxidation of tyrosine by peroxynitrite. *Biochemistry* **35**, 7855–7861.
- Radi, R., Donicula, A., and Freeman, B. A. (1998) Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate. *Methods Enzymol.* **301**, 353–367.
- Goldstein, S., and Czapski, G. (1997) The effect of bicarbonate on oxidation by peroxynitrite: Implication for its biological activity. *Inorg. Chem.* **36**, 3113–3117.
- Lyman, S. V., and Hurst, J. K. (1998) CO₂ Catalyzed one electron oxidations by peroxynitrite: properties of the reactive intermediate. *Inorg. Chem.* **37**, 294–301.
- Santos, C. X. C., Anjos, E. I., and Augusto, O. (1998) *Rev. Farm. Bioprop. Univ. Sao Paulo* **34**, 182.
- Stern, M. K., Jenou, M. J., and Kramer, K. (1996) Peroxynitrite decomposition catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8735–8736.
- Lee, J., Hunt, J. A., and Groves, J. T. (1998) Mechanism of iron porphyrin reactions with peroxynitrite. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 7493–7501.
- Pastermak, R. F., Gibbs, E. J., and Villafraanca, J. J. (1982) Interaction of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry* **22**, 2406–2414.
- Groves, J. T., and Marla, S. S. (1995) Peroxynitrite induced DNA strand scission mediated by a manganese porphyrin. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9578–9579.
- Salvemini, D., Wang, Z., Stern, M., Currie, M., and Misko, T. (1998) Peroxynitrite decomposition catalysts: Therapeutics for peroxynitrite mediated pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2659–2663.
- Misko, T., Hightkin, M., Veenhuizen, A., Manning, P., Stern, M., Currie, M., and Salvemini, D. (1998) Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts. *J. Biol. Chem.* **273**, 15649–15653.
- Masumoto, H., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1996) Kinetic study of the reaction of obelen with peroxynitrite. *FEBS Lett.* **398**, 179–182.
- Betimba, K., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1998) Kinetic study of the reaction of glutathione peroxidase with peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1398–1401.
- Lee, J., Hunt, J. A., and Groves, J. T. (1997) Rapid decomposition of peroxynitrite by manganese porphyrin antioxidant redox couples. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 2913–2918.
- Lee, J., Hunt, J. A., and Groves, J. T. (1998) Manganese porphyrins as redox-coupled peroxynitrite reductases. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6053–6061.
- Batinic Haberle, I., Benov, L., Spasojevic, I., and Fridovich, I. (1998) The ortho effect makes manganese(III) meso-tetrakis(N-methylpyridinium-2-yl)porphyrin (MnTM-2-PyP) a powerful and potentially useful superoxide dismutase mimic. *J. Biol. Chem.* **273**, 24521–24528.
- Loewer Susta, G., Ruiz Ramirez, J., and Radi, R. (1997) Ternary copper complexes and Multi(hp) catalyze peroxynitrite dependent nitration of aromatics. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1338–1344.
- Beckman, J. S., Beckman, J. W., Chen, J., Marsini, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 1620–1624.
- Hachstein, P., Hatch, L., and Sevastian, A. (1984) Uric acid: functions and determination. *Methods Enzymol.* **105**, 162–166.
- Arustiong, J. M. (1964) The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 194–197.
- Filman, C. L., and Lyoko, H. (1979) A precise method for the determination of lysine and lysyl-histidine residues. *Anal. Biochem.* **93**, 98–102.
- Boaventura, G. H., and Faldut, E. R. (1952) Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids. *Adv. Protein Chem.* **7**, 319–386.
- Awtrey, A. D., and Conick, R. E. (1951) The absorption spectra of Fe, Cu, Co, Ni, O₂, S₂O₈²⁻ and S₂O₈²⁻. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **73**, 1842–1843.
- Groves, J. T., Lee, J., and Marla, S. S. (1997) Detection and characterization of an oxomanganese(V) porphyrin complex by rapid mixing stopped flow spectrophotometry. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 6269–6273.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chew, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D., and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 431–437.
- Merulis, P. (1993) GIPASS: a software package for modelling the dynamics, steady state and control of biochemical and other systems. *Comput. Appl. Biosci.* **9**, 563–571.
- Mendes, P. (1997) Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 361–363.
- Espenson, J. H. (1996) *Chemical kinetics and reaction mechanisms*, 2nd ed., McGraw-Hill, New York.
- Ramezani, M. S., Padmaja, S., and Koppenol, W. H. (1996) Nitration and hydroxylation of phenolic compounds by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 232–239.
- Alvarez, F., Rubio, H., Kirk, M., Barros, S., Freeman, B. A., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite dependent tryptophan nitration. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 390–396.
- Astruc, D. (1995) *Chemical Transfer and Radical Processes in Transition-Metal Chemistry*, p. 162, VCH Publishers, New York.
- Herrinton, A., and Porter, G. (1979) Photochemistry of Manganese Porphyrins. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 1532–1542.
- Marla, S. S., Lee, J., and Groves, J. T. (1997) Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 14243–14248.
- Hunt, J. A., Lee, J., and Groves, J. T. (1997) Amphiphilic peroxynitrite decomposition catalysts in liposomal assemblies. *Chem. Biol.* **4**, 845–848.
- Jenks, W. P. (1975) Binding energy, specificity and enzymic catalysis: the Cheff effect. *Adv. Chem. Ser.* **43**, 219–411.
- Wardman, P., and von Sonntag, C. (1995) Kinetic factors that control the fate of thyl radicals in cells. *Methods Enzymol.* **251**, 31–45.
- Liu, P., Huck, C. E., Nagde, R., and Wong, P. Y. (1997) Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am. J. Physiol.* **272**, H2327–H2330.
- Fukuyama, N., Takebayashi, Y., Hida, M., Ishida, H., Ichimori, K., and Nakazawa, H. (1997) Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radical Biol. Med.* **22**, 771–774.
- Ischiropoulos, H. (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 1–11.

Resultados adicionales al trabajo 1

La reacción a

Encontramos constantes de velocidad para la reacción a entre 10^6 y 10^7 $M^{-1} s^{-1}$ y el valor mayor corresponde al isómero MnTM-2-PyP que tiene las cargas positivas de los grupos metilpiridinio ubicadas en forma axial. En busca de una explicación para esta diferencia, estudiamos la dependencia de la constante de velocidad con la temperatura a pH 8.5 para evitar las complicaciones de constantes de acidez vecinas. Los resultados se presentan en la Figura 10 y evidencian que la entalpía de activación es esencialmente igual para ambos isómeros, pero que la entalpía de activación difiere en aproximadamente 2 cal $mol^{-1} K^{-1}$. De ahí concluimos que el factor de 5 veces más rápido para MnTM-2-PyP se debía a la facilitación electrostática proporcionada por las cargas positivas axiales.

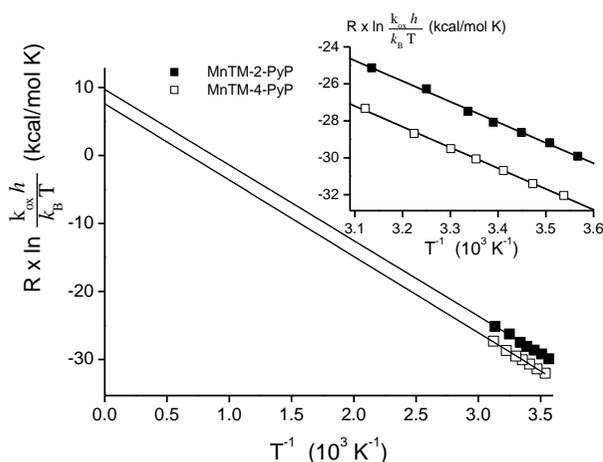


Figura 10. Gráfico de Eyring del efecto de la temperatura sobre la constante de velocidad de la reacción a.

Amortiguador pirofosfato 50 mM, pH 8.5

Parámetros de activación:

MnTM-2-PyP

$$\Delta H^\ddagger = 11.12 \pm 0.28 \text{ kcal mol}^{-1}$$

$$\Delta S^\ddagger = 9.7 \pm 0.96 \text{ cal mol}^{-1} K^{-1}$$

MnTM-4-PyP

$$\Delta H^\ddagger = 11.23 \pm 0.22 \text{ kcal mol}^{-1}$$

$$\Delta S^\ddagger = 7.6 \pm 0.74 \text{ cal mol}^{-1} K^{-1}$$

Las reacciones b

La reducción de $O=Mn^{IV}$ Porfirinas con los reductores escogidos muestra el orden ascorbato > urato >> glutatión \approx tirosina que es congruente con el orden de dureza de los reductores y con sus potenciales redox de un electrón.

Las reacciones con los reductores no fueron sencillas en todos los casos, a pesar de lo cual se obtuvieron valores congruentes en esa oportunidad y posteriormente para otros

complejos. En la Tabla 8 se muestran los resultados publicados en la tabla 2 del Trabajo 1 junto con algunas otras constantes determinadas posteriormente y no publicadas.

Tabla 8 Constantes de velocidad para la reacción b entre varios reductores y varias MnPorfirinas a 37°C y pH 7.4 ± 0.1.

Complejo	k_b ($M^{-1} s^{-1}$)			
	Urato	Ascorbato	Tirosina	Glutati3n
MnTM-2-PyP	$1.22 \pm 0.05 \times 10^6$	$3.5 \pm 0.1 \times 10^7$	$4.94 \pm 0.06 \times 10^3$	$4.21 \pm 0.11 \times 10^4$
MnTM-3-PyP	$1.42 \pm 0.01 \times 10^6$	$5.2 \pm 0.1 \times 10^7$	$4.83 \pm 0.03 \times 10^4$	$5.34 \pm 0.08 \times 10^4$
MnTM-4-PyP	$1.53 \pm 0.05 \times 10^6$	$3.5 \pm 0.1 \times 10^7$	$6.54 \pm 0.11 \times 10^4$	$6.77 \pm 0.18 \times 10^4$
MnTE-2-PyP	$8.83 \pm 0.06 \times 10^5$	ND	ND	$4.4 \pm 0.2 \times 10^4$
MnTCPP	$4.48 \pm 0.10 \times 10^5$	ND	ND	$1.3 \pm 0.06 \times 10^4$
MnTSPP	$1.60 \pm 0.02 \times 10^5$	ND	ND	$1.2 \pm 0.04 \times 10^4$

ND: No determinado

Curiosa e inesperadamente, los resultados presentados en esta tabla pueden explicar una tendencia observada previamente (ver la p31gina 48). Hab31amos visto que en la nitraci3n de 4-HPA, MnTM-4-PyP y MnTM-2-PyP catalizaban pr31cticamente igual, mientras que para la tirosina, la nitraci3n ten3a el mismo rendimiento, pero se necesitaban concentraciones mucho mayores de MnTM-2-PyP. Aqu31 vemos que la oxidaci3n de tirosina por $O=Mn^{IV}TM-2-PyP$ es unas 10 veces m31s lenta que con los otros is31meros y si bien no se determin3n la constante de velocidad correspondiente a las reacciones con 4-HPA, las reducciones con los dem31s reductores (todos ani3nicos al igual que el 4-HPA) es esencialmente igual para los tres is31meros.

Aparte de esta explicaci3n tard3a pero bienvenida de la reactividad hay dos aspectos en la redirecci3n de la reactividad del peroxinitrito que vale la pena mencionar. En el ciclo de las reacciones a y b no se inactiva la especie oxidante en un sentido cl31sico, sino que se genera un nuevo oxidante intermediario que a su vez es reducido por el reductor de sacrificio. En el caso de las porfirinas de manganeso empleadas en el Trabajo 1, este oxidante intermediario difiere del peroxinitrito (el oxidante original) en su carga el3ctrica (formalmente 4+) y en su dureza. Esto har3 que los reductores preferidos sean ahora los ani3nicos y los m31s duros como se puede observar en la Tabla 8.

Competencia cin3tica

Como se manifiesta en el ep31grafe de la p31gina 51, busc31bamos un reactivo capaz de competir con el di31xido de carbono en su reacci3n con peroxinitrito. En los n31meros se puede observar que la constante de velocidad de MnTM-2-PyP es unas 300 veces mayor

que la de CO_2 , es decir, la MnPorfirina puede competir con una concentración 300 veces mayor de CO_2 . Cuando hicimos el experimento para observar la competencia pudimos ver que resultaba oxidada una fracción de MnPorfirina mayor que la calculada. Nuestra explicación de entonces era que una fracción del aducto ONOOCO_2^- también se podía reducir con Mn^{III} Porfirina.

Resulta curioso ver que un par de semanas antes de que el Trabajo 1 apareciera en la revista, nosotros mismos colaboramos en un artículo donde se relativiza la importancia del ONOOCO_2^- y se identificaba directamente al $\text{CO}_3^{\cdot-}$ como la especie reactiva derivada de la reacción de ONOO^- con CO_2 ⁽¹⁰³⁾. En realidad, el proceso de revisión y edición hizo que el orden de publicación se invirtiera respecto al de la generación de los resultados. Hecha esa salvedad, podemos establecer la siguiente hipótesis en términos actualizados:

EL RADICAL CARBONATO ES OTRA ESPECIE REACTIVA QUE SE PUEDE INTERCEPTAR DE FORMA EFICIENTE CON MNPORFIRINAS. LA REACTIVIDAD DEL $\text{CO}_3^{\cdot-}$ TAMBIÉN SE VERÁ ENTONCES DESVIADA MEDIANTE UN CICLO CATALÍTICO DE LA PORFIRINA.

Trabajo 2. Reducción de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y correlaciones de reactividad

Ferrer-Sueta, G., D. Vitturi, I. Batinic-Haberle, I. Fridovich, S. Goldstein, G. Czapski and R. Radi (2003). "Reactions of manganese porphyrins with peroxyxynitrite and carbonate radical anion." *J. Biol. Chem.* **278**(30): 27432-27438

The rate constant... determined herein
...which makes Mn(II) porphyrins good
scavengers of $\text{CO}_3^{\cdot-}$ with reactivities well
above those of biologically relevant targets

Después del primer trabajo resultaba bastante evidente que necesitábamos evaluar la reactividad de las MnPorfirinas frente a $\text{CO}_3^{\cdot-}$, no obstante el trabajo con este radical presentaba un desafío metodológico importante ya que su fugaz existencia en solución acuosa sólo puede estudiarse directamente por fotólisis flash o por radiólisis de pulso. Hicimos los contactos pertinentes y viajamos a Jerusalén para intentar que la radiólisis de pulso nos permitiera ver las reacciones del $\text{CO}_3^{\cdot-}$.

Aparece el Mn^{II}

Desde el artículo de Faulkner ⁽¹⁸⁾ parecía obvio que las Mn^{II}Porfirinas eran especies relevantes en bioquímica y por ende exigían ser estudiadas. Sin embargo, las Mn^{II}Porfirinas reaccionan con el oxígeno disuelto lo que da lugar a una secuencia de reacciones compleja donde participan superóxido y peróxido de hidrógeno, además de, posiblemente las porfirinas de Mn^{II}, Mn^{III} y Mn^{IV} ^(17,149). Estas reacciones exigen la exclusión estricta del oxígeno para estudiar a las Mn^{II}Porfirinas. Nuestro primer abordaje del estudio de Mn^{II}Porfirinas consistió en un sistema simple de desplazamiento del O₂ por una corriente de He y reducción estequiométrica con ditionito, muy efectivo pero poco representativo de la reducción *in vivo*. La necesidad de excluir estrictamente el oxígeno limitó parcialmente las posibilidades de hacer experimentos, en particular limitó los experimentos de oxidación de Mn^{II}Porfirinas a un único valor de pH.

Correlaciones y falta de correlaciones

La dependencia del pH de la oxidación de Mn^{III}Porfirinas con CO₃⁻ nos impulsó a estudiar las propiedades ácido base de estos complejos metálicos, con la ventaja adicional de que estas propiedades (es decir, los pK_a de las moléculas axiales de agua) permiten un punto de observación privilegiado de las propiedades electrónicas y el entorno del ion manganeso. Conocíamos desde mucho tiempo atrás que había una marcada variación espectral asociada con el cambio de pH (ver la página 44) y la aprovechamos para determinar las constantes de ionización de las moléculas axiales de agua. Así, aparte de poder interpretar las velocidades diferenciales con el pH de la reacción entre Mn^{III}Porfirinas y CO₃⁻, los pK_a axiales permitieron racionalizar una desviación observada algún tiempo atrás en correlaciones que vinculaban propiedades ácido base y electroquímicas de las porfirinas o sus complejos metálicos con tendencias de reactividad frente a superóxido⁽²⁴⁾. Las correlaciones encontradas en la figura 7 del trabajo 2 no son perfectas y podrían estar implicando factores adicionales a los considerados, pero permitieron descartar la explicación intuitiva del efecto estérico de sustituyentes mayores sobre las velocidades de reacción. El énfasis de la desviación observada para la actividad de dismutación de O₂⁻ se trasladó al microentorno hidrofóbico generado por sustituyentes alquilo en la vecindad del manganeso. Este énfasis ha resultado en la redirección del diseño de nuevas MnPorfirinas hacia sustituyentes con efecto inductivo similar al de los grupos alquilo, pero más polares, por ejemplo cadenas de mono y poliéteres de 4 a 10 átomos de longitud^(22,38). La reactividad de estas nuevas MnPorfirinas con O₂⁻ correlaciona bastante bien con el potencial redox del par Mn^{II}/Mn^{III}, pero su reactividad frente a ONOO⁻ aun no ha sido determinada.

Sorprende la ausencia de correlación entre la constante de velocidad para las reacciones con CO₃⁻, ni Mn^{II} ni Mn^{III} presentan tendencias que se puedan correlacionar con otras propiedades fisicoquímicas de los complejos. En el trabajo 2 se racionaliza esta ausencia de correlación para las Mn^{III}Porfirinas como debida a la invariancia del potencial redox del par Mn^{III}/Mn^{IV} que podría ser importante de tratarse de una reacción de esfera externa. La falta de correlación para las Mn^{II}Porfirinas no tiene a nuestros ojos una explicación evidente.

Es excepcional y destacable el hecho de que Mn^{III}TCPP es la porfirina oxidada que reacciona más rápido con CO₃⁻, hasta donde sabemos esta es la única reacción química donde Mn^{III}TCPP es la más rápida. Mencionamos antes (pág. 27) que MnTCPP tiene efectos antioxidantes inesperados dada su modesta reactividad frente a superóxido y peroxinitrito, su reactividad preferente con CO₃⁻ podría explicar en parte sus efectos antioxidantes, aunque la ventaja en la constante de velocidad es de tan solo 3 a 4 veces respecto a las Mn^{III}Porfirinas catiónicas (Tabla IV del trabajo 2).

Reactions of Manganese Porphyrins with Peroxynitrite and Carbonate Radical Anion*

Received for publication, December 31, 2002, and in revised form, April 15, 2003
Published, JBC Papers in Press, April 16, 2003, DOI 10.1074/jbc.M213302200

Gerardo Ferrer-Suetas[§], Dario Vitturi[¶], Ines Batinić-Haberle^{¶*}, Irwin Fridovich[‡],
Sara Goldstein^{§§}, Gidon Czapski^{§§}, and Rafael Radt^{¶¶}

From the [§]Laboratorio de Bioquímica Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay, [¶]Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710,

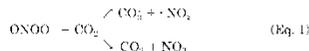
^{§§}Department of Physical Chemistry, The Hebrew University, Jerusalem 91904, Israel, and ^{¶¶}Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Av. Gral. Flores 2125, Montevideo 11800, Uruguay

We have studied the reaction kinetics of ten manganese porphyrins, differing in their *meso* substituents, with peroxynitrite (ONOO⁻) and carbonate radical anion (CO₃^{•-}) using stopped-flow and pulse radiolysis, respectively. Rate constants for the reactions of Mn(III) porphyrins with ONOO⁻ ranged from 1×10^6 to 3.4×10^7 M⁻¹s⁻¹ and correlated well with previously reported kinetic and thermodynamic data that reflect the resonance and inductive effects of the substituents on the porphyrin ring. Rate constants for the reactions of Mn(II) porphyrins with CO₃^{•-} ranged from 2×10^8 to 1.2×10^9 M⁻¹s⁻¹ at pH \leq 8.5 and increased with pH as a consequence of the ionization of the complexes. Mn(II) porphyrins reacted with CO₃^{•-} with rate constants ranging from 1×10^9 to 5×10^9 M⁻¹s⁻¹ at pH 10.4. Hence, fast scavenging of ONOO⁻ and CO₃^{•-} by manganese porphyrins could occur *in vivo* because of the catalytic reduction at the expense of a number of cellular reductants. Additionally, we determined the pK_a of the axial water molecules of the Mn(III) complexes at pH 7.5–13.2 by spectrophotometric titration. Results were consistent with two acid-base equilibria for most of the complexes studied. The pK_a values also correlated with the resonance and inductive effects of the substituents. The correlations of E₀ with the rate constants with ONOO⁻ and with the pK_a values display a deviation from linearity when N-alkylpyridinium substituents included N-alkyl moieties longer than ethyl, which is interpreted in terms of a decrease in the local dielectric constant.

Metalloporphyrins catalyze numerous redox reactions (1); in particular, manganese porphyrins have been used as redox catalysts in several model systems relevant to biochemistry, for instance, as superoxide dismutase (2, 3) and catalase (4) mim-

ics. Some of the N-alkylpyridinium substituted complexes afforded protection of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli* from O₂ toxicity (5) and in several rodent models of transient brain ischemia (6, 7), diabetes (8), sickle cell disease (9), and radiation injury (10). Moreover, Mn^{III}TCP[†] has been effective in a number of model studies of oxidative stress-mediated injury (for a review see Ref. 11) despite having low superoxide dismutase and catalase activities.

Our group (12–14) and others (15) have studied the capability of manganese porphyrins for the catalytic reduction of peroxynitrite (ONOOH/ONOO⁻), a powerful oxidant that can be formed *in vivo* by the reaction of O₂ with •NO (16, 17). A significant fraction of the oxidative biochemistry of peroxynitrite is derived from the rapid reaction of ONOO⁻ with CO₂ ($k = 5.8 \times 10^4$ M⁻¹s⁻¹ at 37 °C (18, 20)), which produces the carbonate radical anion (CO₃^{•-}) and nitrogen dioxide (•NO₂) with about 33% yield (see Equation 1, below), with the remaining yielding carbon dioxide and nitrate, where $k_{11}/k_{10} = 2$ (21–24).



Given the ubiquity of CO₃^{•-}, its high concentration (1 to 2 μM in human tissues), and the reactivity of CO₃^{•-} (25), a useful peroxynitrite scavenger needs to out-compete the target molecules and CO₂ and/or be able to efficiently scavenge CO₃^{•-}.

We have proposed that complexes such as Mn^{III}TM-2-PyP can efficiently inhibit peroxynitrite-mediated oxidations even in the presence of CO₂ (13). Moreover, the reaction of Mn^{III}TM-2-PyP with ONOO⁻ in the presence of CO₂ produced more oxidation of the metal complex than expected based on simple competition kinetics (13), suggesting a probable reaction of the complex with CO₃^{•-}. The possible reaction of Mn(III) porphyrins with CO₃^{•-} has also been proposed recently (26) in experiments related to the effect of bicarbonate on the peroxidase activity of Cu,Zn superoxide dismutase.

In aerated aqueous solution, the stable oxidation state of

* This work was supported in part by grants from the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (Italy), The Howard Hughes Medical Institute (to R. F.), and by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, Uruguay) (to G. F. S.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Received travel grants from Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas and CSIC to visit the Hebrew University, Jerusalem, Israel.
¶ Received a young researcher scholarship from CSIC.
¶¶ Recipient of Christopher Reeve Paralysis Foundation Grant BA1-0103-1 and supported in part by *Aeolus/Incura*.

§§ Recipient of National Institutes of Health Grant R01DK59868 and supported in part by the Amyotrophic Lateral Sclerosis Association.

¶ International Research Scholar of the Howard Hughes Medical Institute. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 5982-9249561; Fax: 5982-9249563; E-mail: rradi@fmed.edu.uy.

† The abbreviations used are: Mn^{III}TCP[†], manganese(III) *meso*-tetrakis(4-carboxylatophenyl)porphyrin; Mn^{III}TM-2-PyP, manganese(III) *meso*-tetrakis(N-methylpyridinium-2-yl)porphyrin; Mn^{III}TM-4-PyP, manganese(III) *meso*-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin; Mn^{III}TSPP, manganese(III) *meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin; Mn^{III}TE-2-PyP, manganese(III) *meso*-tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin; Mn^{III}TnPr-2-PyP, manganese(III) *meso*-tetrakis(N-n-propylpyridinium-2-yl)porphyrin; Mn^{III}TnBu-2-PyP, manganese(III) *meso*-tetrakis(N-n-butylpyridinium-2-yl)porphyrin; Mn^{III}TnHex-2-PyP, manganese(III) *meso*-tetrakis(N-n-hexylpyridinium-2-yl)porphyrin; Mn^{III}TnOct-2-PyP, manganese(III) *meso*-tetrakis(N-n-octylpyridinium-2-yl)porphyrin; Mn^{III}TM-3-PyP, manganese(III) *meso*-tetrakis(N-methylpyridinium-3-yl)porphyrin.

Reaction of Manganese Porphyrins with ONOO⁻ and CO₂

27433

manganese porphyrins used in this study is Mn(III). However, given the low oxygen tension inside the cell, cellular components, like low molecular weight reductants (27) and probably some dehydrogenases (28), can produce Mn(II) porphyrins and maintain them in the reduced state. Mn(II) porphyrin chemistry has been studied since the seventies (29–31), but only recently has its biochemistry begun to be explored (27). Mn(II) porphyrins may have a number of advantages over Mn(III) porphyrins with regard to their scavenging and antioxidant activity. For instance, they could rapidly scavenge oxidizing radicals such as CO₂ and yield innocuous products, or they could reduce strong oxidants like ONOO⁻ or H₂O₂ via a two-electron transfer reaction without producing any secondary radicals. This latter reaction is particularly important if Mn(II) can be regenerated at the expense of readily available biological reductants (14).

Carbonate radical anion is long known to radiation chemists (32, 33) but has only recently drawn attention of biochemists because of its formation from the reaction of ONOO⁻ with CO₂ (16–21) and the effect of bicarbonate on the peroxidase activity of Cu,Zn superoxide dismutase (34). Carbonate radical anion is the conjugate base of a strong acid ($pK_a < 0$) (35) and a strong oxidant (36) with a characteristic spectrum in the visible ($\epsilon_{400} = 1860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (32, 33). Nevertheless, its reactivity is somewhat selective, and its potential targets in biological systems include sulfur-containing and aromatic amino acids (37, 38).

Manganese porphyrins display linear free energy relationships between ligand or complex properties, e.g., pK_a of pyrolic nitrogens, $E_{1/2}$ (Mn(III)/Mn(II)), and rate constants, such as the catalytic rate constant of O₂ dismutation (5, 39). These linear free energy relationships break down if *N*-alkylpyridinium substituted porphyrins contain alkyl groups longer than ethyl, which has been ascribed to steric and solvation differences in the metal surroundings (39). The complexes possess two axially coordinated water molecules, and they can undergo up to two ionization steps in the alkaline pH range. Data in the literature with respect to these ionization reactions are diverse, both in the methods used and in the results. For instance, Mn^{III}TM-4-PyP displays a single pK_a of 10 according to ¹H NMR (40) but two pK_a s at 10.9 and 12.3 (41) or at 8.0 and 10.6 (42) by spectrophotometric titration.

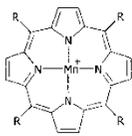
In what follows, we examine the reduction of ONOO⁻ by Mn(II) porphyrins and the reaction of both Mn(II) and Mn(III) porphyrins with CO₂. We also use spectrophotometric titration to determine the relevant pK_a values.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals. Mn(III) porphyrins used in this work are listed in Table I along with their electric charge at pH 7. Mn^{III}TCCP and Mn^{III}TSP were purchased from MidCentury Chemicals, Chicago, IL, and the other porphyrins were synthesized as described previously (39). Peroxynitrite was synthesized from hydrogen peroxide and sodium nitrite in acidic solution (43). All other chemicals were commercial. Mn(III) porphyrins were prepared by the reduction of Mn(III) porphyrins with equimolar dithionite in N₂O-saturated solutions containing 0.1 M carbonate at pH 10.4. Dithionite solution was prepared in helium-saturated solutions containing 0.1 M carbonate at pH 10.4, and its concentration was assessed immediately prior to its use by reduction of Fe(CN)₆³⁻ ($\epsilon_{415} = 1012 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (44).

Methods. Stopped-flow kinetic measurements were carried out using an SX-17MV Stopped-Flow from Applied Photophysics coupled with a 1-cm-long mixing cell. Briefly, Mn(III) porphyrins (0.8 to 6 μM) in acid phosphate solution were mixed in a 1:1 ratio with ONOO⁻ in 10-fold or greater excess, dissolved in a known concentration of NaOH. The reaction was monitored by the change in absorbance in the Soret band of the porphyrin, and the plots were fitted to a simple exponential function. All experiments were carried out at 37 °C. The pH was measured at the outlet of the stopped flow.

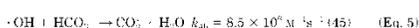
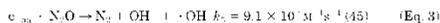
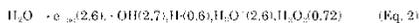
TABLE I
Structure, abbreviation, and electric charge at pH 7 of the Mn(III) complexes used in this work

General structure	R	R	Abbreviation	Charge
		methyl	Mn ^{III} TM-5-PyP	5+
		ethyl	Mn ^{III} TE-2-PyP	
		<i>n</i> -propyl	Mn ^{III} TnPr-2-PyP	
		<i>n</i> -butyl	Mn ^{III} TnBu-2-PyP	
		<i>n</i> -hexyl	Mn ^{III} TnHex-2-PyP	
		<i>n</i> -octyl	Mn ^{III} TnOct-2-PyP	5+
			Mn ^{III} TM-1-PyP	3+
			Mn ^{III} TM-4-PyP	
			Mn ^{III} TCCP	
			Mn ^{III} TSP	3-

^γ-Radiolysis experiments were carried out with a ¹³⁷Cs source (Radiation Machinery Corporation Parsippany, NJ). The dose rate (9.8 gray/min) was determined using the Fricke dosimeter (1 mM FeSO₄ in 0.8 M H₂SO₄) based on $G(\text{Fe}^{III}) = 15.6$ and $\epsilon_{502}(\text{Fe}^{III}) = 2200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Pulse radiolysis experiments were carried out with a 5-MeV Varian 7715 linear accelerator (0.2–1.5 μs electron pulses, 200 mA current). All measurements were made at room temperature in a 1-cm spectroil cell using three light passes (optical path length 3.1 cm). A 150-watt xenon-mercury lamp was used as the light source. The detection system included a Bausch & Lomb grating monochromator model D330/D331 Mk. 11 and a Hamamatsu R920 photomultiplier. The signal was transferred through a Sony/Tektronix 390AD programmable digitizer to a micro PDP-11 1224 computer, which operated the whole pulse radiolysis system.

Generation of ONOO⁻. The radical was generated upon irradiation of N₂O-saturated (>25 mM) aqueous solutions containing 0.5 M carbonate at pH = 8.5 via the reactions shown below in Equations 2–5 (the species radiation yields are given in parentheses in Equation 2).



The pulse intensity was set to produce between 2 and 4 μM CO₂ and manganese porphyrin concentration ranged between 15 and 60 μM .

Ionization of Axial Water of Mn(III) Porphyrins.—Solutions containing 10 μM Mn(III) porphyrin and 1 M K₂CO₃ at pH = 13 were mixed in a 1:1 ratio with HCl solutions of varying concentrations to yield pH 7.5–13.2. The mixture was made directly in the spectrophotometer cell using a KX2000 rapid mixing accessory from Applied Photophysics. Spectra were recorded from 350 to 600 nm at each pH in a Cary 50 spectrophotometer. Spectral data were analyzed using Microcal Origin software. Mn^{III}TSP was dissolved in 0.1 M K₂CO₃ because the complex precipitates in more concentrated solutions.

RESULTS

Reaction of Mn(III) Porphyrins with Peroxynitrite.—The reaction of Mn(III) porphyrins with excess of peroxynitrite was studied by stopped flow. The observed pseudo-first order rate constants were plotted versus peroxynitrite concentration at each pH to obtain the second order constant (k_{ON}), which in-

27434

Reaction of Manganese Porphyrins with ONOO⁻ and CO₂

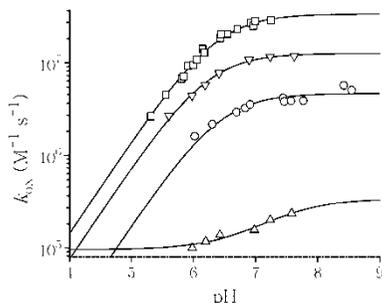


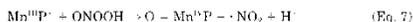
Fig. 1. The rate constants for the reaction of peroxyntirite with Mn(III) porphyrins as a function of pH in 0.1 M phosphate buffer and 37 °C. Complexes used were Mn^{III}TE-2-PyP (squares), Mn^{III}TnBu-2-PyP (inverted triangles), Mn^{III}TM-4-PyP (circles), and Mn^{III}TSPP (triangles).

TABLE II
Second order rate constants for the reaction shown in Equation 6 and apparent pK_a values for peroxyntirite obtained from fitting the data of k_{obs} to Equation 9, at 37 ± 0.1 °C

Complex	k ₀ M ⁻¹ s ⁻¹	pK _a
Mn ^{III} TM-2-PyP	1.9 ± 0.1 × 10 ⁶	6.2 ± 0.1
Mn ^{III} TE-2-PyP	3.4 ± 0.1 × 10 ⁶	6.4 ± 0.1
Mn ^{III} TnPr-2-PyP	1.4 ± 0.01 × 10 ⁷	6.1 ± 0.1
Mn ^{III} TnBu-2-PyP	1.3 ± 0.03 × 10 ⁷	6.2 ± 0.1
Mn ^{III} TnHex-2-PyP	1.3 ± 0.04 × 10 ⁷	6.3 ± 0.1
Mn ^{III} TnOct-2-PyP	1.4 ± 0.05 × 10 ⁷	6.3 ± 0.1
Mn ^{III} TM-3-PyP	4.2 ± 0.1 × 10 ⁶	6.1 ± 0.1
Mn ^{III} TM-4-PyP	4.3 ± 0.2 × 10 ⁶	6.3 ± 0.1
Mn ^{III} TSPP	3.4 ± 0.6 × 10 ⁵	7.4 ± 0.3
Mn ^{III} TCPP	1.0 ± 0.1 × 10 ⁷	ND

ND, not detected.

creases upon increasing the pH. Fig. 1 shows plots of k_{obs} versus pH for four representative complexes. Given that the pK_a of ONOOH is 6.6 ± 0.1 (46, 47), our results demonstrate, as reported previously for several porphyrin complexes (13), that Mn(III) porphyrins react faster with ONOO⁻ than with ONOOH.²



Hence, the effective second-order rate constant of the reaction of Mn(III) porphyrin with peroxyntirite (k_{obs}) is pH-dependent and is given by Equation 9, where k₀ and k₁ are the rate constants of the reactions shown in Equations 6 and 7, respectively.

$$k_{\text{obs}} = (k_0K_a + k_1[H^+]) / (K_a + [H^+]) \quad (\text{Eq. 9})$$

Table II summarizes the values of k₀ and pK_a obtained for all ten complexes. The pH profiles of all cationic complexes fit Equation 9 assuming that k₁ was very small or zero. In the case of Mn^{III}TSPP, a value of k₁ < 10² M⁻¹s⁻¹ can be put forward

²The electric charge of the complexes in the equations only considers the formal charge of the metal ion and the atoms directly bound to it, thus Mn(III) porphyrin is Mn^{III}P⁺, Mn(II) porphyrin is Mn^{II}P, and O = Mn(IV) porphyrin is O = Mn^{IV}P.

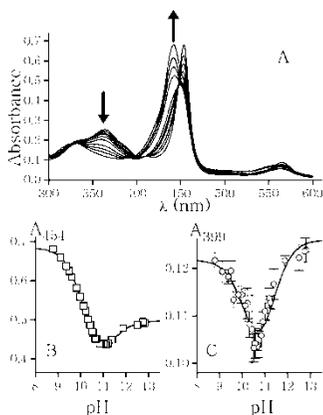


Fig. 2. Spectrophotometric titration of 5.3 μM Mn^{III}TM-2-PyP. A, spectra at pH values 8.8, 9.5, 9.8, 10.1, 10.3, 10.6, 11.0, 11.2, 11.4, and 12.8 (some spectra have been omitted for clarity) at room temperature. The arrows indicate the direction of change as pH increases from 8.8 to 12.8. B, absorbance at 454 nm versus pH (error bars are smaller than the symbols). The solid line represents the best fit to a three species model (Equation 12) with pK_{a1} = 10.5 and pK_{a2} = 11.4. C, spectra in the regions of 326, 399, 450, 558, and 580 nm were closely examined and lack isosbestic points. As an example, the titration curve at 399 nm is shown.

TABLE III
Axial water pK_{a1} and pK_{a2} obtained by fitting the spectrophotometric titration data to Equation 12

Titration of ~5 μM porphyrin solutions in 0.5 M carbonate buffer in the range of 7.7 < pH < 13.3 at room temperature.

Complex	pK _{a1}	pK _{a2}
Mn ^{III} TM-2-PyP	10.5	11.4
Mn ^{III} TE-2-PyP	10.8	11.1
Mn ^{III} TnPr-2-PyP	11.2	11.2
Mn ^{III} TnBu-2-PyP	11.0	11.2
Mn ^{III} TnHex-2-PyP	11.0	11.1
Mn ^{III} TnOct-2-PyP	10.7	11.0
Mn ^{III} TM-3-PyP	11.5	13.2 ^a
Mn ^{III} TM-4-PyP	11.6	13.4 ^a
Mn ^{III} TSPP ^b	12.3	>13 ^a
Mn ^{III} TCPP ^b	12.6	>13 ^a

^a These values fall beyond the pH range studied.

^b Obtained in 0.05 M carbonate buffer.

whereas Mn^{III}TCPP did not display any significant variation in k_{obs} in the pH range from 6.4 to 7.5. It is important to remember that a value of 10² M⁻¹s⁻¹ is at the low end of the rate constants measurable by the method used herein. The pK_a values of ONOOH obtained in the case of all cationic complexes fall below the literature value of 6.6 although it is higher for the anionic Mn^{III}TSPP (Table II). This variation can be explained if the derived pK_a values belong to the outer-sphere complex between ONOO⁻ and Mn(III) porphyrin, and the value deviates from 6.6 because of the relative stabilization of ONOO⁻ by the electric charge on the Mn(III) porphyrin.

Ionization of Axial Water Molecules. Fig. 2A displays the spectral changes experienced by Mn^{III}TM-2-PyP upon the change in pH from 8.8 to 12.8. No isosbestic point was detectable in the region from 300 to 600 nm, implying that more than one equilibrium is involved. Panel B shows the spectrophotometric titration curve at 454 nm, which is the λ_{max} for this complex at acidic and

27436

Reaction of Manganese Porphyrins with ONOO and CO₂

TABLE IV
Rate constants for the oxidation of manganese porphyrins by CO₂ at room temperature

Complex	Mn(III) ⁺ CO ₂		pK _{a1} ^{axial}	Mn(II) + CO ₂ + h ₁₆
	k _{int}	k _{obs}		
	10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹			10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹
MnTM-2-PyP	2.7 ± 0.1	54 ± 4	10.8	2.1 ± 0.04
MnTFE-2-PyP	3.1 ± 0.2	39 ± 3	11.0	2.4 ± 0.8
MnTnPr-2-PyP	3.7 ± 0.2	41 ± 9	11.1	2.0 ± 0.4
MnTnBu-2-PyP	3.6 ± 0.2	53 ± 9	11.1	3.4 ± 0.7
MnTnHex-2-PyP	3.3 ± 0.3	35 ± 1	10.7	2.4 ± 1.0
MnTnOct-2-PyP	3.2 ± 0.2	32 ± 1	10.5	3.7 ± 0.5
MnTM-3-PyP	3.0 ± 0.2	43 ± 1	11.5	5.4 ± 0.8
MnTM-4-PyP	3.0 ± 0.4	52 ± 1	11.9	4.0 ± 0.6
MnTCPP	12.0 ± 0.3	28*	12.6*	3.5 ± 0.4
MnTSPP	5.3 ± 0.1	12*	12.3*	1.3 ± 0.5

* Values generated by extrapolation using pK_{a1} from Table III.
 † The values of k_{int}, k_{obs}, and pK_{a1}^{axial} were obtained by fitting the observed rate constants of the reaction in Equation 13 to Equation 15. Values of k₁₆ were obtained at pH 10.4.

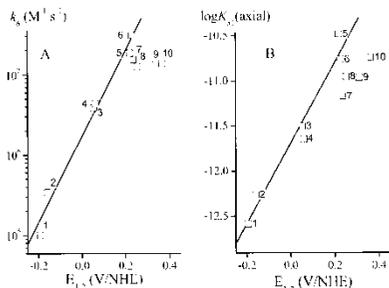


FIG. 6. Correlations between k₀ (panel A) and log K_{ax} (panel B) versus the redox potential of the Mn(III)/Mn(II) couple. The numbers indicate the complexes as follows: 1, MnTCPP; 2, MnTSPP; 3, MnTM-3-PyP; 4, MnTM-4-PyP; 5, MnTM-2-PyP; 6, MnTFE-2-PyP; 7, MnTnPr-2-PyP; 8, MnTnBu-2-PyP; 9, MnTnHex-2-PyP; 10, MnTnOct-2-PyP. The linear fit only considers the first six points in each plot.

TABLE V
Slopes of the linear free energy relationship between the listed properties and the E_{1/2} of the Mn(III)/Mn(II) couple

Property	Slope
	<i>absolute value</i>
pK _{a1} (pyrrolic)	15.1
log k _{int}	7.7
log k ₀	5.6
pK _{a1} (axial)	4.4

* Calculated from values in Reference 5.

[Mn(II) porphyrin] (Table IV). We assumed that k₁₆ obtained at pH 10.4 is similar to that at neutral pH, as neither CO₂ nor Mn(II) porphyrin undergoes acid-base equilibria in this pH range.

DISCUSSION

Reaction of Mn(III) Porphyrins with Peroxynitrite—Mn(III) porphyrin reactivity reflects the influence of the substituents on the porphyrin ring, which is apparent as linear free energy relationships between different physical-chemical properties of both the free ligand and their metal complexes (2, 5). Hence, k₀ correlates with E_{1/2}(Mn(III)/Mn(II)) as shown in Fig. 6A even though the reaction shown in Equation 6 does not involve the couple Mn(II)/Mn(III). In fact, k₀ also correlates with the pK_{a1} of the pyrrolic nitrogens of the porphyrin ring and with the catalytic rate constant of O₂ dismutation in the presence of these

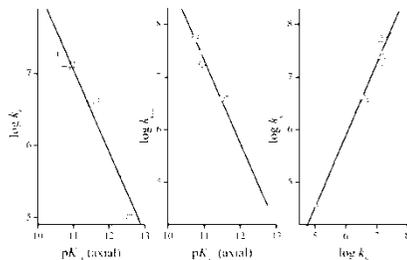


FIG. 7. Correlations among log k₀, pK_{ax} (axial), and log k_{cat} (O₂ dismutation). The values of k_{cat} were taken from Ref. 39.

complexes (not shown). The reactivity of the porphyrins toward ONOO (thus reflects an overall effect of the porphyrin ligand on the metal center. This points to an inner-sphere mechanism where the rate-limiting step is the coordination of ONOO to the metal, and its rate depends on the resonance and inductive effects exerted by the porphyrin on the manganese ion.

The correlation holds as long as the N-alkyl substituents on the pyridinium groups remain small. For substituents longer than ethyl, k₀ diminishes and remains constant at around (1.3 ± 0.1) × 10⁷ M⁻¹ s⁻¹ in going from n-propyl to n-octyl. Apparently, the favorable inductive effect of the ligand (as evidenced from the increase in E_{1/2}) is countered by other effects that may involve the decrease in dielectric constant of the manganese environment. A similar pattern has been found in the dismutation of superoxide catalyzed by manganese porphyrins (39).

Ionization of Axial Water—The pK_{a1} of the axial water also show a linear dependence with E_{1/2} as apparent in Fig. 6B. As is the case with k₀, the trend deviates from linearity with N-alkylpyridinium substituents longer than ethyl. Steric hindrance cannot be invoked in the acid-base equilibrium of the water protons, because the dissociation is a unimolecular process that would be influenced by the local dielectric constant. The water protons are less acidic than expected from the linear relationship, and this is consistent with charge separation in the deprotonation process being less favorable in a lower dielectric environment.

Transmission of Inductive Effect—The inductive effect of the porphyrin substituents is more noticeable with properties closely related to the ligand itself. In Table V, we present the slope of several properties plotted versus E_{1/2}, and it can be seen that the slope diminishes as the observed property belongs to a

Reaction of Manganese Porphyrins with ONOO⁻ and CO₂

27437

part of the molecule farther from the *meso* position. Thus, p*K*_a(pyrrolic) has the highest value, followed by *k*_{cat} and *k*₆ related to the manganese, and then p*K*_a(axial), belonging to the axial water molecules, that perceives the inductive effect through four chemical bonds.

Hydrophobic Effect with Longer Alkyl Substituents—We have seen that *N*-alkyl-2-pyridinium substituents longer than ethyl caused a deviation in the linear correlations with *E*_{ox}. This effect is evident for both *k*₆ and p*K*_a(axial) and is similar to what was observed previously (39) for *k*_{cat} for O₂ dismutation. This led us to suppose that the deviation from linearity should vanish when relating properties that experience the same effect. Fig. 7 shows the relationships among the three parameters, all of which display good linear correlations. This strongly suggests that the effect seen is not related to steric hindrance (that should not be observable through p*K*_a) but arises solely from the decrease in the dielectric constant around the manganese.

Oxidation of Mn(III) Porphyrins by CO₂—The rate constants of the reaction shown in Equation 13 differ minimally for all Mn^{III}(Talkyl)PyP at low pH levels without any noticeable trend as is apparent from Table IV, i.e. *k*₁₃ = (2–4) × 10⁸ M⁻¹ s⁻¹. Mn^{III}TSPP and Mn^{III}TCCP react faster with values of 5.2 × 10⁸ and 1.2 × 10⁹ M⁻¹ s⁻¹, respectively. If the reaction were by an inner-sphere mechanism, the rate constants should follow a trend similar to the oxidation by ONOO⁻, correlating with thermodynamic parameters of the complex and the ligand that reflect the electronic effect of the substituents. Because this was not the case, the reaction shown in Equation 13 should follow an outer-sphere mechanism. In this case the rate constants should correlate with the redox potentials of the Mn(IV)/Mn(III) couple, according to the Marcus theory. The redox potentials have been determined to be very similar for some of the complexes at pH 14 (48), with values of 0.382 V for MnTSPP, 0.388 V for MnTCCP, and 0.406 V for MnTM-2-PyP. Data are scarce at neutral or slightly alkaline pH, and the values available by spectroelectrochemistry for MnTM-4-PyP and MnTM-2-PyP at neutral pH are close to 1.0 V *versus* normal hydrogen electrode (41, 50). Values for MnTCCP can only be extrapolated from results at pH > 10 (48). In any case, all values, either measured or extrapolated, cluster around 1 V *versus* normal hydrogen electrode. The values obtained for the CO₂ reaction, if an outer-sphere mechanism is assumed, imply that the redox potentials of the complexes should differ by less than 0.1 V.

The increment of *k*₁₃ with pII (Fig. 5) correlates with deprotonation of axial water molecules. Our spectrophotometric titration results show that all Mn^{III}(Talkyl)-2(3,4)-PyP have two ionization equilibria in the pH range from 9 to 13.2, whereas Mn^{III}TSPP and Mn^{III}TCCP have higher values. The pII profiles of *k*₁₃ can be fitted using the p*K*_a values obtained through spectrophotometric titration and presented in Table III, but this yields ambiguous results. All Mn^{III}(Talkyl)-2(3,4)-PyP fit well to a single ionization equilibrium model. This can be explained by considering the species H₂O-Mn^{III}P⁺, HO-Mn^{III}P, and O⁻ = Mn^{III}P as before. If HO-Mn^{III}P has a reactivity similar to the average between H₂O-Mn^{III}P⁺ and O⁻ = Mn^{III}P only one p*K*_a^{app} will be visible from the reactivity trend as a function of pH, and that p*K*_a^{app} will be roughly halfway between p*K*_{a1} and p*K*_{a2}. A comparison between the p*K*_a values presented in Tables III and IV shows that this is the case for all Mn^{III}(Talkyl)-2-PyP, within 0.3 pH units.

Our data are not sufficient to estimate the acid-base behavior of the reactivity with Mn^{III}TSPP and Mn^{III}TCCP, but the limiting value at high pH can be estimated at 1.2 × 10⁹ and 2.8 × 10⁹ M⁻¹ s⁻¹, respectively. Considering the p*K*_a obtained

by spectrophotometric titration, further extrapolation is not possible at this stage.

Oxidation of Mn(II) Porphyrins by CO₂—The rate constant of the reaction shown in Equation 16 determined herein by pulse radiolysis falls in the range of 1 to 5 × 10⁹ M⁻¹ s⁻¹, which makes Mn(II) porphyrins good scavengers of CO₂ with reactivities well above those of biologically relevant targets (25).

Peroxynitrite, CO₂ and Their Scavenging—The results presented herein support the idea of manganese porphyrins as valuable tools in the scavenging of peroxynitrite and the species derived from it, such as CO₂. On kinetic grounds, the similar reactivities of all Mn^{II}(Talkyl)-2-PyP make them promising candidates to directly intercept ONOO⁻ and suppress most of the CO₂ that might be formed. The reactions of Mn(III) porphyrins with both CO₂ and ONOO⁻ form O = Mn(IV) porphyrin that reacts preferentially with endogenous antioxidants such as ascorbate and urate (13) and less efficiently with seemingly more critical targets such as thiols and amino acids.

Because the Mn(III) porphyrins can be reduced by biological reductants, such as ascorbate, the Mn(III) porphyrins could mediate the oxidation of such expendable and regeneratable reductants by CO₂ and in so doing protect critical cellular targets. The reactivity of Mn(II) porphyrins with ONOO⁻ remains virtually unexplored, but preliminary data suggest that the reaction is fast and does not produce secondary oxidant radicals.⁴ Finally, the different correlations found here represent an important inferential tool in estimating Mn(III) porphyrin reactivity toward superoxide and peroxynitrite and embody relevant information for drug design directed to oxygen and nitrogen species-mediated tissue injury.

REFERENCES

1. Meenan, B. (1992) *Chem. Rev.* **92**, 1411–1436
2. Batinić-Haberle, I. (2002) *Methods Enzymol.* **349**, 223–230
3. Spasojević, I., Batinić-Haberle, I., Ribanić, Z. S., Matković, Y. M., and Friščević, I. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 6821–6827
4. Day, B. J., Fridovich, I., and Crapo, J. D. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **347**, 256–262
5. Batinić-Haberle, I., Spasojević, I., Hamblett, P., Bear, L., Crumbliss, A. L., and Fridovich, I. (1999) *Inorg. Chem.* **38**, 4014–4022
6. Mackensen, G. B., Patel, M., Sheng, H., Calsi, C. L., Batinić-Haberle, I., Day, B. J., Lantz, L. P., Fridovich, I., Crapo, J. D., Pearlstein, R. D., and Warner, D. S. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 4582–4592
7. Sheng, H., England, J. J., Bowler, R., Patel, M., Batinić-Haberle, I., Calsi, C. L., Day, B. J., Pearlstein, R. D., Crapo, J. D., and Warner, D. S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 947–951
8. Pignatelli, B. D., Flores, S. C., Cray, C., Koeppl, J., Batinić-Haberle, I., Crapo, J. D., Ray, R., Radabaugh, R., Young, K., Bradley, E., and Hawkins, K. (2002) *Dioxides* **51**, 347–355
9. Aslan, M., Ryan, T. M., Adler, B., Townes, T. M., Parks, D. A., Thompson, J. A., Tausson, A., Ghidwin, M. T., Patel, R. P., Turpey, M. M., Batinić-Haberle, I., White, C. R., and Freeman, B. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1215–1220
10. Vignjević, Z., Batinić-Haberle, I., Ribanić, Z. S., Fong, Q. F., Kang, S. K., Spasojević, I., Samulski, T. V., Fridovich, I., Dowhst, M. W., and Anselmi, M. S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 857–863
11. Patel, M. and Day, B. J. (1999) *Trends. Pharmacol. Sci.* **20**, 359–364
12. Ferrer-Sueti, G., Ruiz-Ruiz, L., and Radi, R. (1997) *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1358–1364
13. Ferrer-Sueti, G., Batinić-Haberle, I., Spasojević, I., Fridovich, I., and Radi, R. (1999) *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 442–449
14. Ferrer-Sueti, G., Quijón, C., Alvarez, R., and Radi, R. (2002) *Methods Enzymol.* **349**, 23–37
15. Lee, J., Hunt, J. A., and Graves, J. T. (1997) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 2015–2018
16. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1620–1624
17. Radi, R., Patajko, G., Alvarez, M. N., Nayflat, M., and Cayota, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 464–468
18. Radi, R., Cosgova, T. P., Beckman, J. S., and Freeman, B. A. (1993) *Biochem. J.* **290**, 51–57
19. Lazar, S. V., and Hurst, J. K. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8867–8868
20. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 49–58
21. Bonini, M. G., Radi, R., Ferrer-Sueti, G., Ferreira, A. M., and Augusto, O. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10802–10806
22. Goldstein, S., and Czapski, G. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3438–3443

⁴ G. Ferrer-Sueti, I. Batinić-Haberle, and R. Radi, manuscript in preparation.

27438

Reaction of Manganese Porphyrins with ONOO⁻ and CO₂

23. Lyman, S. V., and Hurst, J. K. (1998) *Inorg. Chem.* **37**, 294–301
24. Hodges, G. R., and Ingold, K. U. J. (1969) *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 16695
25. Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Tamaris, F., Santos, C. C., and De Almeida, S. L. (2002) *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 841–850
26. Zhong, H., Joseph, J., Garney, M., Becker, D., and Kalyanaram, B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 1013–1020
27. Spasojevic, I., Botinčić-Haberle, L., and Fridovich, I. (2000) *Nitric Oxide* **4**, 526–533
28. Paulkner, K. M., Liochev, S. L., and Fridovich, I. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 20471–20476
29. Hambright, P., and Chock, P. B. (1974) *Inorg. Chem.* **13**, 3029–3033
30. Dugan, L. A., Harriman, A., and Porter, G. (1980) *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **76**, 1415
31. Pastermack, R. F., Banth, A., Pastermark, J. M., and Johnson, C. S. (1981) *J. Inorg. Biochem.* **15**, 261–267
32. Weeks, J. L., and Rabani, J. (1966) *J. Phys. Chem.* **70**, 2100–2106
33. Bellar, D., Czapski, G., and Dachevny, L. (1970) *J. Phys. Chem.* **74**, 2206–2210
34. Liochev, S. L., and Fridovich, I. (1999) *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 1444–1447
35. Czapski, G., Lyman, S., and Schwarz, H. (1999) *J. Phys. Chem. A* **103**, 3447–3450
36. Huie, R., Clifton, C., and Neta, P. (1991) *Radiat. Phys. Chem.* **38**, 477–481
37. Adams, G. E., Aldrich, J. E., Esby, R. H., Cundall, R. D., Redpath, J. L., and Willson, R. L. (1972) *Radiat. Res.* **49**, 278–289
38. Chen, S. N., and Hoffman, M. Z. (1973) *Radiat. Res.* **56**, 40–47
39. Botinčić-Haberle, L., Spasojevic, I., Stevens, R. D., Hambright, P., and Fridovich, I. (2002) *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2680–2696
40. Yushmanov, Y. E., Imanishi, H., Tamimaga, T. T., and Tóth, M. (1996) *J. Inorg. Biochem.* **61**, 233–250
41. Chen, F., Cheng, S., Yu, C., Liu, M., and Su, Y. O. (1999) *J. Electroanal. Chem.* **474**, 52–59
42. Harriman, A., and Porter, G. (1979) *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **75**, 1532
43. Radt, R., Beckman, J. S., Do-6, K. M., and Freeman, B. A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4244–4250
44. Scaife, C. W. J., and Wilkins, R. G. (1980) *Inorg. Chem.* **19**, 3244–3247
45. Buxton, J. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P., and Ross, A. B. (1988) *J. Phys. Chem. Ref. Data* **17**, 513–886
46. Kissner, R., Nauseef, T., Baggett, P., Lye, P. G., and Koppend, W. H. (1997) *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1285–1292
47. Meroy, G., Lind, J., Goldstein, S., and Czapski, G. (1999) *J. Phys. Chem.* **103**, 5685–5691
48. Carniovi, N., Harriman, A., and Porter, G. (1982) *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 931
49. Morehouse, K. M., and Neta, P. (1981) *J. Phys. Chem.* **85**, 1575–1579
50. Liu, M., and Su, O. (1997) *J. Electroanal. Chem.* **426**, 197–203

Trabajo 3. Aplicación de un ciclo Mn^{III}/Mn^{IV} a la reducción de $ONOO^-$

Trostchansky, A., G. Ferrer-Sueta, C. Batthyany, H. Botti, I. Batinic-Haberle, R. Radi and H. Rubbo (2003). "Peroxynitrite flux-mediated LDL oxidation is inhibited by manganese porphyrins in the presence of uric acid." *Free Radic Biol Med* **35**(10): 1293-1300.

The protective effects of Mn(III)porphyrins should predominate under in vivo conditions having plasma uric acid concentration range between 150 and 500 μM .

El trabajo 3 se incluye en esta tesis aunque se trata de un trabajo realizado principalmente por nuestro colega y camarada Andrés Trostchansky. Sin embargo, dado que colaboramos en el diseño y la discusión de dicho trabajo y porque constituye una aplicación directa de las reacciones caracterizadas aquí, haremos un resumen de los resultados y la discusión.

El trabajo aborda la aplicación del ciclo catalítico de consumo de peroxinitrito propuesto en los trabajos 1 y 2. El blanco de oxidación estudiado fue lipoproteína de baja densidad (LDL), el sistema oxidante era $ONOO^-$ en un flujo de $1 \mu M \text{ min}^{-1}$ y el sistema reductor constaba de una de tres MnPorfirinas (MnTCCPP, MnTE-2-PyP, MnTOct-2-PyP) como catalizador y urato como reductor. Como criterios de evaluación para la oxidación de LDL se midieron la movilidad electroforética relativa en gel de agarosa, la concentración de hidroperóxidos en ésteres de colesterol y la concentración de γ -tocoferol. A continuación se presenta el trabajo como tal y después de él discutiremos los resultados concernientes a la movilidad electroforética de LDL y el contenido de hidroperóxidos ya que permiten ejemplificar la actividad catalítica de las MnPorfirinas y hacer énfasis en un par de conceptos poco intuitivos que no se incluyeron en la publicación más que en forma somera.



PEROXYNITRITE FLUX-MEDIATED LDL OXIDATION IS INHIBITED BY MANGANESE PORPHYRINS IN THE PRESENCE OF URIC ACID

ANDRÉS TROSTCHANSKY,* GERARDO FERRER-SUETA,*[‡] CARLOS BATTYÁNY,* HORACIO BOTTI,*
 INÉS BATINIĆ-HABERLE,[‡] RAFAEL RADL,* and HOMERO RUBBO*

*Departamento de Bioquímica and Center for Free Radical and Biomedical Research, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; [‡]Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; and [‡]Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA

(Received 7 March 2003; Revised 24 June 2003; Accepted 31 July 2003)

Abstract—We have studied the role of three Mn(III)porphyrins differing in charge, alkyl substituent length and reactivity, on LDL exposed to low fluxes of peroxynitrite (PN) in the presence of uric acid. Mn(III)porphyrins (5 μ M, MnTf-2-PyP⁵⁺, MnTnOct-2-PyP⁵⁺, and MnTcPP³⁺) plus uric acid (300 μ M) inhibited cholesteryl ester hydroperoxide formation, changes in RfM as well as spared α - and γ -tocopherol. MnTnOct-2-PyP⁵⁺, the more lipophilic compound, was the most effective in protecting LDL lipids, while MnTcPP³⁺ exerted the lesser protection. Mn(III)porphyrins react fast with PN ($\sim 10^5$ – 10^7 M⁻¹ s⁻¹) to yield a O–Mn(IV) complex. The stoichiometry of uric acid consumption was ~ 1.7 moles per mol of PN, in agreement with reactions with both the O=Mn(IV) complex and nitrogen dioxide. A shift from an anti- to a pro-oxidant action of the Mn(III)porphyrin was observed after uric acid was significantly consumed, supporting competition reactions between LDL targets and uric acid for the O=Mn(IV) complex. Overall, the data is consistent with the catalytic reduction of PN in a cycle that involves a one electron oxidation of Mn(III) to Mn(IV) by PN followed by the reduction back to Mn(III) by uric acid. These antioxidant effects should predominate under *in vivo* conditions having plasma uric acid concentration range between 150 and 500 μ M. © 2003 Elsevier Inc.

Keywords LDL, Peroxynitrite, Mn(III)porphyrins, Lipid oxidation, Atherogenesis, Free radicals, Nitric oxide

INTRODUCTION

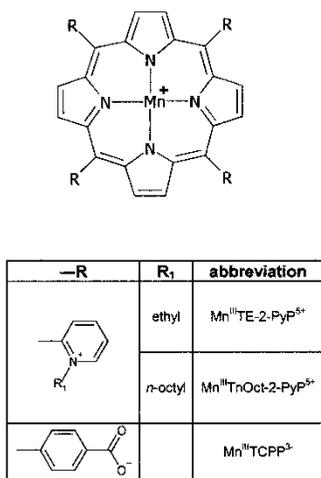
Oxidative modifications of low density lipoprotein (LDL) by reactive oxygen- and nitrogen-derived species are implicated as key early events in atherogenesis [1–3]. Peroxynitrite (PN, ONOO⁻ + ONOOH) represents a biologically relevant oxidizing and nitrating agent that is formed from the diffusion-limited reaction between nitric oxide (NO) and superoxide (O₂^{-•}, [4,5]). Infusion of PN into LDL preparations can be a representative model of the expected interactions of low fluxes of PN production by vascular cells. In fact, PN infusion causes high yields of lipid and protein oxidation as well as lipid-protein adducts formation [6]. Peroxynitrite-modified LDL binds with high affinity to scavenger receptors

leading to the accumulation of oxidized cholesteryl esters and foam cell formation [7,8].

Manganese(III) porphyrins (Mn(III)porphyrins) possess several antioxidant properties, including their scavenging of O₂^{-•}, hydrogen peroxide, lipid radicals, and PN [9–12]. They have already revealed protective actions in different animal model of oxidative stress injury [13–16]. The scavenging properties of metalloporphyrins can be altered by modifying the porphyrin substituents [9,10]. One mechanism by which Mn(III)porphyrins scavenge PN involves the formation of an O=Mn(IV) complex ($k \sim 10^7$ M⁻¹ s⁻¹) and the subsequent reduction of O=Mn(IV) by urate, ascorbate, or glutathione [11]. This reduction step converts the simple scavenging of PN into a catalytic reduction cycle that is very efficient in the presence of excess of reductants [12,17]. Mn(III)porphyrins can lead to LDL oxidation but interestingly, in the presence of reductants, they are able to inhibit metal ion-catalyzed lipid and LDL oxidation [10,18].

Address correspondence to: Homero Rubbo, Ph.D., Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Avda. General Flores 2125, Montevideo, Uruguay 11800. Tel: +5982 (924) 9561; Fax: +5982 (924) 9563; E-Mail: hrubbo@fmed.edu.uy.

1294

A. TROSTOLANSKY *et al.*

Scheme 1. Structure of manganese porphyrins.

Uric acid has been proposed as an important antioxidant molecule present in human blood plasma at concentrations in the range of 150–500 μM [19,20]. The antioxidant properties of uric acid have been attributed to its ability to react with biological oxidants such as PN-derived radicals or hypochlorous acid [19,21–24].

The general aim of this work is to define whether Mn(III)porphyrins could prevent from PN-induced LDL oxidation under biologically relevant conditions. For this, we compared the effect of two cationic Mn(III)porphyrins, manganese(III) 5,10,15,20-tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl) porphyrin (MnTE-2-PyP⁵⁺) and manganese(III) 5,10,15,20-tetrakis(*N*-octylpyridinium-2-yl) porphyrin (MnTnOct-2-PyP⁵⁺) in the presence and absence of uric acid. Both Mn(III)porphyrins have similar chemical reactivities but differ in hydrophobicity (alkyl substituent length, being the MnTnOct-2-PyP⁵⁺ the more lipophilic, Scheme 1). For comparative purposes, we also studied the effect of manganese(III) 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxylatophenyl) porphyrin (MnTCPP³⁻), an anionic compound having a lower reaction rate constant with PN ($k = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [25]).

EXPERIMENTAL METHODS

Materials

Diethylenetriaminepentaacetic acid (dtpa), potassium bromide, agarose, and sodium phosphate were from

Sigma (St. Louis, MO, USA). Methanol, 2-propanol, acetonitrile, and hexane (all of HPLC grade) were supplied by Mallinckrodt UltimAR (Phillipsburg, NJ, USA). Mn(II)porphyrins were prepared as described previously [26,27]. All other reagents were obtained at the highest purity available from standard supply sources.

Preparation of LDL and PN

Human LDL was first isolated from fresh plasma by ultracentrifugation through a potassium bromide gradient [28] and further purified by size exclusion HPLC (Superose 6 HR 10/30 column) as described previously [29]. PN was synthesized from sodium nitrite and hydrogen peroxide using a quenched-flow reactor [30,31]. Residual H_2O_2 was eliminated with MnO_2 and remaining nitrite was <20% of PN content. PN concentration was determined spectrophotometrically at 302 nm ($\epsilon = 1.67 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). PN, first decomposed in 200 mM sodium phosphate, pH 7.4 was tested as a control. To prevent further peroxidation of lipids during assay procedures, butylated hydroxytoluene (0.025%) was routinely added after incubations.

Reaction mixtures

PN was added to LDL (0.4 mg ml^{-1}) as a continuous flux ($1 \mu\text{M min}^{-1}$) using a motor-driven syringe pump (SAGE Instruments, Boston, MA, USA; [6]). Incubations were performed at 37°C in 200 mM phosphate buffer, pH 7.2. 0.1 mM dtpa in the absence or presence of 5 μM MnTE-2-PyP⁵⁺, MnTnOct-2-PyP⁵⁺, or MnTCPP³⁻ and/or uric acid (300 μM).

Biochemical analyses

Changes in the net charge of the lipoprotein were analyzed by agarose gel electrophoresis [32]. Cholesteryl ester hydroperoxides (CE-OOH) were extracted using methanol/hexane and analyzed by HPLC in a reverse-phase LC-18 column (25 \times 0.46 cm, 5 μm ; [33]). Analysis of oxidation products was performed using acetonitrile/isopropanol/water (44/54/2, v/v/v) with ultraviolet (UV) spectral detection at 210 and 234 nm. The CE-OOH standard was prepared by incubating cholesteryl linoleate emulsified in 10 mM sodium dodecyl sulfate for 120 min at 37°C under stirring in the presence of the azo-compound 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. The extent of modification of α - and γ -tocopherol (α -TOH and γ -TOH, [34]) and uric acid consumption [35] were determined by reverse-phase HPLC. Samples (50 μl) were mixed with 450 μl methanol and vortexed for 10 s twice, centrifuged at 10,000 $\times g$ for 10 min at 4°C. Analyses were performed on a Supelcosil LC-18 column (25 \times 0.46 cm, 5 μm), mobile phase of 100% methanol at a flow rate of 1 ml min^{-1} .

The detection system included a Gilson Model 122 Fluorometric Detector ($\lambda_{ex} = 295$, $\lambda_{em} = 330$ nm). Quantitative analysis was performed by comparing peak areas with corresponding standard curves [34]. Uric acid was quantitated by HPLC using an isocratic solvent system consisting of 25 mM potassium phosphate, pH 4.8 and methanol (9.5/0.5) on a Supelcosil LC-18 column (25×0.46 cm, $5 \mu\text{m}$) having UV spectral detection at 292 and 266 nm [35].

RESULTS AND DISCUSSION

Mn(III)porphyrins plus uric acid inhibit PN-mediated increase of REM

To investigate the protective role of Mn(III)porphyrins on PN-mediated LDL oxidation in the presence of uric acid, we first analyzed changes in REM, indicative of apolipoprotein B-100 (apo B-100) modification and lipid-protein adduct formation [6]. Peroxynitrite infusion increased REM in LDL with time (Figs. 1A–1C, lanes 2–4). A greater REM of LDL was observed when the Mn(III)porphyrin was added before PN infusion (Figs. 1A and 1B, lanes 5–7) or even in the absence of PN (data not shown). In contrast, the simultaneous addition of Mn(III)porphyrin and uric acid completely inhibited changes in REM (Figs. 1A and 1B, lanes 8–10). This action cannot be solely explained by the antioxidant properties of uric acid, since in the absence of Mn(II)-Dporphyrin uric acid afforded minimal protection (Fig. 1C, lanes 5–7).

Inhibition of lipid oxidation by Mn(III)porphyrin-uric acid

The physiological fluxes of PN used here ($1 \mu\text{M min}^{-1}$) induced CE-OOH formation in LDL (Fig. 2) in a process that was enhanced by the presence of all tested Mn(III)porphyrins (Fig. 2, inset). Uric acid was able to partially decrease CE-OOH formation, while Mn(III)porphyrin plus uric acid prevented lipid oxidation in a greater manner (Fig. 2). This protective action was always greater for MnTnOct-2-PyP⁵⁺ or MnTE-2-PyP⁵⁺ than for MnTCP³⁺, being MnTnOct-2-PyP⁵⁺ the most effective compound (Fig. 2). The antioxidant effect of Mn(III)porphyrins is probably due to its ability to catalytically decompose PN in the presence of uric acid [11], thus inhibiting radical-mediated cholesteryl ester oxidation. These protective actions were not due to the well-known uric acid scavenging of lipid radicals [36,37] because (i) uric acid is unable to scavenge lipid radicals in hydrophobic environments such as the LDL core [38] and (ii) MnTCP³⁺ reaction with PN is two orders of magnitude slower than that of MnTnOct-2-PyP⁵⁺ or MnTE-2-PyP⁵⁺ and exhibits in the presence of uric acid,

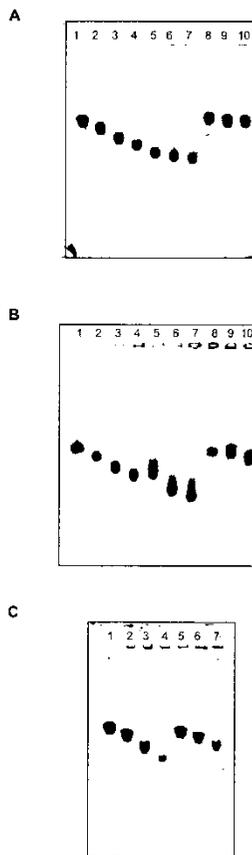


Fig. 1. Mn(III)porphyrin plus uric acid inhibition of relative electrophoretic mobility (REM) changes during peroxynitrite (PN)-mediated low-density lipoprotein (LDL) oxidation. LDL (0.4 mg ml^{-1}) was oxidized by PN ($1 \mu\text{M min}^{-1}$) in the presence or absence of $5 \mu\text{M}$ manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(*N*-octylpyridinium-2-yl) porphyrin (MnTnOct-2-PyP⁵⁺), $5 \mu\text{M}$ manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl) porphyrin (MnTE-2-PyP⁵⁺), and/or $300 \mu\text{M}$ uric acid. REM was determined at 60, 120, and 200 min as described in Experimental Methods. (A) Lane 1: native LDL; lanes 2–4: LDL plus PN; lanes 5–7: LDL plus PN plus MnTnOct-2-PyP⁵⁺; lanes 8–10: LDL plus PN plus MnTnOct-2-PyP⁵⁺ plus uric acid. (B) Lanes 1–4, same conditions as in (A); lanes 5–7: LDL plus PN plus MnTE-2-PyP⁵⁺; lanes 8–10: LDL plus PN plus MnTE-2-PyP⁵⁺ plus uric acid. (C) Lanes 1–4, same conditions as in (A); lanes 5–7: LDL plus PN plus uric acid. LDL at 37°C showed nonsignificant changes in REM after 200 min. Data is representative of three independent experiments.

1296

A. TRÖSTGLANSKY *et al.*

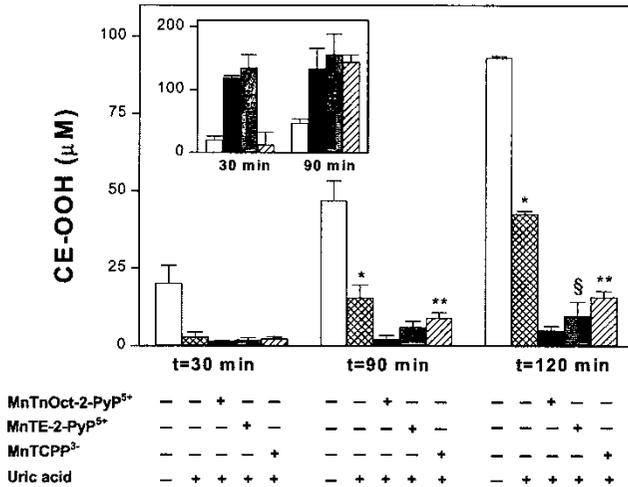


Fig. 2. Inhibition of cholesterol ester hydroperoxide (CE-OOH) formation by Mn(II)porphyrins-uric acid. Low-density lipoprotein (LDL) was oxidized in the presence of 1 µM min⁻¹ peroxynitrite (PN) and CE-OOH formation was determined at 30, 90, and 120 min as described in Experimental Methods. Incubations were performed in the presence or absence of uric acid (300 µM); manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(N-octylpyridinium-2-yl) porphyrin (MnTnOct-2-PyP⁵⁺; 5 µM), manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl) porphyrin (MnTE-2-PyP⁵⁺; 5 µM) or manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(4-carboxylatophenyl) porphyrin (MnTCPP³; 5 µM). Data are mean ± SD with *n* = 5; **p* < 0.05 vs. PN plus uric acid plus MnTnOct-2-PyP⁵⁺; PN plus uric acid plus MnTE-2-PyP⁵⁺; PN plus uric acid plus MnTCPP³; ***p* < 0.05 vs. PN plus uric acid plus MnTnOct-2-PyP⁵⁺; **p* < 0.05 vs. PN plus uric acid plus MnTE-2-PyP⁵⁺; **p* < 0.05 vs. PN plus uric acid plus MnTCPP³. Inset: CE-OOH formation during PN-mediated LDL oxidation (open bar) in the presence of MnTnOct-2-PyP⁵⁺ (black bar), MnTE-2-PyP⁵⁺ (gray bar), or MnTCPP³ (hatched bar).

Table I. Inhibition of α- and γ-Tocopherol Consumption by Mn(II)porphyrins

Condition	α-Tocopherol (mol/mol LDL)		γ-Tocopherol (mol/mol LDL)	
	45 min	120 min	45 min	120 min
Control	6.1 ± 0.3	6.2 ± 0.2	0.23	0.23
PN	0.8 ± 0.6	≤ 0.1	0.16	≤ 0.1
MnTnOct-2-PyP ⁵⁺	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1
MnTE-2-PyP ⁵⁺	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1
MnTCPP ³	4.3 ± 0.4	3.6 ± 1.7	0.16	0.13
PN, uric acid	5.4 ± 0.5	5.3 ± 0.8	0.21	0.20
PN, MnTnOct-2-PyP ⁵⁺	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1
PN, MnTE-2-PyP ⁵⁺	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1
PN, MnTCPP ³	0.5 ± 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1
PN, MnTnOct-2-PyP ⁵⁺ , uric acid	4.0 ± 0.7	1.7 ± 0.6	0.21	0.13
PN, MnTE-2-PyP ⁵⁺ , uric acid	4.2 ± 0.6	1.0 ± 0.8	0.20	0.13
PN, MnTCPP ³ , uric acid	3.8 ± 1.4	1.1 ± 0.9	0.16	0.07

LDL = low-density lipoprotein; PN = peroxynitrite.
 MnTnOct-2-PyP⁵⁺ = manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(N-octylpyridinium-2-yl) porphyrin.
 MnTE-2-PyP⁵⁺ = manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl) porphyrin.
 MnTCPP³ = manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(4-carboxylatophenyl) porphyrin.
 LDL was oxidized as in Fig. 1 in the presence of MnTnOct-2-PyP⁵⁺ (5 µM), MnTE-2-PyP⁵⁺ (5 µM), MnTCPP³ (5 µM), and/or uric acid (0.3 mM); α-tocopherol and γ-tocopherol content were determined by high-pressure liquid chromatography as in Experimental Methods. Experimental error for γ-tocopherol determination was less than 10% in all cases. Data are mean ± SD, *n* = 5.

an expectedly lower (but significant) protective action (Fig. 2). Both MnTnOct-2-PyP⁵⁺ and MnTE-2-PyP⁵⁺ are equally potent catalytic antioxidants with respect to a number of reactive species such as O₂^{•-}, carbonate radical (CO₃^{•-}) or PN [25,26]. However, they differ in lipophilicity, with MnTnOct-2-PyP⁵⁺ being the more hydrophobic [26]. This could explain why the *n*-octyl-substituted porphyrin protected the LDL lipid core better than MnTE-2-PyP⁵⁺.

It has been previously reported that copper (Cu²⁺)-mediated lipid oxidation in LDL is enhanced by MnTE-2-PyP⁵⁺ in the absence of reductants, supporting a pro-oxidant reaction of the Mn(III)porphyrin with preformed lipid hydroperoxides (LOOH) [18]. However, copper does not react directly with Mn(III)porphyrins as PN does. Moreover, Mn(III)porphyrin reaction with LOOH has a second-order rate constant of $9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [18], which is two to four orders of magnitude lower than the rate constants reported for the reactions between PN with Mn(III)porphyrins and of uric acid with the O = Mn(IV) complex, respectively ($\sim 10^5$ – $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [11,12]). In our experimental conditions, these last two reactions are more relevant to explain the antioxidant actions of Mn(III)porphyrins in the presence of uric acid than the preformed LOOH reactions reported during copper-mediated LDL oxidation. It should be noted that the reductants used before (glutathione, ascorbate) are able to reduce both Mn(IV) to Mn(III) and Mn(III) to Mn(II) [11,12]. Uric acid reacts slowly with PN ($k = 155$ – $480 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [19,35]), having the ability to perform Mn(IV)-but not Mn(III) reduction. In this way, it was chosen in our system not only because of its high plasma concentration but also to avoid the Mn(II) chemistry (e.g., Mn(II) reaction with PN, [11]).

Mn(III)porphyrin-uric acid sparing of α - and γ -tocopherol

Because lipid oxidation processes undergo in parallel with vitamin E oxidation, LDL was incubated with PN in the absence or presence of Mn(III)porphyrin plus uric acid. Both α - and γ -TOH were depleted by PN in a process that was prevented by MnTnOct-2-PyP⁵⁺ or MnTE-2-PyP⁵⁺ plus uric acid (Table 1). MnTCPP³⁺ spared α - and γ -TOH to a similar extent than the cationic porphyrins (Table 1). In contrast, the LDL incubated with Mn(III)porphyrins in the absence of uric acid was rapidly depleted of vitamin E, with MnTCPP³⁺ exhibiting lower oxidative damage. This is consistent with the observed rapid changes in REM (Fig. 1) and CF-OOH formation (Fig. 2). Surprisingly, uric acid afforded greater vitamin E-sparing effect than Mn(III)porphyrins plus uric acid (Table 1). This apparent discrepancy with the data obtained with REM (Fig. 1) and CE-OOH for-

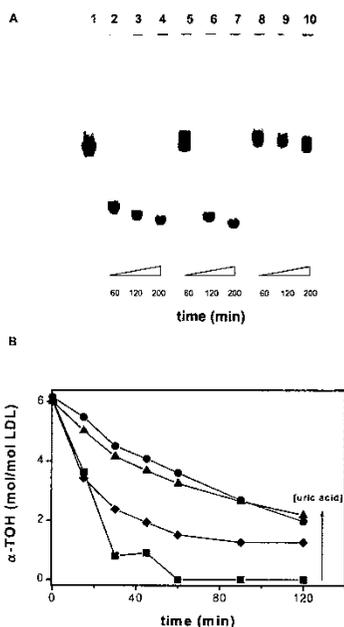


Fig. 3. Dose-dependent effect of uric acid on manganese(III),10,15,20-tetrakis(N-octylpyridinium-2-yl) porphyrin (MnTnOct-2-PyP⁵⁺) antioxidant action. (A) Low-density lipoprotein (LDL) was oxidized by PN ($1 \mu\text{M min}^{-1}$) in the presence of $5 \mu\text{M}$ MnTnOct-2-PyP⁵⁺ and 50, 150, or 300 μM uric acid and relative electrophoretic mobility (REM) analyzed as in Fig. 1. Lane 1: native LDL; lanes 2–4: LDL, peroxyinitrate (PN), MnTnOct-2-PyP⁵⁺; 50 μM uric acid; lanes 5–7: LDL, PN, MnTnOct-2-PyP⁵⁺; 150 μM uric acid; lanes 8–10: LDL, PN, MnTnOct-2-PyP⁵⁺; 300 μM uric acid. (B) α -Tocopherol consumption during PN flux-mediated LDL oxidation was determined as in Fig. 2. LDL was oxidized in the presence of MnTnOct-2-PyP⁵⁺ ($5 \mu\text{M}$) and 0 (\blacksquare), 150 (\blacklozenge), 300 (\blacktriangle), and 500 μM (\bullet) uric acid.

mation (Fig. 2) can be reconciled, taking into account that Mn(V)porphyrins efficiently oxidize α -TOH in a manner that is only partially outcompeted by uric acid [12].

Dependence on uric acid concentration

Finally, we studied the dependence of the antioxidant action of Mn(III)porphyrins on uric acid concentration. Changes in REM and α -TOH consumption during LDL oxidation were determined in the presence of MnTnOct-2-PyP⁵⁺ incubated with 50–500 μM uric acid. A net pro-oxidant or antioxidant action of MnTnOct-2-PyP⁵⁺ was observed (Fig. 3A), depending on the initial uric acid concentrations (50 vs. 300 μM , respectively). While

1298

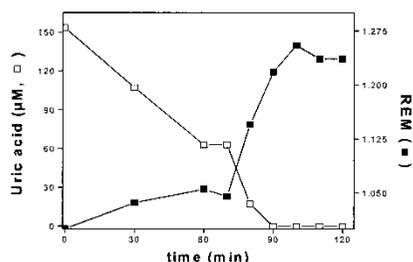
A. TROSTCHANSKY *et al.*

Fig. 4. Time course of uric acid consumption and changes in relative electrophoretic mobility (REM). Low-density lipoprotein (0.4 mg ml⁻¹) was oxidized as in Fig. 3, in the presence of manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(N-octylpyridinium-2-yl) porphyrin (MnTnOct-2-PyP²⁺; 5 µM) and 150 µM uric acid. Uric acid content (□) and changes in REM (■) were determined at different times. Data is representative of two independent experiments.

α -TOH was spared by MnTnOct-2-PyP²⁺/uric acid (Table 1) this protection was greater at high uric acid concentrations (Fig. 3B).

To further understand the balance between uric acid and PN during LDL oxidation, we analyzed in parallel changes in REM and uric acid consumption (Fig. 4). A low and physiological concentration of uric acid (150 µM) was chosen to demonstrate a shift from an antioxidant to a pro-oxidant action of MnTnOct-2-PyP²⁺ (Fig. 3A). Under these conditions, uric acid was totally depleted within 90 min with a stoichiometry of ~1.7 moles per mol of infused PN. This shift on Mn(III)porphyrin function occurred before uric acid was fully depleted, supporting competition reactions between LDL components and uric acid for the O=Mn(IV) complex. These competition reactions were not present at the highest uric acid concentration tested (300 µM), where uric acid was still enough (data not shown) to inhibit LDL oxidation (Fig. 3). The protective effects of Mn(III)porphyrins should predominate under in vivo conditions having plasma uric acid concentration range between 150 and 500 µM.

Mechanistic proposal for the protective role of Mn(III)porphyrins on PN-mediated LDL oxidation in the presence of uric acid

Our results lead us to propose the following mechanism for the protective action of Mn(III)porphyrins plus uric acid against PN flux mediated- LDL oxidation (Fig. 5): Mn(III) reacts with PN yielding nitrogen dioxide (NO_2) and an O=Mn(IV) complex that can be reduced back to Mn(III) by LDL components (i.e., apoB-100 amino acid residues, α -TOH, preformed LOOH). Also, PN or LOO[•] can oxidize α -TOH to yield α -tocopheroxyl

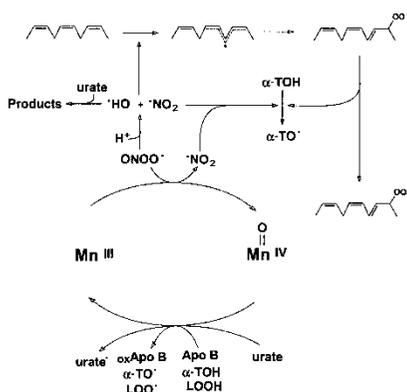


Fig. 5. Proposed protective mechanism of Mn(III)porphyrins during peroxynitrite-mediated low-density lipoprotein oxidation.

radical (α -TO[•]). O=Mn(IV) is also reduced when uric acid is present resulting in a catalytic decomposition of PN, thus preventing apoB-100, lipid and partially α -TOH oxidation. Finally, the consumption of ~1.7 moles of uric acid per mol of PN should be explained taking account that uric acid can react with both O=Mn(IV) and NO_2 ($k \sim 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, [39]). We conclude that Mn(III)porphyrins should be useful to limit oxidative damage to LDL by PN in vivo by using uric acid as a reductant, a normal excretion product of purine metabolism present at high concentration in the intravascular space.

Acknowledgements— This work was supported from FOGARTY-NIH to H.R. and R.R., Pfizer Uruguay Laboratories-Manuel Perez Foundation to H.R. and C.B., International Centre of Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB, Trieste, Italy), and the Howard Hughes Medical Institute (HHMI, USA) to R.R.; A.T., C.B., and H.B. were partially supported by fellowships from Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA, Uruguay). HBI is grateful for financial support from the Christopher Reeve Paralysis Foundation, BA1-0103-1, and from Acolus/Incara Pharmaceuticals, Research Triangle Park, NC. R.R. is a Howard Hughes International Research Scholar and a fellow of the John Simon Guggenheim Memorial Foundation.

REFERENCES

- [1] Leeuwenburgh, C.; Hardy, M. M.; Hazen, S. L.; Wagner, P.; Oh-ishi, S.; Steinbrecher, U. P.; Heinecke, J. W. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J. Biol. Chem.* 272:1433-1436, 1997.
- [2] Rubbo, H.; Trostchansky, A.; Boti, H.; Battihany, C. Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein. *Biol. Chem.* 383:547-552, 2002.
- [3] Steinberg, D.; Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Khoo, J. C.; Witztum, J. L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density

- lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* **320**:915–924; 1989.
- [4] Radi, R.; Denicola, A.; Alvarez, B.; Ferrer, G.; Rubbo, H. The biological chemistry of peroxynitrite. In: Ignarro, L. J., ed. *Nitric oxide biology and pathobiology*. San Diego: Academic Press; 2000:57–82.
- [5] Ischiropoulos, H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**:1–11; 1998.
- [6] Trotschiansky, A.; Bathany, C.; Botti, H.; Radi, R.; Denicola, A.; Rubbo, H. Formation of lipid-protein adducts in low-density lipoprotein by fluxes of peroxynitrite and its inhibition by nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **395**:225–232; 2001.
- [7] Graham, A.; Hogg, N.; Kalyanaram, B.; O'Leary, V.; Darley-Usmar, V.; Moncada, S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett.* **330**:181–185; 1993.
- [8] Guy, R. A.; Maguire, G. T.; Crandall, L.; Connelly, P. W.; Kain, K. C. Characterization of peroxynitrite-oxidized low density lipoprotein binding to human CD36. *Atherosclerosis* **155**:19–28; 2001.
- [9] Batinic-Haberle, I.; Benov, L.; Spasojevic, I.; Fridovich, I. The ortho effect makes manganese(II) meso-tetraakis(N-methylpyridinium-2-yl)porphyrin a powerful and potentially useful superoxide dismutase mimic. *J. Biol. Chem.* **273**:24521–24528; 1998.
- [10] Day, B. J.; Batinic-Haberle, I.; Crapo, J. D. Metalloporphyrins are potent inhibitors of lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:730–736; 1999.
- [11] Ferrer-Sueta, G.; Batinic-Haberle, I.; Spasojevic, I.; Fridovich, I.; Radi, R. Catalytic scavenging of peroxynitrite by isomeric Mn(II)N-methylpyridylporphyrins in the presence of reductants. *Chem. Res. Toxicol.* **12**:442–449; 1999.
- [12] Lee, J.; Hunt, J. A.; Groves, J. T. Manganese porphyrins as redox-coupled peroxynitrite reductases. *J. Am. Chem. Soc.* **120**:6053–6061; 1998.
- [13] Bowler, R. P.; Arcareoli, J.; Abraham, E.; Patel, M.; Chang, L. Y.; Crapo, J. D. Evidence for extracellular superoxide dismutase as a mediator of hemorrhage-induced lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **284**:L680–L687; 2003.
- [14] Wang, W.; Jitikanont, S.; Falk, S. A.; Li, P.; Feng, L.; Gengaro, P. E.; Poole, B. D.; Bowler, R. P.; Day, B. J.; Crapo, J. D.; Schrier, R. W. Interaction among nitric oxide, reactive oxygen species, and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **284**:F532–F537; 2003.
- [15] Sheng, H.; Englund, J. J.; Bowler, R. P.; Batinic-Haberle, I.; Calvi, C. L.; Day, B. J.; Pearlstein, R. D.; Crapo, J. D.; Warner, D. S. Effects of metalloporphyrin catalytic antioxidants in experimental brain ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:947–961; 2002.
- [16] Vujaskovic, Z.; Batinic-Haberle, I.; Rabhani, Z. N.; Feng, Q. F.; Kang, S. K.; Spasojevic, I.; Sanulski, T. V.; Fridovich, I.; Dewhirst, M. W.; Ansheer, M. S. A small molecular weight catalytic metalloporphyrin antioxidant with superoxide dismutase (SOD) mimetic properties protects lungs from radiation-induced injury. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:857–863; 2002.
- [17] Ferrer-Sueta, G.; Quijano, C.; Alvarez, B.; Radi, R. Reactions of manganese porphyrins and manganese-superoxide dismutase with peroxynitrite. *Methods Enzymol.* **349**:23–37; 2002.
- [18] Bloodsworth, A.; O'Donnell, V. B.; Batinic-Haberle, I.; Chumley, P. H.; Hunt, J. B.; Day, B. J.; Crow, J. P.; Freeman, B. A. Manganese-porphyrin reactions with lipids and lipoproteins. *Free Radic. Biol. Med.* **28**:1017–1029; 2000.
- [19] Santos, C. X.; Anjos, E. L.; Augusto, O. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**:285–294; 1999.
- [20] Ma, Y. S.; Stone, W. L.; LeClair, J. O. The effects of vitamin C and urate on the oxidation kinetics of human low-density lipoprotein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **206**:553–559; 1994.
- [21] Becker, B. F. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biol. Med.* **14**:615–631; 1993.
- [22] Kopprasch, S.; Richter, K.; Leonhardt, W.; Pietzsch, J.; Grassler, J. Urate attenuates oxidation of native low-density lipoprotein by lipocholesterol and the subsequent lipoprotein-induced respiratory burst activities of polymorphonuclear leukocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **206**:51–56; 2000.
- [23] Schlotte, V.; Sevastian, A.; Hochstein, P.; Weithmann, K. U. Effect of uric acid and chemical analogues on oxidation of human low density lipoprotein in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* **25**:839–847; 1998.
- [24] Van der Vliet, A.; Smith, D.; O'Neill, C. A.; Kaur, H.; Darley-Usmar, V.; Cross, C. E.; Halliwell, B. Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem. J.* **303**:295–301; 1994.
- [25] Ferrer-Sueta, G.; Vitti, D.; Batinic-Haberle, I.; Fridovich, I.; Goldstein, S.; Czapski, G.; Radi, R. Reactions of manganese porphyrins with peroxynitrite and carbonate radical anion. *J. Biol. Chem.* **278**:27432–27438; 2003.
- [26] Batinic-Haberle, I.; Spasojevic, I.; Stevens, D.; Hambright, P.; Fridovich, I. Manganese(II) meso-tetraakis(ortho-N-alkylpyridyl)porphyrins. Synthesis, characterization and catalysis of O₂⁻ dismutation. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2689–2696**; 2002.
- [27] Batinic-Haberle, I. Manganese porphyrins and related compounds as mimics of superoxide dismutase. *Methods Enzymol.* **349**:223–233; 2002.
- [28] Chung, B. H.; Segrest, J. P.; Ray, M. J.; Brunzell, J. D.; Hokanson, J. E.; Krauss, R. M.; Beaudric, K.; Cone, J. T. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. *Methods Enzymol.* **128**:181–209; 1986.
- [29] Bathányi, C.; Santos, C.; Botti, H.; Cerveñansky, C.; Radi, R.; Augusto, O.; Rubbo, H. Direct evidence for apoB-100 mediated copper reduction: studies with purified apoB-100 and detection of tryptophanyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**:335–340; 2000.
- [30] Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**:481–487; 1991.
- [31] Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaram, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Freeman, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* **269**:26066–26075; 1994.
- [32] Sparks, D. L.; Phillips, M. C. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J. Lipid Res.* **33**:123–130; 1992.
- [33] Kritihardis, L.; Jessup, W.; Gifford, J.; Dean, R. T. A method for defining the stages of low-density lipoprotein oxidation by the separation of cholesterol- and cholesteryl ester-oxidation products using HPLC. *Anal. Biochem.* **213**:79–89; 1993.
- [34] Teissier, E.; Walters-Laporte, E.; Duham, C.; Luc, G.; Fruchart, J. C.; Duriez, P. Rapid quantification of alpha-tocopherol in plasma and low- and high-density lipoproteins. *Clin. Chem.* **42**:430–435; 1996.
- [35] Squadrito, G. L.; Cueto, R.; Splenser, A. E.; Valavanidis, A.; Zhang, H.; Uppu, R. M.; Pryor, W. A. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**:333–337; 2000.
- [36] Ames, B. N.; Cathcart, R.; Schwiers, E.; Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:6858–6862; 1981.
- [37] Whiteman, M.; Ketsavatsakul, U.; Halliwell, B. A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**:242–259; 2002.
- [38] Sato, K.; Niki, E.; Shimazaki, H. Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Arch. Biochem. Biophys.* **279**:402–405; 1990.
- [39] Ford, E.; Hughes, M. N.; Wardman, P. Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. *Free Radic. Biol. Med.* **32**:1314–1323; 2002.

1300

A. TROSTOLANSKY *et al.*

ABBREVIATIONS

apo B-100—apolipoprotein B-100	MnTE-2-PyP ^{S1} manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(<i>N</i> -ethylpyridinium-2-yl) porphyrin
CE-OOH—cholesteryl ester hydroperoxide	MnTnOct-2-PyP ^{S1} manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(<i>N</i> -octylpyridinium-2-yl) porphyrin
dtpa—diethylenetriaminepentaacetic acid	[•] NO ₂ —nitrogen dioxide
HPLC—high-pressure liquid chromatography	PN peroxy nitrite
LDL—low-density lipoprotein	REM relative electrophoretic mobility
MnTCPP ³ manganese(III)5,10,15,20-tetrakis(4-carboxylatophenyl) porphyrin	α -TO [•] α -tocopheroxyl radical
	α -TOH α -tocopherol

Discusión y resultados adicionales al trabajo 3

Efectos “antioxidantes” y “prooxidantes”

En la Figura 11 podemos ver que la combinación de MnTE-2-PyP y ácido úrico protege a la LDL de la oxidación, como se refleja en la constancia de su movilidad electroforética en los carriles 8, 9 y 10. Esto concuerda bien con la propuesta, manifiesta en la Figura 8, de que un ciclo Mn^{III}/Mn^{IV} es capaz de reducir catalíticamente al peroxinitrito y en este caso el resultado es la protección de la LDL. Quizá resulta menos evidente por qué en los carriles 5, 6 y 7 (con 5 μM MnTE-2-PyP sin urato) la LDL aparece **más** oxidada que en ausencia de la porfirina y a menudo se interpreta como una actividad “antioxidante” (carriles 8-10) y una actividad “prooxidante” (carriles 5-7). En realidad no hay necesidad de invocar dos actividades cuando una basta y sobre todo, cuando el fenómeno es el mismo. En el esquema de la Figura 8 hemos dejado a propósito indefinida la especie RedH que cede los electrones para la reacción b. Ante la existencia de más de un reductor, la reacción b será con aquel reductor que gane la competencia cinética. En este sistema en particular, el ácido úrico es mucho mejor que la LDL como reductor para $O=Mn^{IV}$ Porfirina, así que se consumirá primero, pero en caso de que se acabe (o que simplemente no haya), la MnPorfirina catalizará la reducción de $ONOO^-$ a expensas de *cualquier otro reductor disponible*. Si estamos observando la oxidación de LDL como criterio de valoración, podemos pensar que la MnPorfirina cambiará de antioxidante a prooxidante al acabarse el urato. No obstante, si lo miramos desde el punto de vista de la MnPorfirina, está realizando el mismo ciclo catalítico, sólo cambió el reductor disponible. Podemos incluso mirar desde el punto de vista del urato y veremos que la inclusión de MnPorfirina en el sistema *siempre* facilita la oxidación, dado que la reacción directa con $ONOO^-$ es lenta, pero la MnPorfirina la cataliza.

Esperamos que ahora resulte claro que la capacidad antioxidante está en los ojos de quien la mira, en los sistemas de estudio definimos *a priori* especies “blanco” que deseamos proteger y otras especies cuyo consumo por oxidación es aceptable y en términos de esa división arbitraria definimos antioxidante y prooxidante.

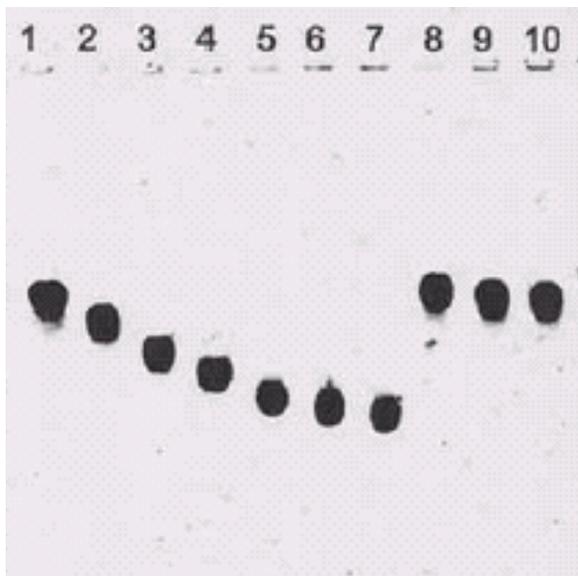


Figura 11. Movilidad electroforética relativa de LDL en gel de agarosa
 Carriles: **1** LDL (0.4 mg/mL); **2-4** oxidada por un flujo de ONOO^- ($1 \mu\text{M}/\text{min}$) durante 60, 120 y 200 min; **5-7** igual que los tres anteriores pero en presencia de $5 \mu\text{M}$ de MnTE-2-PyP; **8-10** igual que los tres anteriores pero en presencia de $300 \mu\text{M}$ urato. Datos tomados de la Figura 1 del trabajo 3.

Dos órdenes de magnitud no son tanto (a veces)

En la Figura 12 se presenta la formación de hidroperóxidos en ésteres de colesterol presentes en LDL sometida a 2 horas de flujo de ONOO^- ($1 \mu\text{M}/\text{min}$). Se observa que la presencia de urato ($300 \mu\text{M}$) protege parcialmente y que dicha protección aumenta si se incluyen MnTOct-2-PyP, MnTE-2-PyP o MnTCPP en concentración $5 \mu\text{M}$. Se ve también que el orden de protección es $\text{MnTOct-2-PyP} > \text{MnTE-2-PyP} > \text{MnTCPP}$ y esto se entiende como una combinación de capacidad catalítica y lipofilia de la MnPorfirina. El valor tal vez sorprendente en esta gráfica proviene del hecho de que MnTCPP es más de cien veces menos eficiente como catalizador en el ciclo de la Figura 8, dado que su reacción con ONOO^- es $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que supera $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para las otras dos porfirinas. A pesar de esta diferencia de eficiencias, la formación de hidroperóxidos se ve drásticamente disminuida con este catalizador y la formación observada es apenas el doble que la observada en presencia de MnTE-2-PyP pero menos de la mitad que la observada con urato solo.

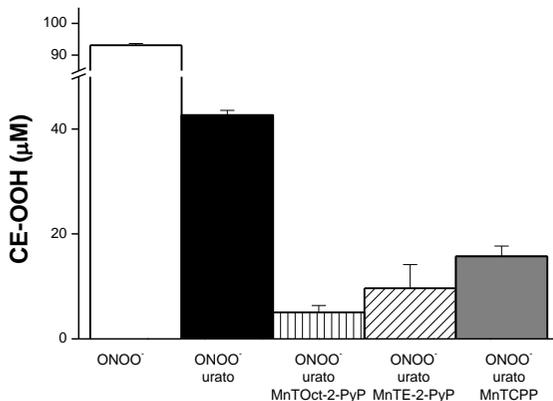


Figura 12. Formación de hidroperóxidos en ésteres de colesterol presentes en LDL sometida a un flujo de peroxinitrito Peroxinitrito 1 μM/min durante 2 horas y los efectos de urato (300 μM), y tres porfirinas diferentes (5 μM). Datos tomados de la figura 2 del trabajo 3.

El origen de la protección puede no ser evidente, pero se puede explicar por una competencia cinética simple. Si suponemos que el ONOO⁻ se descompone en presencia de urato y MnPorfirina hay tres reacciones que llevan al consumo de peroxinitrito, a saber:

- 1) $\text{ONOO}^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ (isomerización por radicales) ($k_1 = 0.33 \text{ s}^{-1}$)
- 2) a) $\text{ONOO}^- + \text{Urato} \rightarrow \cdot\text{NO}_2$ ($k_{2a} = 580 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
 b) $\cdot\text{NO}_2 + \text{Urato} \rightarrow \text{NO}_2^-$ ($k_{2b} = 1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
 (Inactivación directa por urato)
- 3) a) $\text{ONOO}^- + \text{Mn}^{\text{III}}\text{Porfirina} \rightarrow \text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}\text{Porfirina} + \cdot\text{NO}_2$ ($k_{3a} = 10^5 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
 b) $\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}\text{Porfirina} + \text{Urato} \rightarrow \text{Mn}^{\text{III}}\text{Porfirina}$ ($k_{3b} = 10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
 c) $\cdot\text{NO}_2 + \text{Urato} \rightarrow \text{NO}_2^-$ ($k_{3c} = 1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
 (Reducción catalítica por MnPorfirina/Urato)

Como las constantes de velocidad de los tres procesos son conocidas las reacciones se pueden simular utilizando un programa como Gepasi^(150,151). Incluso se puede simular la reacción con diferentes valores de k_{3a} para evaluar el efecto de diferentes MnPorfirinas. Si consideramos un sistema que consta de:

urato 300 μM
 flujo de ONOO⁻ 1 μM/min (durante 2 horas)
 MnPorfirina 5 μM

y simulamos los destinos del peroxinitrito en función de k_{3a} obtenemos la distribución que se presenta a continuación. Se observa, como era de esperar, que a medida que aumenta el valor de k_{3a} , la fracción de ONOO⁻ disponible para reaccionar con blancos “lentos” (por constantes de velocidad bajas o por concentraciones pequeñas) disminuye, se observa que con una MnPorfirina poco reactiva como MnTCCP incluso la reacción directa presentada como 2 se vuelve poco importante, mientras que con MnTE-2-PyP y MnTOct-2-PyP la única reacción relevante es la reducción catalítica por las reacciones 3(a-c).

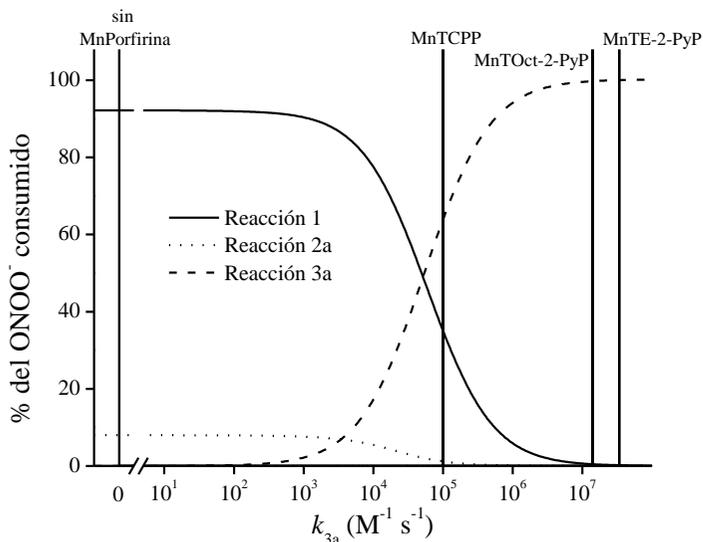


Figura 13. Distribución de blancos para un flujo de ONOO^- . Sistema con urato 300 μM y MnPorfirina 5 μM , simulados en función de la reactividad de la MnPorfirina frente a ONOO^-

Vemos que MnTCPP es capaz de disminuir en este sistema aproximadamente dos tercios de la concentración disponible de ONOO^- . Dado que ignoramos las constantes de velocidad para las reacciones de la LDL en este sistema no podemos obtener resultados numéricos exactos para calcular cuánta será la protección de LDL proporcionada por MnTCPP, sin embargo, la Figura 13 nos hace esperar algún valor intermedio entre urato solo y las porfirinas más eficientes, lo que concuerda con nuestros resultados.

Trabajo 4. Reducción de Mn^{III}Porfirinas y efectos sobre blancos bioquímicos

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): 503-512

The resulting Mn^{II}Porphyrins can react rapidly with peroxynitrite in a two-electron process yielding O=Mn^{IV}Porphyrin and nitrite.

Antecedentes del trabajo 4

Hasta aquí contamos con varios fragmentos de información que permiten observar a las MnPorfirinas con optimismo: reaccionan rápido o muy rápido con ONOO⁻ y CO₃⁻ y se reciclan rápidamente con reductores "baratos" como urato y ascorbato, incluso sometidas a la prueba de proteger una macromolécula compleja como la LDL hasta las más modestas tienen un efecto notorio. A pesar de esto, quedan al menos dos puntos importantes a considerar:

- 1) El ciclo catalítico propuesto Figura 8 produce dióxido de nitrógeno en proporción estequiométrica con el ONOO⁻ consumido, es decir, es posible que el ·NO₂ liberado aumente respecto a una situación sin reducción catalítica donde ONOO⁻ reacciona preferentemente con CO₂. Esta situación puede ser problemática en algunos casos, lo hemos observado en el sistema de oxidación de LDL, donde vimos que el γ tocoferol no se protege con el ciclo propuesto sino que su oxidación es mayor que en un sistema con urato pero libre de MnPorfirinas (ver la tabla 1 de la referencia ⁽⁶¹⁾).
- 2) Sabíamos desde tiempo atrás⁽¹⁸⁾ que al menos una parte de las MnPorfirinas se reduce *in vivo* y no podríamos responder en este punto si los hallazgos realizados para las Mn^{III}Porfirinas se podrían extender fácilmente a sus contrapartes de Mn^{II}. Ya sea porque la oxidación de Mn^{II} fuera rápida, eficiente e inocua para ingresar al ciclo catalítico Mn^{III}/Mn^{IV} o porque el Mn^{II} poseyera una reactividad propia frente a los oxidantes que se desea inactivar.

La búsqueda de un reductor adecuado

La reducción de Mn^{III}Porfirinas se había intentado varias veces en el pasado con reductores de bajo peso molecular. Por ejemplo, para estudiar la reactividad de Mn^{II}Porfirinas frente a $\cdot\text{NO}$ se utilizaron concentraciones grandes de ascorbato⁽¹⁵²⁾. Nosotros mismos estudiamos la reacción de Mn^{II}Porfirinas con $\text{CO}_3^{\cdot-}$ usando ditionito en concentración estequiométrica como reductor en atmósfera inerte en el trabajo 2. La necesidad de excluir estrictamente el O_2 (a concentraciones < 100 nM), que resulta algo complicada en nuestro laboratorio y la complejidad de lidiar con subproductos y reactivos remanentes si se emplean reductores en exceso hicieron que buscáramos nuevas opciones para realizar la reducción.

Una reducción enzimática sonaba tentadora y mucho más si el sistema reductor se encargaba además de consumir el O_2 , quizá fue por eso que iniciamos los experimentos con partículas submitocondriales (PSM), así que probamos y funcionó, la mezcla de partículas y succinato en el amortiguador adecuado reducía primero al O_2 sin dejar subproductos y después a las Mn^{III}Porfirinas. Pasaba lo mismo si usábamos NADH como fuente de electrones. Pero no todas las porfirinas se reducían igual, mientras MnTE-2-PyP se reducía durante el tiempo de mezcla en la celda del espectrofotómetro, MnTSPP demoraba más de una hora en condiciones idénticas.

Los primeros experimentos de reducción de Mn^{III}Porfirinas con PSM y NADH se muestran en la Figura 14. Se puede apreciar ahí, que mientras MnTE-2-PyP se reduce parcialmente durante la mezcla en la celda y el resto de la reducción se completa en menos de 1 minuto, MnTSPP tarda mucho más. Incluso con 2.5 veces más PSM se puede calcular que la reacción se completa en 3 horas y media aproximadamente. Hay que notar, que en estos experimentos iniciales las PSM tendían a sedimentar en los primeros segundos después de realizar la mezcla, por lo que los cambios en la turbidez de la solución afectaban los resultados espectrales. Esto es particularmente notorio en el experimento con MnTE-2-PyP. Otro detalle que vale la pena mencionar es que cuando realizamos estos experimentos los hicimos en el amortiguador de aislamiento de las PSM para proteger la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria. Más adelante, como se ve en el trabajo 4 comenzamos a utilizar PBS como amortiguador con buenos resultados.

¡La absorbancia a 454 nm baja!

En septiembre del año 2000 ya dominábamos medianamente la reducción de Mn^{III}Porfirinas con PSM y succinato (aun usábamos amortiguador de aislamiento), así que decidimos intentar estudiar la oxidación de la Mn^{II}Porfirina resultante con ONOO^- . Elegimos MnTM-2-PyP ya que en ese momento era el compuesto que teníamos mejor caracterizado, más disponible y sabíamos que su reducción era rápida. Preparamos disoluciones y las llevamos al stopped flow para estudiar la cinética. Para ser sinceros

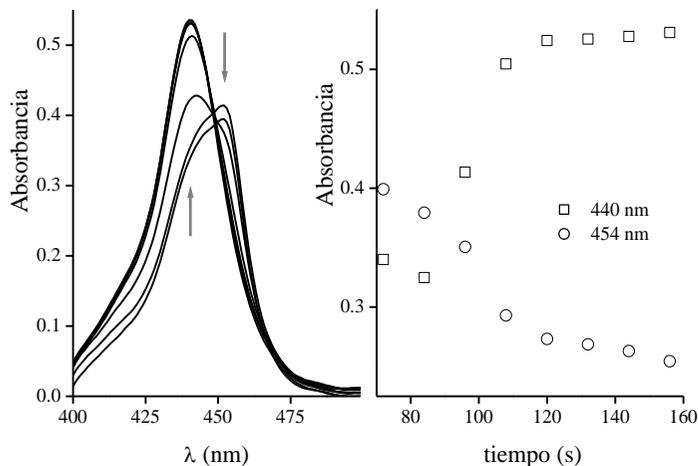
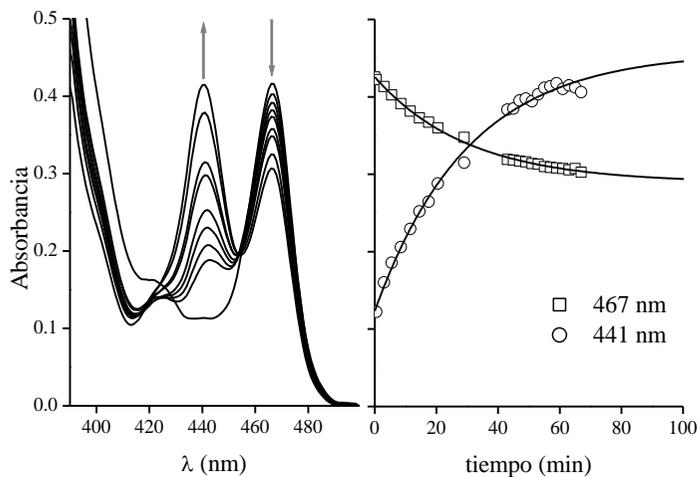


Figura 14.
 Reducción de Mn^{III} Porphirinas con partículas submitocondriales (PSM) y NADH
Arriba: reducción de MnTE-2-PyP con PSM (0.2 mg proteína/mL).
Abajo: reducción de MnTSPP con PSM (0.5 mg

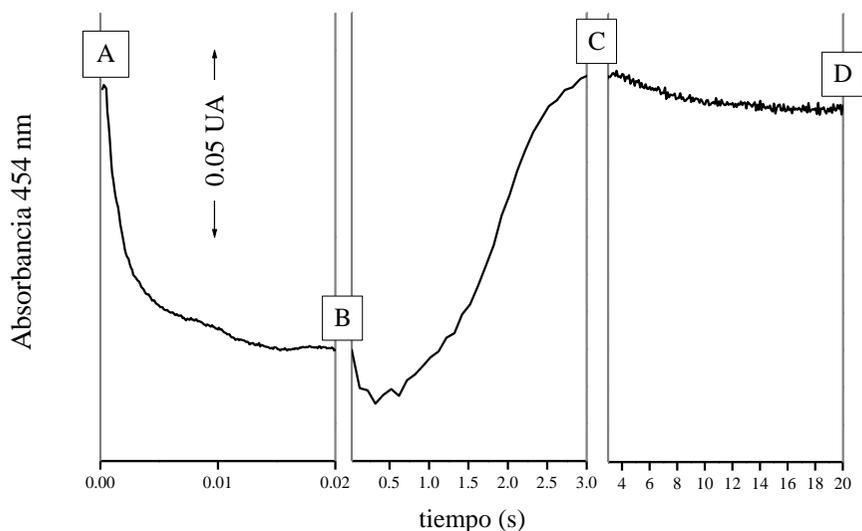
esperábamos ver una reacción que con alguna velocidad nos llevara de regreso de Mn^{II} a Mn^{III} y sólo aspirábamos a que dicha reacción fuera rápida. Mezclamos entonces $1 \mu M$ de $Mn^{II}TM-2-PyP$ con $20 \mu M$ de $ONOO^-$ y observamos a 454 nm , la longitud de onda de máximo de $Mn^{III}TM-2-PyP$. Esperábamos ver un aumento concomitante con la oxidación, sin embargo, ¡la absorbancia a 454 nm bajaba!

Por supuesto, cambiamos las soluciones, volvimos a prepararlas, cambiamos la longitud de onda, pero hacia el final de ese día de trabajo estábamos convencidos de que estábamos observando una oxidación de $Mn^{II}TM-2-PyP$ **por dos electrones**.



proteína/mL).
 Ambos
 experimentos
 realizados a 37°C
 en un amortigua-
 dor que contiene
 0.3 M sacarosa, 5
 mM fosfato, 1 mM
 EGTA y 1 mg/ml
 BSA. Las flechas
 indican la dirección
 del cambio
 espectral con el
 tiempo.

En la Figura 15 se presenta un registro de ese primer día de oxidación de $\text{Mn}^{\text{II}}\text{TM-2-PyP}$ con ONOO^- . Para nuestra suerte, una vez comprendidos cuáles procesos observábamos en cada paso constatamos que el primero estaba bastante bien separado del segundo y del tercero en términos de tiempos de reacción. No obstante, después de obtener algunos valores ambiguos de constantes de velocidad, optamos por estudiar la cinética de oxidación $\text{Mn}^{\text{II}} \rightarrow \text{Mn}^{\text{IV}}$ en un punto isobéptico entre Mn^{III} y Mn^{IV} , de manera de anular el cambio de absorbancia asociado a la segunda reacción.



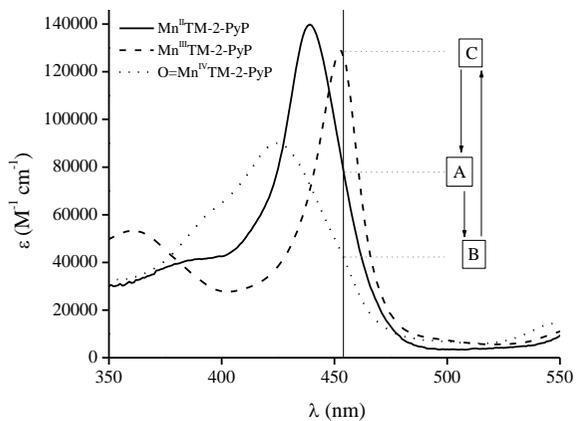


Figura 15. Oxidación de $Mn^{II}TM-2-PyP$ con $ONOO^-$
Arriba. Curso temporal de la oxidación de $Mn^{II}TM-2-PyP$ con $ONOO^-$ y su posterior reducción con PSM y succinato.
Izquierda. Espectros asociados a los cambios redox de $MnTM-2-PyP$

Available online at www.sciencedirect.com

Free Radical Biology & Medicine 41 (2006) 503–512

www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original Contribution

Reduction of manganese porphyrins by flavoenzymes and submitochondrial particles: A catalytic cycle for the reduction of peroxynitrite

Gerardo Ferrer-Sueta^{a,c}, Luciana Hannibal^a, Ines Batinic-Haberle^d, Rafael Radi^{b,c,*}^a Laboratorio de Fisiología Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay^c Center for Free Radical and Biomedical Research, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay^d Department of Radiation Oncology, Duke University Medical School, Durham, NC 27710, USA

Received 20 January 2006; revised 25 April 2006; accepted 26 April 2006

Available online 11 May 2006

Abstract

The reduction of manganese(III) meso-tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin (MnTE-2-PyP) to manganese(II) was catalyzed by flavoenzymes such as xanthine oxidase and glucose oxidase, and by Complex I and Complex II of the mitochondrial electron transport chain. The reduced manganese porphyrin has been previously shown to react rapidly with superoxide and carbonate radical anion. Herein, we describe the reaction of a reduced manganese porphyrin with peroxynitrite that proceeds as a two-electron process, has a rate constant greater than $7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (at pH 7.25 and 37°C), and produces nitrite and the Mn(IV)Porphyrin. The Mn(II)/Mn(IV) redox cycle was used to divert peroxynitrite from the inactivation of succinate dehydrogenase. In a typical experiment, 5 μM MnTE-2-PyP in the presence of excess succinate was able to protect the succinate dehydrogenase and succinate oxidase activities of submitochondrial particles challenged with a cumulative dose of 140 μM peroxynitrite infused in the course of 2 h. Other MnPorphyrins that are reduced more slowly do not provide as much protection underscoring the rate limiting character of the reduction step. The data presented here serve to rationalize the pharmacological action of MnPorphyrins as peroxynitrite reduction catalysts in vivo and opens avenues for the development of MnPorphyrins to protect mitochondria from oxidative damage.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Manganese porphyrin; Peroxynitrite; Mitochondria; Flavoenzyme; Catalysis

Introduction

Manganese porphyrins (MnPorphyrins) have been successfully used to treat a number of models of acute pathologies related to oxidative stress [1–9]. MnPorphyrins have also been shown to possess a chemical reactivity that enables fast redox reactions. For instance, they catalyze quite efficiently the dismutation of superoxide [10–13]; they react, though

slowly, with hydrogen peroxide in a catalase-like cycle [14]; they are among the fastest reductants for peroxynitrite [15,16]; and they react very rapidly with carbonate radicals [17]. Despite the hope to find a straightforward relationship between chemical reactivity and in vivo activity, the data so far are not very clear. Both the fastest and the slowest of SOD mimetic porphyrins seem to work well in vivo. Notably, MnTCPP (Mn(III) meso-tetrakis 4-carboxylatophenyl porphyrin, aka MnTBAP) a compound that possesses marginal SOD activity and reacts comparatively slowly with peroxynitrite can increase significantly the survival of *sod2* nullizygous mice [18,19]. There should be another property of the prospective catalytic antioxidants besides large rate constants that complements their efficiency. This property may be associated with interactions with biomolecules and subcellular structures. In this respect, the mitochondrion is always a prime suspect in relation to cellular redox processes that may trigger the augmented production of oxidants.

Abbreviations: MnTE-2-PyP, Mn(III) meso-tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin (5-); MnTCPP, Mn(III) meso-tetrakis(4-carboxylatophenyl)porphyrin (3-); MnTM-4-PyP, Mn(III) meso-tetrakis(3-methylpyridinium-1-yl)porphyrin (5-); SMP, submitochondrial particles; SOD, succinate dehydrogenase; SOX, succinate oxidase; PBS, phosphate-buffered saline (0.14 M NaCl, 0.003 M KCl, 0.002 M KH₂PO₄, 0.01 NaH₂PO₄); DCFIP, dichlorophenol indophenol; PMS, phenazine methosulfate.

* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Av. General Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay. Fax: +598 2 9249563.

E-mail address: radi@fmed.edu.uy (R. Radi).

0891-5849/\$ - see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.028

In the paper that opened the field of manganese porphyrin biochemistry [11], it was proposed that MnPorphyrins could catalyze redox reactions (namely, the reduction of superoxide) using electrons derived from NADPH in an enzyme-catalyzed reaction (thioredoxin reductase in their example), thus bypassing the rate limiting step of superoxide dismutation. More recently, nitric oxide synthase was shown to catalyze the reduction of MnTM-4-PyP also at the expense of NADPH [20]. Furthermore, it was proposed that flavoenzymes in general are responsible at least for a part of the antioxidant effects seen with MnPorphyrins [21]. The possibility that mitochondrial flavoenzymes, like succinate dehydrogenase and NADH dehydrogenase, could catalyze the reduction of MnPorphyrins creates a link between the site of formation of the reactive species and its potential catalytic reduction.

Our research group has approached MnPorphyrin chemistry in search of a fast peroxynitrite reduction catalyst and such a search should consider that peroxynitrite reacts rather slowly ($k \leq 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) with low molecular weight reductants [22], tends to form oxidizing intermediates by reaction with Lewis acids such as CO_2 or metal centers [23,24], and its one-electron reduction yields the toxic $\cdot\text{NO}_2$ radical.

Bulk scavenging of peroxynitrite by sacrificial reductants has not been accomplished yet despite the effort dedicated by several groups to find a fast and biologically compatible reductant. It was recently proposed [25] that ascorbate might provide such a protection in some cellular types that accumulate vitamin C; nevertheless, the scavenging by ascorbate is kinetically complex and further characterization of the reactivity of the intermediates is needed.

Other approaches to the problem involve the catalytic inactivation of the oxidizing character of peroxynitrite via either isomerization [26] to nitrate or by catalytic reduction with electrons from replaceable substrates [16,26,27]. It has recently been found that some peroxiredoxins can catalyze the reduction of peroxynitrite using electrons ultimately coming from the oxidation of NADPH [28–31].

We have shown that Mn^{III} Porphyrins are suitable catalytic reductants [16] of peroxynitrite, capable of outcompeting most other targets at low micromolar concentrations and able to redirect the reactivity of peroxynitrite toward easily replenishable reductants. The drawback to using Mn^{III} Porphyrins is that the proposed catalytic cycle involves the one-electron reduction of peroxynitrite, thus producing $\cdot\text{NO}_2$ and potentially initiating radical chain reactions.

Studies performed in cellular systems have shown that Mn^{II} is the predominant oxidation state of intracellular MnPorphyrins [11]. The initial Mn^{III} complex can be reduced by intracellular reductants such as ascorbate, glutathione, or tetrahydrobiopterin [32], or enzymatically by oxidoreductases employing other substrates [20,21].

In this paper we show how Mn^{III} Porphyrin reduction is catalyzed by two flavoenzymes, and also by the mitochondrial electron transport Complexes I and II using NADH or succinate as substrate, respectively. The resulting Mn^{II} Porphyrins can react rapidly with peroxynitrite in a two-electron process yielding $\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}$ Porphyrin and nitrite. This diversion of the

oxidizing power from peroxynitrite or radicals derived from it to $\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}$ Porphyrins can be used to protect peroxynitrite-sensitive targets. This redox cycle that consumes easily replenishable reductants such as NADH or succinate can be easily extended to consume other reactive species such as superoxide (as previously proposed [11]) and carbonate radicals [17].

We have chosen to characterize the MnPorphyrin reduction and perform the protection experiments in submitochondrial particles (SMP) because such a system avoids the complexity of compartmentalization implied in using intact mitochondria. With SMP we are assured that oxidants, targets, and catalysts were readily accessible to each other in a one-compartment system, thus allowing the use of the homogeneous reaction rate constants to interpret the findings.

Experimental procedures

Reagents

The manganese porphyrins used were MnTE-2-PyP (manganese(III) meso-tetrakis((*N*-ethyl)pyridinium-2-yl)porphyrin) and MnTM-4-PyP (manganese(III) meso-tetrakis((*N*-methyl)pyridinium-4-yl)porphyrin) synthesized as previously described [33,34], and MnTCCP (manganese(III) meso-tetrakis(4-carboxylato-phenyl)porphyrin) from MidCentury Chemicals (Chicago, IL). Unless otherwise indicated, the abbreviated porphyrin names refer to the Mn(III) oxidation state.

Peroxyntite was synthesized from hydrogen peroxide and sodium nitrite in acidic solution [35].

Enzymes were obtained from Sigma, urate oxidase, EC 1.7.3.3 from pig liver (U-9375); glucose oxidase, EC 1.1.3.4 from *Aspergillus niger* (G 9010); and catalase, EC 1.11.1.6 from bovine liver (C-40); or Calbiochem, xanthine oxidase, EC 1.1.1.3.2 from bovine milk (682151).

All other reagents were obtained from standard commercial sources and used as received.

Submitochondrial particles from bovine heart were obtained and characterized by published procedures [36].

MnPorphyrin reduction by flavoenzymes

Mn(III)Porphyrin reduction was followed spectrophotometrically in a Cary 50 Tablet UV-visible spectrophotometer. A mixture consisting of 1 to 5 μM Mn^{III}Porphyrin, PBS, and one of the following enzyme systems was incubated at room temperature and its time-dependent UV-Vis spectra were monitored from 350 to 600 nm. The enzyme systems used were xanthine oxidase (60 mU/mL), hypoxanthine (500 μM), catalase (250 U/mL); and glucose oxidase (6 U/mL), glucose (100 mM), catalase (250 U/mL).

Mn^{III}Porphyrin reduction by components of the mitochondrial electron transport chain

Mn^{III}Porphyrin reduction by SMP was followed spectrophotometrically in a Cary 50 Tablet UV-visible spectrophotometer. A mixture consisting of 1 to 5 μM Mn^{III}Porphyrin, 0.12 mg

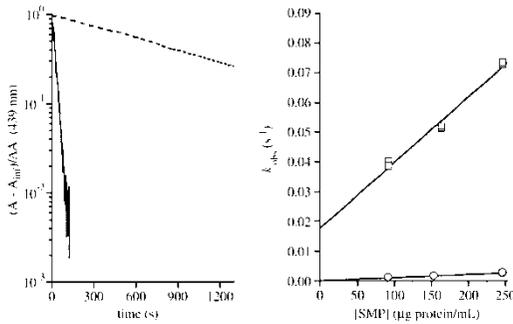


Fig. 2. Reduction of MnTE-2-PyP by components of the mitochondrial electron transport chain. (Left) Reduction of 5 μ M MnTE-2-PyP observed at 439 nm with SMP (93 μ g protein/mL) plus 1 mM NADH (continuous line) or 2.5 mM succinate (dashed line) in PBS at 37°C. (Right) Observed first-order constants as a function of succinimithochondrial particle concentration; NADH (\circ), succinate (\square).

catalase (250 U/mL) was included in the reaction media for complete removal of H₂O₂.

When SMP were used to catalyze the reduction, two substrates were employed, namely succinate or NADH. In these cases the reactions differ in their apparent rate with the NADH-dependent reduction being much more rapid (Fig. 2, left). For all the flavoenzymes tried the rate of reduction depends on enzyme activity; this is presented in Fig. 2 (right) for Complex I and Complex II. The change in absorbance at 454 and 439 nm resulting from MnTE-2-PyP reduction was fitted to a single exponential function and the observed rate constant thus obtained was plotted against the SMP concentration (expressed in mg protein/mL).

MnTE-2-PyP is reduced by Complexes I and II of the mitochondrial electron transport chain

The electron transport chain reduces MnTE-2-PyP with either NADH or succinate as electron sources. To probe the site of reduction we used inhibitors of Complexes I and II. The experiment was performed in the absence of oxygen to avoid

side reactions of the reduced MnPorphyrin with oxygen and its reduction products. Urate, urate oxidase, and catalase were used to scavenge all oxygen; none of these components reduced the porphyrins. Fig. 3 shows the time course of the reduction of MnTE-2-PyP with succinate as reductant, where neither rotenone (10 μ M) nor thenoyl trifluoroacetone (100 μ M) altered significantly the rate of reduction. On the other hand, 200 μ M oxaloacetate inhibited more than 80% the rate of reduction (Fig. 3). The pattern of inhibition suggests that reduction by succinate does not depend on the reverse flow of electrons to Complex I (Fig. 3B) nor is mediated by ubiquinone reduction (Fig. 3C), but reduction of the FAD by succinate seems to be critical (Fig. 3D). Moreover, when NADH was the electron source (not shown) the reduction rate was not significantly affected by compounds that inhibit the electron transfer from Complex I to ubiquinone (rotenone), from ubiquinone to Complex II (thenoyl trifluoroacetone), or from Complex II to its dicarboxylic acid substrate (oxaloacetate). This suggests that for Complex I also the reduction of the MnPorphyrin occurs somewhere between the FMN and the site of quinone reduction. Succinate dehydrogenase and NADH dehydrogenase are both multimeric enzymes

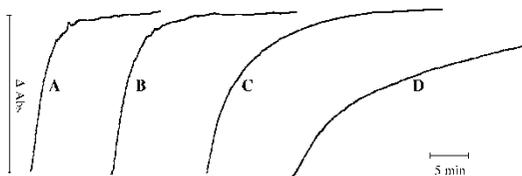


Fig. 3. Reduction of MnTE-2-PyP by succinate in the presence of inhibitors of the mitochondrial electron transport chain. Anaerobic MnTE-2-PyP reduced by SMP (0.12 mg/mL) and succinate (3 mM) (A) in the presence of 10 μ M rotenone (B) with 10 μ M rotenone, and 100 μ M thenoyl trifluoroacetone (C) with 10 μ M rotenone, 100 μ M thenoyl trifluoroacetone, and 200 μ M oxaloacetate (D). The bar on the left represents the expected absorbance change for the complete reduction; the time scale is the same for all the plots.

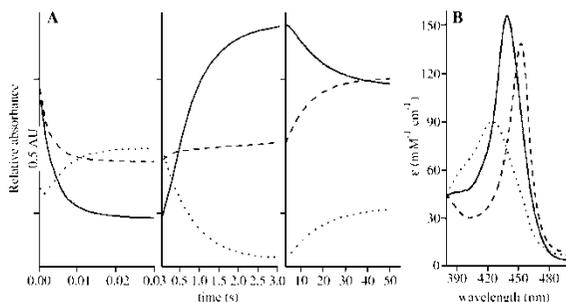


Fig. 4. (A) Time course of the reaction Mn^{II}TE-2-PyP with peroxyntirite. Mn^{II}TE-2-PyP (3.1 μM) reaction with peroxyntirite (54 μM) in the presence of SMP (0.1 mg protein/mL) and succinate (3 mM). The reaction was monitored at 454 (continuous line), 442 (dashed line), and 420 nm (dotted line). (B) UV-visible spectra of Mn^{II}TE-2-PyP as Mn^{II} (continuous line), Mn^{III} (dashed line), and O=Mn^{IV} (dotted line).

in which a flavin accepts electrons from the substrate and transfers them to the quinone reduction site via several Fe–S clusters. The observed pattern of MnPorphyrin reduction in the presence of inhibitors indicates that in both enzymes either the flavin or the Fe–S centers are responsible for the reduction.

Mn^{II}TE-2-PyP is oxidized by peroxyntirite

The time course of the reaction of Mn^{II}TE-2-PyP consists in three distinct phases corresponding to three consecutive reactions (Fig. 4). The reactions were followed at several wavelengths and we interpreted them in terms of the known extinction coefficients of Mn^{II}, Mn^{III}, and O=Mn^{IV}TE-2-PyP. The decrease in absorbance at 454 nm (λ_{max} for Mn^{III}) and 442 nm (close to the isosbestic of Mn^{III} and O=Mn^{IV}) and the increase at 420 nm (λ_{max} for O=Mn^{IV}) suggest that the fast reaction corresponds to a two-electron oxidation from Mn^{II}TE-2-PyP to O=Mn^{IV}TE-2-PyP. The second reaction corresponds

to the reduction of O=Mn^{IV} to Mn^{III}. This reaction is favored at the pH studied as O=Mn^{IV} is a rather strong oxidant ($E^{0'} \approx 1.0$ V vs NHE [42]) and can be reduced nonspecifically by protein or lipid components of the submitochondrial particles or even by succinate. The third and last reaction has the absorbance time course expected for the reduction of Mn^{III} to Mn^{II}TE-2-PyP. Note that the final values of absorbance for the three traces in Fig. 4 are approximately equal to the initial values at each wavelength.

We focused on the first reaction (i.e., Mn^{II} oxidation to O=Mn^{IV}) and studied it under pseudo-first-order conditions with peroxyntirite in excess over Mn^{II}TE-2-PyP. The reaction was followed at the Mn^{III}/O=Mn^{IV} isosbestic in order to avoid the interference from the second reaction. The time courses were fitted to single exponential decays and the rate constants thus obtained were plotted as a function of peroxyntirite concentration. As can be seen in Fig. 5 this plot is not linear as could be expected for a simple second-order reaction but shows

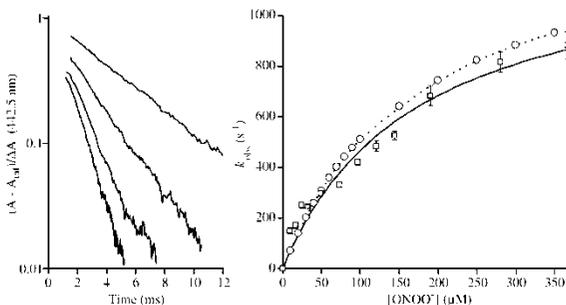


Fig. 5. Oxidation of Mn^{II}TE-2-PyP by peroxyntirite. (Left) Time course of the reaction observed at 442.5 nm (isosbestic of Mn^{III} and O=Mn^{IV}) at different initial peroxyntirite concentrations, from top to bottom: 24.6, 97, 190, and 367 μM. [Mn]₀ = 0.9 μM. (Right) Observed rate constants for the reaction of Mn^{II}TE-2-PyP with excess peroxyntirite, at pH 7.25 and 37°C. Squares, experimental data. Continuous line, best fit values to Eq. (5) $a = 1.3 \times 10^5$ s⁻¹ and $b = 1.7 \times 10^{-7}$ M. Circles and dotted line, simulation of kinetic system of Eqs. (1) and (2) with $k_1 = 1 \times 10^7$ M⁻¹ s⁻¹; $k_2 = 400$ s⁻¹; $k_3 = 1300$ s⁻¹.

a downward curvature and the data points were fitted to a rectangular hyperbola.

Stoichiometry of the reaction of Mn^{II}TE-2-PyP with peroxyntirite

Mn^{II}TE-2-PyP (10 μM) was reacted with different concentrations (0.72 to 18 μM) of peroxyntirite and the reaction was followed at 442.5 nm (the isosbestic of Mn^{III} and O=Mn^{IV}) and appear as a biphasic time course (Fig. 6A). The first phase (*t* < 0.2 s) corresponds in rate to the oxidation from Mn^{II} to O=Mn^{IV}. The slower subsequent phase corresponds to Mn^{II} reacting with the O=Mn^{IV} produced and with the oxygen present in the peroxyntirite solution. The amplitude of the first phase was measured by the fit of the time courses to a double exponential function or directly measured in the case where peroxyntirite was in excess. The amplitude was then plotted vs initial peroxyntirite concentration (Fig. 6B). The linear fit of the portion where peroxyntirite was in defect crosses the amplitude of total oxidation at nearly 10 μM, indicating a 1:1 stoichiometry.

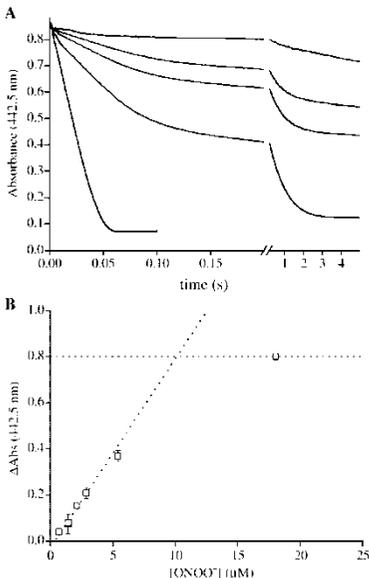


Fig. 6. Stoichiometry of the reaction of Mn^{II}TE-2-PyP with peroxyntirite. (A) Mn^{II}TE-2-PyP (10 μM) was reacted with different concentrations of peroxyntirite (shown from top to bottom: 0.72, 2.16, 2.89, 5.42, and 18.1 μM) in PBS at pH 7.3 and 37°C. The reaction was followed at 442.5 nm. (B) The amplitude of the first phase was measured by a double exponential fit and plotted vs peroxyntirite to determine the stoichiometry.

Table 1
Inactivation and protection of SDH and SOX

Condition	Peroxyntirite (μM)	SDH (% of control)
a	0	100 ± 10
b	0	85 ± 5
c	18	89 ± 8
d	3.5	71 ± 3
e	70	63 ± 5
f	140	35 ± 10
g	140	37 ± 20
h	140	48 ± 6
i	140	55 ± 6
j	140	28 ± 7
k	140	81 ± 17
l	140	85 ± 10
m	140	83 ± 5
n	140	85 ± 4
o	140	74 ± 17
p	140	52 ± 8
q	140	36 ± 4
r	140	Not detectable
		SOX (% of control)
s	0	100 ± 4
t	140	35 ± 5
u	140	68 ± 7

All experiments were performed by infusing peroxyntirite at a rate of 1.17 μM/min to submitochondrial particles suspended in PBS with 3 mM succinate. Infusion was started after all O₂ was consumed and all manganese reduced. The dose of peroxyntirite infused was determined by the infusion time. All other components were present before starting the infusion. Data represent mean ± SD of at least two independent experiments. In a typical control experiment, 100% corresponds to 60 μM mL of SDH or to an O₂ consumption of 14.6 μM/min for SOX.
* No succinate was added at the beginning of the experiment.

The redox cycle of MnTE-2-PyP can be used to protect targets sensitive to oxidation

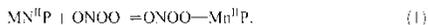
We studied the potential of MnTE-2-PyP in the protection of Complex II activity challenged by a peroxyntirite infusion that closely represents its formation under biological conditions [43]. It has been shown that succinate dehydrogenase is inactivated by oxidation with peroxyntirite [43–45]. We set up a system of slow infusion of peroxyntirite (1.17 μM/min) to inactivate the SDH. The inactivation depended on the time of infusion, that is, on the dose of peroxyntirite infused (Table 1, c–f). Mn^{II}TE-2-PyP was added to the system before the infusion of peroxyntirite was started and it was allowed to stand until all oxygen was consumed and all manganese was reduced. With a 2-h infusion SDH activity was protected by 3, 5, and 10 μM MnTE-2-PyP but not significantly by 1 μM MnTE-2-PyP (Table 1, j–m). MnTM-4-PyP (5 μM) provided some protection but was not as effective MnTE-2-PyP (Table 1, p). SDH inactivation was not prevented by Trolox C (5 mM) nor urate (400 μM) but was marginally reduced by 1 mM CO₂ (Table 1, g, h, and i). Neither CO₂ nor urate affected the protection provided by MnTE-2-PyP (Table 1,

n o). Complete protection was never achieved and even in the absence of peroxynitrite, MnTf-2-PyP alone provoked a slight loss of SDH activity (Table 1, b). When the experiment was performed in the absence of succinate (i.e., without a reductant) inactivation by peroxynitrite was similar but MnTE-2-PyP augmented the inactivation (Table 1, q–r). The inactivation of succinate oxidase activity by peroxynitrite and its protection by MnTf-2-PyP (5 μ M) are very similar to the SDH activity pattern (Table 1, s–u).

Discussion

The reduction of Mn^{III} Porphyrins by subcellular components was proposed more than a decade ago [11]. Later on it was noted that MnTf-4-PyP was able to consume NADH when NOS was present [20]; more recently [46] it was proposed that flavoenzymes were responsible for the reduction of Mn^{III} Porphyrins in vivo and also that this reduction accounted for a part of the antioxidant effects of these metallic complexes [8]. In our experiments all flavoenzymes tested were able to reduce Mn^{III}TE-2-PyP to Mn^{II}TE-2-PyP. The rate of reduction was not measured in absolute values but it was observed that one of the factors that affects this rate is the redox potential of the flavin. For instance, with the same preparation of submitochondrial particles, reduction by Complex I ($E^{\circ} = -414$ mV/NHE, [47]) is about 10 times faster than by Complex II ($E^{\circ} = -79$ mV/NHE [48], Fig. 2, left). The reported stoichiometric ratio of Complex I to Complex II is 1:2 in bovine heart mitochondria [49], suggesting that the reduction of MnTE-2-PyP by Complex I is much faster. This trend deserves further consideration and is currently under study in our laboratory. Using the same enzyme, reduction of different porphyrins also depends on the redox potential of the Mn^{III}/Mn^{II} couple. Thus xanthine oxidase reduces MnTE-2-PyP ($E^{\circ} = +228$ mV/NHE [34]) in minutes (Fig. 1) but takes days to reduce MnTCPP ($E^{\circ} = -194$ mV/NHE [12], not shown). Other factors important to the reactivity trend may involve the steric and electrostatic accessibility of the porphyrin to the site of reduction in each protein; for instance, the positive charge (5+) of MnTE-2-PyP may be another factor that facilitates its reduction by xanthine oxidase compared to MnTCPP that has a 3- charge.

The reaction of Mn^{II}TE-2-PyP with peroxynitrite here studied has an overall 1:1 stoichiometry (Fig. 6) but is kinetically more complicated than the corresponding reaction with Mn^{III} Porphyrins [17]. The downward curvature observed in Fig. 5 can be accounted for if the reaction occurs in two steps, first the addition of peroxynitrite to the manganese in a reversible step,



with rate constants k_1 and k_{-1} , followed by the heterolytic breakage of the peroxo bond,



which is irreversible and has a rate constant k_2 . For this reaction scheme and under conditions of excess peroxynitrite, the rate

law can be approximated to Eq. (3) by using the improved steady state assumption [50]:

$$-\frac{d[\text{Mn}^{\text{II}}\text{P}]}{dt} = \frac{k_2 k_1 [\text{ONOO}^-]}{k_{-1} + k_2 - k_1 [\text{ONOO}^-]} [\text{Mn}^{\text{II}}\text{P}]. \quad (3)$$

For such a system the observed pseudo-first-order rate constant (k_{obs}) has a hyperbolic dependence on [ONOO⁻], namely

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_2 [\text{ONOO}^-]}{k_{-1} + k_2 - [\text{ONOO}^-]}. \quad (4)$$

The individual values of k_1 and k_{-1} cannot be directly determined, but k_2 can be extrapolated by fitting the values of k_{obs} to Eq. (5) and extrapolating to infinite [ONOO⁻]

$$k_{\text{obs}} = \frac{a [\text{ONOO}^-]}{b - [\text{ONOO}^-]}. \quad (5)$$

The important figure under physiological conditions, where peroxynitrite is assumed to be the limiting reagent, is k_1 . A lower limit for k_1 can be calculated from the ratio a/b in Eq. (5), in our case the values thus obtained are

$$k_2 = 1.3 \pm 0.2 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \\ k_1 > 7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}.$$

A good fit to the experimental data could be simulated using a value for k_1 of $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 5), but this value should be considered a lower limit as the fit is not significantly different when the value for k_1 is chosen one order of magnitude higher.

The redox cycle formed by manganese reduction by substrate and flavoenzyme, and its oxidation by low steady-state concentrations of peroxynitrite provided protection to both succinate dehydrogenase and succinate oxidase activities from peroxynitrite-mediated oxidative damage. The results presented in Table 1, where SDH and SOX protection are compared, suggest that the catalytic cycle of Mn^{II} porphyrins protects not only Complex II but also the rest of the components of the

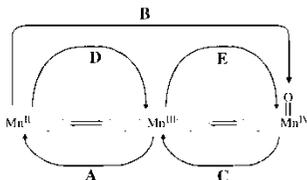


Fig. 7. Redox reactions accessible to Mn Porphyrins in vivo. Reaction A can be driven by reduced flavoenzymes and certain biological reductants such as glutathione and ascorbate. Reaction B is driven by peroxynitrite. The cycle involving reactions C and E has been studied elsewhere [16]. Reaction D can be accomplished by superoxide or carbonate radical anion with rate constants in the order of $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [7,52], and much less efficiently by oxygen, $k = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [50].

mitochondrial electron transport chain needed to mediate the oxidation of succinate with the reduction of oxygen.

The catalytic cycle is represented in Fig. 7 as reactions A, B, and C. According to the different conditions tested (Table 1), the protection is effective as long as manganese is reduced faster than it is oxidized. With MnTM-4-PyP, reaction A is about 10 times slower (see supporting material, Fig. 1S), and thus the protection with this porphyrin is smaller than with the same concentration of MnTE-2-PyP. Additionally, with decreasing concentrations of MnTE-2-PyP reaction B becomes slower and at 1 μ M it is not able to compete with the rate of infusion of peroxynitrite under our experimental conditions. In the same line of argumentation, urate accelerates reaction C but does not affect the overall protection of MnTE-2-PyP (Table 1, o), implying that reaction C is not rate determining.

The reaction that inactivates Complex II appears to be a direct reaction of peroxynitrite, as 5 mM Trolox C, a known scavenger of peroxynitrite-derived radicals [51], does not afford protection (Table 1, g), this agrees with previous reports of our group for *T. cruzi* Complex II [43]. The presence of CO₂ competes with the inactivation of Complex II, thus providing a slight protection (Table 1, i); however, the protection by MnTE-2-PyP is not affected by the presence of 1 mM CO₂ (Table 1, n). This fact can be explained both by Mn^{II}TE-2-PyP reacting faster with peroxynitrite than CO₂ and by the fast scavenging of CO₂^{•-} by Mn^{II}porphyrin and Mn^{III}porphyrin [16,17].

In the absence of a suitable substrate for succinate dehydrogenase, MnTE-2-PyP is not reduced to Mn^{II} and the redox cycle that takes place is that constituted by reactions E and C. The reduction of O=Mn^VTE-2-P is performed by the only reductants available, namely the oxidizable components of submitochondrial particles, thus enhancing the oxidation of the enzymes and their inactivation.

The slight but reproducible inactivation of SDH produced by MnTE-2-PyP alone remains unexplained; we hypothesized that the reaction of the reduced MnPorphyrin with oxygen (reaction B) when measuring SDH activity might lead to the formation of a small amount of superoxide and hydrogen peroxide, but the inclusion of SOD and/or catalase did not alter the inactivation (not shown).

The seemingly universal reduction of MnPorphyrins by reduced flavins¹ opens a further possibility for comprehending the redox reactions of these metallic complexes in vivo. We have shown that Mn^{III}TE-2-PyP reacts fast and efficiently with peroxynitrite, avoiding the production of [•]NO₂. Its reactions with O₂^{•-} [52] and with CO₂^{•-} [17] were previously shown to be also fast. The reductive step (reaction A in Fig. 7) is expected to be rate determining, thus favoring the use of MnPorphyrins with higher Mn^{III}/Mn^{II} redox potentials.

Mitochondrial dysfunction associated with an increase in oxidant formation, particularly of peroxynitrite, has been inferred for a number of pathological conditions [53,54],

MnPorphyrins have been used to ameliorate some of these conditions and protect mitochondrial targets [55] without exact knowledge of the protective mechanism. Particularly, our group has recently reported [9] that MnTE-2-PyP can protect Complex I and Complex II activities of heart and diaphragm mitochondria concurrent with decrease in protein nitration in rats subject to a sepsis model. Furthermore, MnTE-2-PyP has been found in the mitochondrial fraction of cultured cells treated with 200 μ M for 90 min: the reported concentration (2.5 ng/mg protein) can be calculated as ca. 13 μ M assuming a mitochondrial volume of 0.2 μ L/mg protein [56]. Adding these facts to the improved knowledge of a possible mechanism of protection presented herein may lead to a new strategy for treating pathological conditions where mitochondria-derived oxidants and oxidative modification of mitochondrial components appear concurrently.

There is a recent effort by several groups to develop mitochondria-targeted antioxidants [57,58] to favor the uptake and accumulation due to the transmembrane potential. While the uptake and subcellular distribution of the MnPorphyrins are not fully known yet, their colocalization with the mitochondrial flavoenzymes would certainly activate their function as catalytic antioxidants exactly in the site where most of the oxidants are allegedly formed.

Acknowledgments

This work was supported by grants from The Howard Hughes Medical Institute to R.R., and the Third World Academy of Sciences (TWAS, Italy) to G.F.S. R.R. is an International Research Scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.028.

References

- [1] Piganelli, J. D.; Flores, S. C.; Cruz, C.; Koopp, L.; Batinic-Haberle, I.; Crapo, J.; Day, B.; Kuehadorian, R.; Young, R.; Bradley, B.; Huskins, K. A metalloporphyrin-based superoxide dismutase mimic inhibits adaptive transfer of autoimmune diabetes by a diabetogenic T-cell clone. *Diabetes* 51:347–355; 2002.
- [2] Sheng, H.; Englund, J. J.; Bowler, R.; Patel, M.; Batinic-Haberle, I.; Calvi, C. L.; Day, B. J.; Pearlstein, R. D.; Crapo, J. D.; Warner, D. S. Effects of metalloporphyrin catalytic antioxidants in experimental brain ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 33:947–961; 2002.
- [3] Vinaskovic, Z.; Batinic-Haberle, I.; Rabbani, Z. N.; Feng, Q. F.; Kang, S. K.; Spasojevic, I.; Samuiski, T. V.; Fridovich, I.; Dewirst, M. W.; Anscher, M. S. A small molecular weight catalytic metalloporphyrin antioxidant with superoxide dismutase (SOD) mimetic properties protects lungs from radiation-induced injury. *Free Radic. Biol. Med.* 33:857–863; 2002.
- [4] Chung, L. Y.; Crapo, J. D. Inhibition of airway inflammation and hyperactivity by an antioxidant mimetic. *Free Radic. Biol. Med.* 33:379–386; 2002.
- [5] Hurtado, O.; De Cristoforo, J.; Sanchez, V.; Luján, L.; Cardenas, A.; Pereira, M. P.; Colado, M. L.; Leza, J. C.; Forcano, P.; Moro, M. A. Inhibition of glutamate release by delaying ATP full accounts for

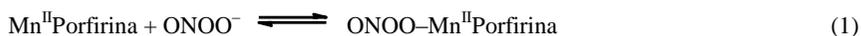
¹ Our results cannot exclude the possibility that in complex flavoenzymes, such as Complex I and Complex II, the reduction of MnPorphyrin takes place at sites other than the flavin, for instance, Fe-S centers of the heme group of Complex II.

- neuroprotective effects of antioxidants in experimental stroke. *FASEB J.* 17:2082–2084; 2003.
- [6] Sheng, H.; Spasojevic, I.; Warner, D. S.; Batimic-Haberle, I. Mouse spinal cord compression injury is ameliorated by intrafocal cationic manganese (III) porphyrin catalytic antioxidant therapy. *Neurosci. Lett.* **366**:220–225; 2004.
- [7] Lanicewski, N. G.; Grayson, J. M. Antifungal treatment reduces expansion and contraction of antigen-specific CD8⁺ T cells during primary but not secondary viral infection. *J. Virol.* **78**:11246–11257; 2004.
- [8] Day, B. J. Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. *Drug Discov. Today* **9**:557–566; 2004.
- [9] Nim, N.; Cassina, A.; Hoggia, J.; Alfonso, E.; Boffi, H.; Peluffo, G.; Trostchansky, A.; Bhatnagar, C.; Radi, R.; Kubbo, H.; Hurtado, F. J. Septic diaphragmatic dysfunction is prevented by Mn(III)porphyrin therapy and inducible nitric oxide synthase inhibition. *Intens. Care Med.* **30**:2271–2278; 2004.
- [10] Batimic-Haberle, I.; Spasojevic, I.; Hambricht, P.; Benov, L.; Crumbüss, A. L.; Fridovich, I. Relationship among redox potential, proton dissociation constants of pyrolic nitrogens and *in vivo* and *in vitro* superoxide dismutating activities of manganese(II) an iron (III) water soluble porphyrins. *Inorg. Chem.* **38**:4011–4022; 1999.
- [11] Faulkner, K. M.; Liochev, S. I.; Fridovich, I. Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase *in vitro* and substitute for it *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **269**:23471–23476; 1994.
- [12] Batimic-Haberle, I. Manganese porphyrins and related compounds as mimics of superoxide dismutase. *Methods Enzymol.* **349**:223–233; 2002.
- [13] Batimic-Haberle, I.; Spasojevic, I.; Stevens, R. D.; Hambricht, P.; Neta, P.; Okada-Matsumoto, A.; Fridovich, I. New class of potent catalysts of O₂(^{•-}) radical (oxo⁻) dismutation. Mn(II)ortho-methoxyethylpyridyl- and di-ortho-methoxyethylimidazolopyrroleporphyrins. *Dalton Trans.* 1696–1702; 2001.
- [14] Day, B. J.; Fridovich, I.; Crapo, J. D. Manganese porphyrins possess catalase activity and protect endothelial cells against hydrogen peroxide-mediated injury. *Arch. Biochem. Biophys.* **347**:256–262; 1997.
- [15] Lee, J.; Hunt, J. A.; Groves, J. T. Rapid decomposition of peroxyinitrite by manganese porphyrin-antioxidant redox couples. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**:2913–2918; 1997.
- [16] Ferrer-Sueta, G.; Batimic-Haberle, I.; Spasojevic, I.; Fridovich, I.; Radi, R. Catalytic scavenging of peroxyinitrite by isomeric Mn(III) N-methylpyridylporphyrins in the presence of reductants. *Chem. Res. Toxicol.* **12**:442–449; 1999.
- [17] Ferrer-Sueta, G.; Vittori, D.; Batimic-Haberle, I.; Fridovich, I.; Gohlstein, S.; Czupski, G.; Radi, R. Reactions of manganese porphyrin with peroxyinitrite and carbonate radical anion. *J. Biol. Chem.* **278**:27432–27438; 2003.
- [18] Melow, S.; Schneider, J. A.; Day, B. J.; Hinerfeld, D.; Coskun, P.; Mirra, S. S.; Crapo, J. D.; Wallace, D. C. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase [see comments]. *Nat. Genet.* **18**:159–163; 1998.
- [19] Melow, S.; Dochrow, S. R.; Schneider, J. A.; Haberson, J.; Patel, M.; Coskun, P. E.; Huffeum, K.; Wallace, D. C.; Malfrey, B. T. lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullzygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J. Neurosci.* **21**:8348–8353; 2001.
- [20] Pfeiffer, S.; Schmalmer, A.; Koesling, D.; Schmidt, K.; Mayer, B. Molecular actions of a Mn(III)Porphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxyinitrite scavenger: reaction with nitric oxide and direct inhibition of NO synthase and soluble guanylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* **53**:795–800; 1998.
- [21] Kachadourian, R.; Johnson, C. A.; Min, E.; Spasojevic, I.; Day, B. J. Flavon-dependent antioxidant properties of a new series of meso-N,N'-dialkyl-imidazolium substituted manganese(III) porphyrins. *Biochem. Pharmacol.* **67**:77–85; 2004.
- [22] Radi, R.; Denicola, A.; Alvarez, B.; Ferrer-Sueta, G.; Rubbo, H. The biological chemistry of peroxyinitrite. In: Ignarro, L. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology. San Diego: Academic Press; 2000; 57–82.
- [23] Bonini, M. G.; Radi, R.; Ferrer-Sueta, G.; Ferreira, A. M.; Augusto, O. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxyinitrite and carbon dioxide [published erratum appears in *J. Biol. Chem.* 274(2):19508; 1999]. *J. Biol. Chem.* **274**:10802–10806; 1999.
- [24] Ferrer-Sueta, G.; Quijano, C.; Alvarez, B.; Radi, R. Reactions of manganese porphyrins and manganese-superoxide dismutase with peroxyinitrite. *Methods Enzymol.* **349**:23–37; 2002.
- [25] Kurz, C. R.; Kissner, R.; Nausser, T.; Perrin, D.; Koppenol, W. H. Rapid scavenging of peroxyinitric acid by monohydroascorbate. *Free Radic. Biol. Med.* **35**:1529–1537; 2003.
- [26] Lee, J.; Hunt, J. A.; Groves, J. T. Mechanism of iron porphyrin reactions with peroxyinitrite. *J. Am. Chem. Soc.* **120**:7493–7501; 1998.
- [27] Stern, M. K.; Jensen, M. L.; Kramer, K. Peroxyinitrite decomposition catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **118**:8735–8736; 1996.
- [28] Dubousson, M.; Vander Stricht, D.; Clappe, A.; Etienne, F.; Nausser, T.; Kissner, R.; Koppenol, W. H.; Rees, L. F.; Knoops, B. Human peroxiredoxin 5 is a peroxyinitrite reductase. *FEBS Lett.* **571**:161–165; 2004.
- [29] Jaeger, T.; Budde, H.; Flohe, L.; Menge, U.; Singh, M.; Trujillo, M.; Radi, R. Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **423**:182–191; 2004.
- [30] Trujillo, M.; Budde, H.; Pincyro, M. D.; Stelbr, M.; Kobello, C.; Flohe, L.; Radi, R. Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi trypanredoxin peroxidases catalytically detoxify peroxyinitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J. Biol. Chem.* **279**:34175–34182; 2004.
- [31] Bryk, R.; Griffin, P.; Nathan, C. Peroxyinitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **407**:211–215; 2000.
- [32] Batimic-Haberle, I.; Spasojevic, I.; Fridovich, I. Tetrahydrobiopterin rapidly reduces the SOD mimic Mn(III)ortho-tetrakis(N-methylpyridinium-2-yl)porphyrin. *Free Radic. Biol. Med.* **37**:367–374; 2004.
- [33] Batimic-Haberle, I.; Benov, L.; Spasojevic, I.; Fridovich, I. The ortho effect makes manganese(III) meso-tetrakis(N-methylpyridinium-2-yl)porphyrin a powerful and potentially useful superoxide dismutase mimic. *J. Biol. Chem.* **273**:24521–24528; 1998.
- [34] Batimic-Haberle, I.; Spasojevic, I.; Stevens, R. D.; Hambricht, P.; Fridovich, I. Manganese(II) meso-tetrakis(ortho-N-alkylpyridyl)porphyrins: synthesis, characterization, and catalysis of O₂^{•-} dismutation. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2689–2696; 2002.
- [35] Radi, R.; Baekman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A. Peroxyinitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**:4744–4750; 1991.
- [36] Ragan, L.; Wilson, M. T.; Darley-Usmar, V. M.; Lowe, P. N. Subfractionation of mitochondria and isolation of the proteins of oxidative phosphorylation. In: Darley-Usmar, V.M., Rickwood, D., Wilson, M.T. (Eds.), Mitochondria: A Practical Approach. IRL Press, Oxford; 1987 pp. 79–112.
- [37] Mendes, P. GEPAS: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Comput. Appl. Biosci.* **9**:563–571; 1993.
- [38] Mendes, P. Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem. Sci.* **22**:361–363; 1997.
- [39] Hatfei, Y. The enzymes and the enzyme complexes of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. In: Martonosi, A.V. (Ed.), The enzymes of biological membranes, vol. 4. Plenum, New York; 1976 pp. 3–41.
- [40] Hatfei, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* **54**:1015–1069; 1985.
- [41] Hadersicht, L.; Ohnishi, F. Progress in Succinate: quonone oxidoreductase research. In: Neuburger, A.; van Deenen, L.L.M. (Eds.). New comprehensive biochemistry, vol. 23. Elsevier Science, Amsterdam; 1992 pp. 163–198.
- [42] Chen, F.; Cheng, S.; Yu, C.; Liu, M.; Su, Y. O. Electrochemical characterization and electrocatalysis of high valent manganese meso-tetrakis(N-methyl-2-pyridyl)porphyrin. *J. Electroanal. Chem.* **474**:82–89; 1999.
- [43] Rubbo, H.; Denicola, A.; Radi, R. Peroxyinitrite inactivates thiol-containing enzymes of Trypanosoma cruzi energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**:96–102; 1994.
- [44] Cassina, A.; Radi, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxyinitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* **328**:309–316; 1996.

Resultados adicionales al trabajo 4

Otras porfirinas

En el trabajo 4 se presentaron detalles de cómo estudiamos la cinética de esta reacción, que resultó menos sencilla que las oxidaciones previas con ONOO^- . En resumen podemos plantear la secuencia de reacciones



con constantes de velocidad k_1 y k_{-1} , seguida de la ruptura del enlace peróxido:



cuya constante de velocidad es k_2

La ley de velocidad global para el proceso es:

$$-\frac{d[\text{Mn}^{\text{II}}\text{P}]}{dt} = \frac{k_2 k_1 [\text{ONOO}^-]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [\text{ONOO}^-]} [\text{Mn}^{\text{II}}\text{P}]$$

donde se observa que no se pueden obtener independientemente los valores de k_1 y k_{-1} a partir de los gráficos de $k_{\text{obs}} = f([\text{ONOO}^-])$.

Incluimos en la Tabla 9 algunos datos no publicados para otras dos porfirinas que estudiamos simultáneamente a la informada en el trabajo 4:

MnPorfirina	k_1 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) ^a	k_2 (s^{-1})
MnTE-2-PyP	$> 7 \times 10^6$	$1.3 \pm 0.2 \times 10^3$
MnTM-4-PyP	$> 4.3 \times 10^6$	$4.6 \pm 0.3 \times 10^2$
MnTM-2-PyP	$> 1.3 \times 10^7$	$3.4 \pm 0.2 \times 10^2$

Tabla 9. Constantes de velocidad para la oxidación de Mn^{II} Porfirinas con ONOO^- .

^a Estos valores son en realidad el límite inferior de $k_2 k_1 / (k_{-1} + k_2)$ que es un número menor o igual que k_1

La complejidad de la cinética hizo más difícil obtener valores de k_1 y éstos no son del todo reproducibles dado que es necesario transformar los resultados experimentales para hallarlos, lo que aumenta la incertidumbre; no obstante, siempre encontramos valores cercanos a $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Independientemente de esta dificultad y de que sólo podemos llegar a límites inferiores de k_1 , la existencia de una reacción rápida, de dos electrones, entre Mn^{II} Porfirinas y ONOO^- permite establecer la tercera hipótesis de esta tesis:

SE PUEDE CATALIZAR LA REDUCCIÓN DE PEROXINITRITO CON PORFIRINAS DE MANGANESO(II) SI LOS COMPLEJOS METÁLICOS SE REDUCEN CON UN REDUCTOR ENZIMÁTICO DE TAL SUERTE QUE LA REDUCCIÓN PRODUCE NITRITO Y LA O=MNPORFIRINA CORRESPONDIENTE, EL CICLO CATALÍTICO SE COMPLETA CON UNA O DOS REDUCCIONES QUE DAN NUEVAMENTE EL COMPLEJO DE Mn(II). ESTE CICLO CATALÍTICO NO GENERA RADICALES LIBRES.

La hipótesis aparece en forma esquemática en la Figura 16, que es una elaboración del ciclo catalítico propuesto previamente (ver la pág. 45)

Este ciclo es potencialmente más efectivo que el de Mn^{III}/Mn^{IV} dado que no se genera

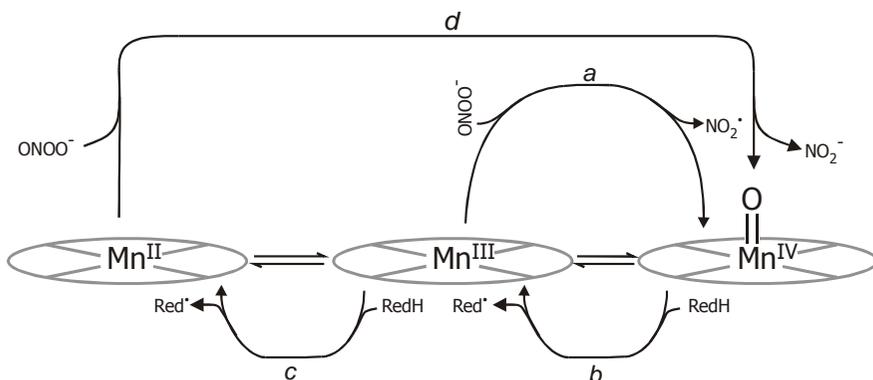


Figura 16. Esquema de reacciones para la catálisis de reducción de peroxinitrito por dos electrones

$\cdot NO_2$ y ya que la reducción propuesta para la reacción C es enzimática, si se cuenta con la enzima adecuada, se puede escoger cuál sustrato se desea acoplar a la reducción de las MnPorfirinas. Vimos antes que succinato y NADH son buenas opciones para la reducción mitocondrial, en particular, vimos en el trabajo 4 que el succinato podía usarse como reductor en última instancia para proteger las actividades enzimáticas de la cadena mitocondrial de electrones frente a una oxidación con $ONOO^-$. Sin embargo, la indagación de detalles de la reducción mitocondrial nos llevó a nuevos reductores posibles.

Otros reductores adecuados

Para estudiar en mayor detalle la reducción de MnPorfirinas por parte de la cadena mitocondrial de transporte de electrones necesitábamos tener una solución esencialmente libre de oxígeno ($< 100 \mu M$) al mismo tiempo que inhibíamos segmentos de la cadena respiratoria para hallar el/los sitio(s) de reducción. Debido a la inhibición y dado que el

experimento exigía la adición en secuencia de varios reactivos en solución (con el agregado concomitante de O_2 disuelto) convenía contar con *otro* sistema independiente capaz de consumir el oxígeno en forma continua.

Nuestro primer impulso, dados los antecedentes del laboratorio, fue intentar con xantina oxidasa e hipoxantina con catalasa; el segundo impulso fue glucosa oxidasa con glucosa y catalasa. Ambos sistemas funcionaron, es decir, consumieron el oxígeno en forma rápida, eficiente y continua, independientemente del estado de inhibición de la cadena respiratoria. Quizá el problema es que funcionaron demasiado bien, una vez consumido el oxígeno, o gran parte del él, las enzimas catalizaban la reducción de las porfirinas, también en forma independiente de la cadena respiratoria.

La característica común entre NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, xantina oxidasa y glucosa oxidasa es la presencia de un grupo prostético flavina, así que el tercer impulso fue emplear una enzima que consumiera oxígeno y que no contuviera una flavina. Afortunadamente, en el laboratorio teníamos urato oxidasa (E.C. 1.7.3.3), una enzima que tiene la peculiaridad de poder reducir oxígeno sin necesidad de un grupo prostético⁽¹⁵³⁾. Los controles resultaron exitosos dado que la urato oxidasa consumió el oxígeno sin reducir a la porfirina y eso permitió indagar los sitios de reducción como se muestra en el trabajo 4.

¿Qué aspectos importan en la reducción de porfirinas?

A lo largo del trabajo 4 nos topamos con cuatro flavoenzimas capaces de reducir a las MnPorfirinas y aparentemente no todas lo hacían con la misma velocidad. La disparidad más notoria fue quizá entre las dos enzimas de la cadena respiratoria, con las que siempre observamos que la reducción era más rápida si usábamos NADH que si usábamos succinato como sustrato reductor. Esto nos dio indicios para pensar que una flavina con un potencial redox menor sería más rápida para reducir. No contamos en este momento con experimentos cuantitativos que nos permitan comparar constantes de velocidad y que sustenten la hipótesis de que los potenciales redox de las flavinas son determinantes, pero presentaremos algunos indicios de que la hipótesis está en la dirección correcta.

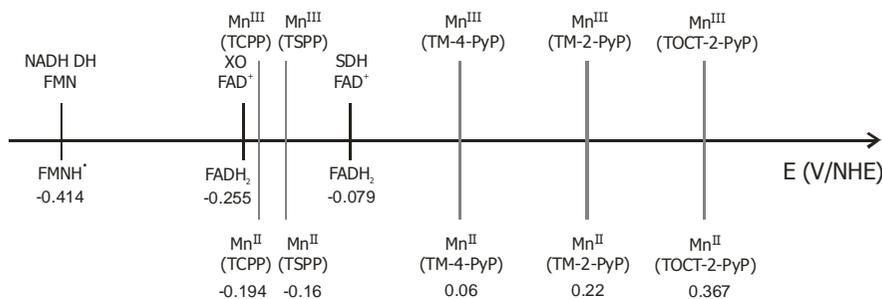


Figura 17. Potenciales redox para algunas porfirinas de manganeso y flavoenzimas.

Los potenciales redox se obtuvieron de la literatura para MnPorfirinas^(4,34,35) y flavoenzimas⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾.

En la figura 2 del trabajo 4 se muestra y se discute que aunque debería haber más unidades catalíticas de succinato deshidrogenasa que de NADH deshidrogenasa (el doble⁽¹⁵⁷⁾), la reducción de MnTE-2-PyP es unas 10 veces más rápida con NADH que con succinato en presencia de la misma preparación de partículas submitocondriales. Una evidencia adicional en esta misma línea de pensamiento implica a la reducción de MnTSPP, mostramos en la Figura 14 que esta porfirina se reduce muy lentamente con NADH y PSM, el mismo experimento realizado con succinato y PSM no produjo reducción en un tiempo razonable comparable. Si comparamos los potenciales redox de algunas flavoenzimas y algunas MnPorfirinas (Figura 17) encontraremos que tal comportamiento es al menos esperable ya que la flavina de la succinato deshidrogenasa no es suficientemente reductora.

Desde la perspectiva inversa, tratamos de reducir una serie de MnPorfirinas con la misma concentración de xantina oxidasa/hipoxantina (potencial redox -0.255 V/ENH, pH 7.5⁽¹⁵⁶⁾). Los resultados nuevamente fueron congruentes con la tendencia esperada de los potenciales redox de las porfirinas. Esto se puede apreciar en la Figura 18, donde se presenta el cambio de absorbancia correspondiente al 20% final de la reducción de la porfirina seguida en cada caso a la longitud de onda del máximo de la banda de Soret del complejo de Mn(II). Ajustamos estos cursos temporales a una ecuación de velocidad de primer orden y los resultados están en la Tabla 10. En la figura y la tabla puede verse que los resultados siguen a grandes rasgos la tendencia esperada, no obstante, la correlación dista mucho de ser buena.

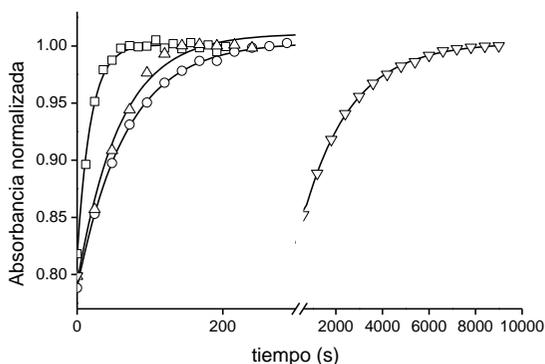


Figura 18. Reducción de diferentes MnPorfirinas por hipoxantina/xantina oxidasa. Condiciones: amortiguador de fosfato a pH 7.4. La ordenada representa una función de absorbancia normalizada para poder comparar complejos que tienen diferentes valores de $\Delta\epsilon$ en la longitud de onda del máximo correspondiente del complejo de Mn(II). Los datos corresponden a MnTHex-2-PyP (∇), MnTE-2-PyP (\circ), MnTM-4-PyP (\circ), MnTSPP (\square).

Esta parte de la reactividad está aún por caracterizarse, para comprender mejor los factores que gobiernan la reducción debemos considerar al menos el entorno electrostático de la flavina y el manganeso, la accesibilidad del cofactor y quizá algunos otros parámetros que ahora no imaginamos.

Cuando propusimos el proyecto de esta tesis pensábamos evaluar la protección de MnPorfirinas sobre algunos “blancos bioquímicos sensibles como la aconitasa y albúmina”. En realidad no lo hicimos, como casi siempre, el desarrollo del conocimiento y de nuevas herramientas nos llevó a que nuestros blancos sensibles fueran componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La relevancia de uno u otro blanco es, por supuesto, opinable. Sin embargo, la protección de succinato deshidrogenasa observada no es en sí misma el resultado principal de este último trabajo. Más bien nos parece que haber encontrado una nueva secuencia de reacciones capaces de proporcionar protección en un sitio tan crítico como la mitocondria es el punto final que buscábamos (sin saberlo) al iniciar el trabajo años atrás.

Tabla 10. Resultados del ajuste no lineal de primer orden a los cursos temporales de la Figura 18

Complejo	k (s^{-1})	$E_{1/2}$ (V/ENH)
MnTHex-2-PyP	0.054	0.314
MnTE-2-PyP	0.015	0.228
MnTM-4-PyP	0.017	0.06
MnTSPP	4.9×10^{-4}	-0.16

Conclusiones

Los datos centrales obtenidos al final de la tesis pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Caracterizamos la reacción entre Mn^{III} Porfirinas y peroxinitrito, cuyas constantes de velocidad tienen valores entre 10^5 y $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y están entre las reacciones más rápidas del peroxinitrito. Esta reactividad correlaciona fuertemente con propiedades de la porfirina, por ejemplo, el potencial redox del par $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{II}}$, pero también está sujeta a otras condiciones como la hidrofobicidad del entorno del ion manganeso. La construcción de correlaciones ha permitido el diseño y síntesis de compuestos con mayor reactividad frente a superóxido y presumiblemente frente a peroxinitrito.
2. Estudiamos la reducción de $\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}$ Porfirinas por ascorbato, urato, glutatión y tirosina y encontramos que las tendencias de reactividad dependen mucho de cuál es el reductor, su dureza y su carga eléctrica, y poco de cuál es la porfirina. Esta tendencia es congruente con una mínima variación en el potencial redox del par $\text{Mn}^{\text{IV}}/\text{Mn}^{\text{III}}$. Estas reacciones de reducción completan un ciclo catalítico entre Mn^{III} y Mn^{IV} capaz de inactivar al peroxinitrito y otros oxidantes a través de la redirección de su reactividad hacia blancos fáciles de recuperar. Las tendencias de reactividad también permiten comprender un poco mejor la nitración de tirosina catalizada por Mn Porfirinas.
3. Encontramos que el radical carbonato reacciona muy rápidamente tanto con Mn^{III} Porfirinas como con Mn^{II} Porfirinas y la velocidad de estas reacciones hace pensar que se podrían proteger blancos bioquímicos del radical carbonato por competencia cinética simple. Además, el radical carbonato podría participar como oxidante en el ciclo catalítico mencionado en el punto 2 y su reactividad también sería redirigida hacia blancos preferidos como ascorbato o urato.
4. La reducción de Mn^{III} Porfirinas por flavoenzimas y en particular por la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa de la cadena mitocondrial de transporte de electrones permite establecer un nuevo ciclo catalítico de reducción de peroxinitrito y radical carbonato, que involucra los estados de oxidación Mn^{II} , Mn^{III} y Mn^{IV} . Este ciclo también es suficientemente rápido como para proporcionar protección de blancos sensibles. Así, existe la posibilidad de que la protección se coloque en sitios ricos en flavoenzimas reductoras y que al mismo tiempo son blancos clave de los efectos del estrés oxidativo, un ejemplo claro sería la matriz mitocondrial.

Epílogo

Después de leer nuevamente el proyecto que originó esta tesis con una perspectiva de unos cuantos años y a la luz de los resultados obtenidos, podemos pensar que hemos sido afortunados. Esperábamos obtener una colección de constantes de velocidad que nos condujeran a ciclos catalíticos que esperábamos protectores. Ese objetivo ha sido cumplido globalmente, pero además pensamos que hemos encontrado un vínculo clave entre la reactividad de las porfirinas y su protección biológica. Este vínculo radica en la mitocondria, que al mismo tiempo es capaz de generar la mayor parte de las especies reactivas de oxígeno y de activar con singular eficiencia a las MnPorfirinas mediante su reducción a Mn^{II}. La brecha que separa los resultados *in vivo* y de la reactividad *in vitro* permanece, quedan muchos senderos por explorar, tanto de aplicaciones exitosas (esperadas o no) como de aparentes fracasos. El punto más relevante de este trabajo consiste en señalar una dirección más donde buscar y lo podríamos resumir así: *si usas MnPorfirinas en tu modelo animal de estrés oxidativo agudo, no olvides revisar el estado de tus mitocondrias*. Nuestro grupo ya ha comenzado a explorar esta dirección y esperamos continuar⁽⁸²⁾, a reserva de que pueden existir direcciones adicionales que esperamos nos sean indicadas a la brevedad.

Parece central en este momento realizar un estudio detallado de la distribución tisular, celular y subcelular de las MnPorfirinas. Hemos visto que algunos resultados poco exitosos se atribuyen a la dificultad de acceder a un órgano. Cuáles son las características que facilitan la biodisponibilidad y la distribución de los complejos a los sitios donde su catálisis podría ser útil es entonces uno de los caminos a seguir. Por fortuna existen numerosas posibilidades de modificación estructural de los sustituyentes porfirínicos que permitirían alterar dicha biodisponibilidad y distribución. Este camino también ha comenzado a ser explorado⁽³⁸⁾.

Las características de reactividad redox de las MnPorfirinas hacen que todos sus efectos tiendan a explicarse por reacciones de oxidorreducción. No obstante, se han presentado en la literatura otras reacciones que podrían influir sobre situaciones fisiológicas de estrés oxidativo. Por ejemplo, se ha caracterizado la reacción de Mn^{II}Porfirinas con •NO⁽¹⁵²⁾ pero su influencia sobre la biodisponibilidad del •NO *in vivo* todavía no se ha estudiado en profundidad.

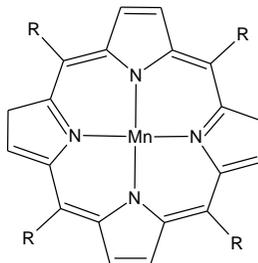
Se mencionaron en la introducción trabajos donde algunas porfirinas afectan la transcripción de genes y la expresión de proteínas^(28,89), no se conoce aún cuál es el mecanismo por el cual las MnPorfirinas afectan estos procesos, existe la posibilidad de que

se trate de mecanismos sin reacciones redox aunque esto es por el momento sólo una especulación.

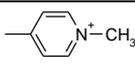
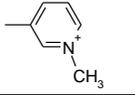
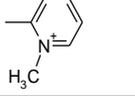
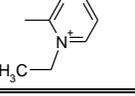
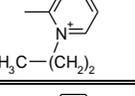
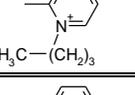
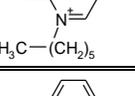
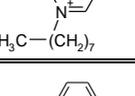
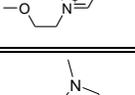
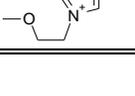
En lo que respecta a nuestro trabajo futuro, estamos intentando caracterizar de manera más específica cuáles son las características de flavoenzimas y MnPorfirinas que facilitan la reducción. Intentaremos también abordar el asunto del transporte, acceso y distribución de las MnPorfirinas a diferentes compartimientos subcelulares. Creemos que estos dos aspectos, reducción y localización, son centrales si se pretende una aplicación farmacéutica para los compuestos estudiados.

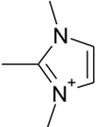
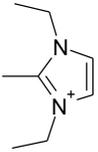
Apéndice - Los compuestos usados

Todas las porfirinas empleadas en este trabajo tienen la estructura general que aparece a la derecha. La siguiente tabla presenta los nombres, abreviaturas y algunas propiedades de los complejos.



sustituyente R	Abreviatura	Nombre*	$E_{1/2}^*$ (mV/ENH)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) ($\epsilon = \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Porfirinas aniónicas				
	Mn ^{III} TCPP	Manganeso (III) tetrakis (4-carboxilato fenil) porfirina (3-)	-0.194	468 (93 000)
	Mn ^{III} TSPP	Manganeso (III) tetrakis (4-sulfonato fenil) porfirina (3-)	-0.16	467 (95 000)
	MnT(2,6-F ₂ -3SO ₃ -P)P	Manganeso (III) tetrakis (2,6-difluoro-4-sulfonato fenil) porfirina (3-)	0.007	
	MnT(2,6-Cl ₂ -3SO ₃ -P)P	Manganeso (III) tetrakis (2,6-dicloro-4-sulfonato fenil) porfirina (3-)	0.088	
	MnT(2,4,6-Me ₃ -3,5-(SO ₃) ₂ -P)P	Manganeso (III) tetrakis (2,4,6-trimetil-3,5-disulfonato fenil) porfirina (7-)	-0.100	

sustituyente R	Abreviatura	Nombre*	$E_{1/2}^*$ (mV/ENH)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) ($\epsilon = \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Porfirinas catiónicas				
	Mn ^{III} TM-4-PyP	Manganeso (III) tetrakis (4- <i>N</i> -metilpiridil) porfirina (5+)	0.06	462 (130 000)
	Mn ^{III} TM-3-PyP	Manganeso (III) tetrakis (3- <i>N</i> -metilpiridil) porfirina (5+)	0.052	460 (139 000)
	Mn ^{III} TM-2-PyP	Manganeso (III) tetrakis (2- <i>N</i> -metilpiridil) porfirina (5+)	0.22	454 (129 000)
	Mn ^{III} TE-2-PyP	Manganeso (III) tetrakis (2- <i>N</i> -etilpiridil) porfirina (5+)	0.228	454 (140 000)
	Mn ^{III} TP-2-PyP	Manganeso (III) tetrakis (2- <i>N</i> -(<i>n</i> -propil) piridil) porfirina (5+)	0.238	454 (162 000)
	Mn ^{III} TB-2-PyP	Manganeso (III) tetrakis (2- <i>N</i> -(<i>n</i> -butil) piridil) porfirina (5+)	0.254	454 (170 000)
	Mn ^{III} THex-2-PyP	Manganeso (III) tetrakis (2- <i>N</i> -(<i>n</i> -hexil) piridil) porfirina (5+)	0.314	454 (162 000)
	Mn ^{III} TOct-2-PyP	Manganeso (III) tetrakis (2- <i>N</i> -(<i>n</i> -octil) piridil) porfirina (5+)	0.367	454 (170 000)
	MnTMOE-2-PyP	Manganeso (III) tetrakis (2- <i>N</i> -(2-metoxi)etilpiridil) porfirina (5+)	0.251	455 (172 500)
	MnTMMOE-1,3-IP	Manganeso (III) tetrakis (1-metil,3-metoxi)etil-2-imidazolioil) porfirina (5+)	0.313	447 (139 000)

sustituyente R	Abreviatura	Nombre*	$E_{1/2}^*$ (mV/ENH)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) ($\epsilon = M^{-1} cm^{-1}$)
	MnTDM-1,3-IP	Manganeso (III) tetrakis (1,3-dimetil)2-imidazolioil porfirina (5+)	0.320	
	MnTDE-1,3-IP	Manganeso (III) tetrakis (1,3-dimetil)2-imidazolioil porfirina (5+)	0.320	446 (120 000)

Referencias

1. Van Leersum, E. C. (1924) *J. Biol. Chem.* **58**, 835 - 844
2. Choudhary, S., Keshavarzian, A., Yong, S., Wade, M., Bocckino, S., Day, B. J., and Banan, A. (2001) *Dig Dis Sci* **46**(10), 2222-2230
3. Obrosova, I. G., Mabley, J. G., Zsengeller, Z., Charniauskaya, T., Abatan, O. I., Groves, J. T., and Szabo, C. (2005) *Faseb J* **19**(3), 401-403
4. Batinic-Haberle, I., Spasojevic, I., Hambright, P., Benov, L., Crumbliss, A. L., and Fridovich, I. (1999) *Inorg Chem* **38**, 4011-4022
5. Groves, J. T. (1999) *Curr Opin Chem Biol* **3**(2), 226-235
6. Groves, J. T., and Marla, S. S. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9578-9579
7. Soret, J.-L. (1883) *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences* **97**, 1269-1270
8. Rothemund, P. (1935) *J. Am. Chem. Soc.* **57**(10), 2010-2011
9. Aronoff, S., and Weast, C. A. (1941) *J. Org. Chem.* **6**(4), 550-557
10. Rothemund, P., and Menotti, A. (1948) *J. Am. Chem. Soc.* **70**(5), 1808-1812
11. Meunier, B. (1992) *Cem Rev* **92**(6), 1411-1456
12. Totter, J. R., De Dugros, E. C., and Riveiro, C. (1960) *J Biol Chem* **235**, 1839-1842
13. McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969) *J Biol Chem* **244**(22), 6049-6055
14. Fridovich, I. (2003) *Annu Rev Biochem* **72**, 1-18
15. Pasternack, R. F., Banth, A., Pasternack, J. M., and Johnson, C. S. (1981) *J Inorg Biochem* **15**(3), 261-267
16. Peretz, P., Solomon, D., Weinraub, D., and Faraggi, M. (1982) *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **42**(4), 449-456
17. Weinraub, D., Levy, P., and Faraggi, M. (1986) *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **50**(4), 649-658
18. Faulkner, K. M., Liochev, S. I., and Fridovich, I. (1994) *J Biol Chem* **269**(38), 23471-23476
19. McCord, J. M., Keele, B. B., Jr., and Fridovich, I. (1971) *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(5), 1024-1027
20. Batinic-Haberle, I., Benov, L., Spasojevic, I., and Fridovich, I. (1998) *J Biol Chem* **273**(38), 24521-24528
21. Day, B. J. (2004) *Drug Discov Today* **9**(13), 557-566
22. Batinic-Haberle, I., Spasojevic, I., Stevens, R. D., Hambright, P., Neta, P., Okado-Matsumoto, A., and Fridovich, I. (2004) *Dalton Trans* (11), 1696-1702
23. Batinic-Haberle, I., Liochev, S. I., Spasojevic, I., and Fridovich, I. (1997) *Arch Biochem Biophys* **343**(2), 225-233
24. Batinic-Haberle, I., Spasojevic, I., Stevens, R. D., Hambright, P., and Fridovich, I. (2002) *J. Chem Soc. Dalton Trans.*, 2689-2696
25. Kachadourian, R., Batinic-Haberle, I., and Fridovich, I. (1999) *Inorg. Chem.* **38**, 391
26. Spasojevic, I., Batinic-Haberle, I., Reboucas, J. S., Idemori, Y. M., and Fridovich, I. (2003) *J Biol Chem* **278**(9), 6831-6837
27. Vujaskovic, Z., Batinic-Haberle, I., Rabbani, Z. N., Feng, Q. F., Kang, S. K., Spasojevic, I., Samulski, T. V., Fridovich, I., Dewhirst, M. W., and Anscher, M. S. (2002) *Free Radic Biol Med* **33**(6), 857-863.

28. Sheng, H., Enghild, J. J., Bowler, R., Patel, M., Batinic-Haberle, I., Calvi, C. L., Day, B. J., Pearlstein, R. D., Crapo, J. D., and Warner, D. S. (2002) *Free Radic Biol Med* **33**(7), 947-961.
29. Ross, A. D., Sheng, H., Warner, D. S., Piantadosi, C. A., Batinic-Haberle, I., Day, B. J., and Crapo, J. D. (2002) *Free Radic Biol Med* **33**(12), 1657-1669
30. Piganelli, J. D., Flores, S. C., Cruz, C., Koopp, J., Batinic-Haberle, I., Crapo, J., Day, B., Kachadourian, R., Young, R., Bradley, B., and Haskins, K. (2002) *Diabetes* **51**(2), 347-355.
31. Melov, S., Doctrow, S. R., Schneider, J. A., Haberson, J., Patel, M., Coskun, P. E., Huffman, K., Wallace, D. C., and Malfroy, B. (2001) *J Neurosci* **21**(21), 8348-8353
32. Kachadourian, R., Batinic-Haberle, I., and Fridovich, I. (1999) *Inorg. Chem.* **38**(2), 391-396
33. Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1992) *Chem Res Toxicol* **5**(6), 834-842
34. Jin, N., Bourassa, J. L., Tizio, S. C., and T, G. J. (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**(21), 3849-3851
35. Chen, F. C., Cheng, S. H., Yu, C. H., Liu, M. H., and Su, Y. O. (1999) *J. Electroanalytical Chem.* **474**, 52-59
36. Koppenol, W. H. (1987) *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **18**, 3-11
37. Huie, R., Clifton, C., and Neta, P. (1991) *Rad. Phys. Chem.* **38**(5), 477-481
38. Batinic-Haberle, I., Spasojevic, I., Stevens, R. D., Bondurant, B., Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I., Vujaskovic, Z., and Dewhirst, M. W. (2006) *Dalton Trans* (4), 617-624
39. Melov, S., Schneider, J. A., Day, B. J., Hinerfeld, D., Coskun, P., Mirra, S. S., Crapo, J. D., and Wallace, D. C. (1998) *Nat Genet* **18**(2), 159-163
40. Epstein, C. J., Avraham, K. B., Lovett, M., Smith, S., Elroy-Stein, O., Rotman, G., Bry, C., and Groner, Y. (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(22), 8044-8048
41. Huang, T. T., Carlson, E. J., Raineri, I., Gillespie, A. M., Kozy, H., and Epstein, C. J. (1999) *Ann N Y Acad Sci* **893**, 95-112
42. Sun, J., and Tower, J. (1999) *Mol Cell Biol* **19**(1), 216-228
43. Huang, T. T., Carlson, E. J., Gillespie, A. M., Shi, Y., and Epstein, C. J. (2000) *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**(1), B5-9
44. Ho, Y. S., Vincent, R., Dey, M. S., Slot, J. W., and Crapo, J. D. (1998) *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**(4), 538-547
45. Oury, T. D., Ho, Y. S., Piantadosi, C. A., and Crapo, J. D. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(20), 9715-9719
46. Levin, E. D., Brady, T. C., Hochrein, E. C., Oury, T. D., Jonsson, L. M., Marklund, S. L., and Crapo, J. D. (1998) *Behav Genet* **28**(5), 381-390
47. Milano, J., and Day, B. J. (2000) *Nucleic Acids Res* **28**(4), 968-973
48. Li, Q. Y., Pedersen, C., Day, B. J., and Patel, M. (2001) *J Neurochem* **78**(4), 746-755
49. Kachadourian, R., Flaherty, M. M., Crumbliss, A. L., Patel, M., and Day, B. J. (2003) *J Inorg Biochem* **95**(4), 240-248
50. Cemerski, S., Cantagrel, A., Van Meerwijk, J. P., and Romagnoli, P. (2002) *J Biol Chem* **277**(22), 19585-19593
51. Patel, M. N. (2003) *Aging Cell* **2**(4), 219-222
52. Kusmartsev, S. A., Li, Y., and Chen, S. H. (2000) *J Immunol* **165**(2), 779-785
53. Pimentel, D. R., Amin, J. K., Xiao, L., Miller, T., Viereck, J., Oliver-Krasinski, J., Baliga, R., Wang, J., Siwik, D. A., Singh, K., Pagano, P., Colucci, W. S., and Sawyer, D. B. (2001) *Circ Res* **89**(5), 453-460
54. Kaul, S., Kanthasamy, A., Kitazawa, M., Anantharam, V., and Kanthasamy, A. G. (2003) *Eur J Neurosci* **18**(6), 1387-1401
55. Dare, E., Tofighi, R., Nutt, L., Vettori, M. V., Emgard, M., Mutti, A., and Ceccatelli, S. (2004) *Toxicology* **201**(1-3), 125-132
56. MacCarthy, P. A., Grieve, D. J., Li, J. M., Dunster, C., Kelly, F. J., and Shah, A. M. (2001) *Circulation* **104**(24), 2967-2974

57. Pfeiffer, S., Lass, A., Schmidt, K., and Mayer, B. (2001) *Faseb J* **15**(13), 2355-2364
58. d'Uscio, L. V., Smith, L. A., and Katusic, Z. S. (2001) *Stroke* **32**(11), 2658-2664
59. Kurz, B., Lemke, A., Kehn, M., Domm, C., Patwari, P., Frank, E. H., Grodzinsky, A. J., and Schunke, M. (2004) *Arthritis Rheum* **50**(1), 123-130
60. Kachadourian, R., Johnson, C. A., Min, E., Spasojevic, I., and Day, B. J. (2004) *Biochem Pharmacol* **67**(1), 77-85
61. Trostchansky, A., Ferrer-Sueta, G., Batthyany, C., Botti, H., Batinic-Haberle, I., Radi, R., and Rubbo, H. (2003) *Free Radic Biol Med* **35**(10), 1293-1300
62. Oury, T. D., Thakker, K., Menache, M., Chang, L. Y., Crapo, J. D., and Day, B. J. (2001) *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**(2), 164-169
63. Smith, K. R., Uyeminami, D. L., Kodavanti, U. P., Crapo, J. D., Chang, L. Y., and Pinkerton, K. E. (2002) *Free Radic Biol Med* **33**(8), 1106-1114
64. Chang, L. Y., and Crapo, J. D. (2002) *Free Radic Biol Med* **33**(3), 379-386
65. Bowler, R. P., Arcaroli, J., Abraham, E., Patel, M., Chang, L. Y., and Crapo, J. D. (2003) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**(4), L680-687
66. Chang, L. Y., Subramaniam, M., Yoder, B. A., Day, B. J., Ellison, M. C., Sunday, M. E., and Crapo, J. D. (2003) *Am J Respir Crit Care Med* **167**(1), 57-64
67. Frame, M. D., Fox, R. J., Kim, D., Mohan, A., Berk, B. C., and Yan, C. (2002) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(6), H2377-2385
68. Liang, L. P., Ho, Y. S., and Patel, M. (2000) *Neuroscience* **101**(3), 563-570
69. Niwa, K., Carlson, G. A., and Iadecola, C. (2000) *J Cereb Blood Flow Metab* **20**(12), 1659-1668
70. Aladag, M. A., Turkoz, Y., Sahna, E., Parlakpinar, H., and Gul, M. (2003) *Acta Neurochir (Wien)* **145**(8), 673-677
71. Niwa, K., Porter, V. A., Kazama, K., Cornfield, D., Carlson, G. A., and Iadecola, C. (2001) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(6), H2417-2424
72. Leski, M. L., Bao, F., Wu, L., Qian, H., Sun, D., and Liu, D. (2001) *Free Radic Biol Med* **30**(6), 613-624
73. Mackensen, G. B., Patel, M., Sheng, H., Calvi, C. L., Batinic-Haberle, I., Day, B. J., Liang, L. P., Fridovich, I., Crapo, J. D., Pearlstein, R. D., and Warner, D. S. (2001) *J Neurosci* **21**(13), 4582-4592
74. Klein, M., Koedel, U., Pfister, H. W., and Kastenbauer, S. (2003) *Ann Neurol* **54**(4), 451-458
75. Crow, J. P., Calingasan, N. Y., Chen, J., Hill, J. L., and Beal, M. F. (2005) *Ann Neurol* **58**(2), 258-265
76. Petri, S., Kiaei, M., Kipiani, K., Chen, J., Calingasan, N. Y., Crow, J. P., and Beal, M. F. (2005) *Neurobiol Dis*
77. Ferret, P. J., Hammoud, R., Tulliez, M., Tran, A., Trebeden, H., Jaffray, P., Malassagne, B., Calmus, Y., Weill, B., and Batteux, F. (2001) *Hepatology* **33**(5), 1173-1180
78. Malassagne, B., Ferret, P. J., Hammoud, R., Tulliez, M., Bedda, S., Trebeden, H., Jaffray, P., Calmus, Y., Weill, B., and Batteux, F. (2001) *Gastroenterology* **121**(6), 1451-1459
79. Hines, I. N., Hoffman, J. M., Scheerens, H., Day, B. J., Harada, H., Pavlick, K. P., Bharwani, S., Wolf, R., Gao, B., Flores, S., McCord, J. M., and Grisham, M. B. (2003) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**(3), G536-545
80. Wang, W., Jittikanont, S., Falk, S. A., Li, P., Feng, L., Gengaro, P. E., Poole, B. D., Bowler, R. P., Day, B. J., Crapo, J. D., and Schrier, R. W. (2003) *Am J Physiol Renal Physiol* **284**(3), F532-537
81. Laniewski, N. G., and Grayson, J. M. (2004) *J Virol* **78**(20), 11246-11257
82. Nin, N., Cassina, A., Boggia, J., Alfonso, E., Botti, H., Peluffo, G., Trostchansky, A., Batthyany, C., Radi, R., Rubbo, H., and Hurtado, F. J. (2004) *Intensive Care Med* **30**(12), 2271-2278
83. Ferrer-Sueta, G., Vitturi, D., Batinic-Haberle, I., Fridovich, I., Goldstein, S., Czapski, G., and Radi, R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**(30), 27432-27438

84. Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X., and et al. (1994) *Science* **264**(5166), 1772-1775
85. Wu, A. S., Kiaei, M., Aguirre, N., Crow, J. P., Calingasan, N. Y., Browne, S. E., and Beal, M. F. (2003) *J Neurochem* **85**(1), 142-150
86. Zhao, Y., Chaiswing, L., Oberley, T. D., Batinic-Haberle, I., St Clair, W., Epstein, C. J., and St Clair, D. (2005) *Cancer Res* **65**(4), 1401-1405
87. Zhao, Y., Xue, Y., Oberley, T. D., Kiningham, K. K., Lin, S. M., Yen, H. C., Majima, H., Hines, J., and St Clair, D. (2001) *Cancer Res* **61**(16), 6082-6088
88. Zhao, Y., Oberley, T. D., Chaiswing, L., Lin, S. M., Epstein, C. J., Huang, T. T., and St Clair, D. (2002) *Oncogene* **21**(24), 3836-3846
89. Bowler, R. P., Sheng, H., Enghild, J. J., Pearlstein, R. D., Warner, D. S., and Crapo, J. D. (2002) *Free Radic Biol Med* **33**(8), 1141-1152
90. Kim, J., Kil, I. S., Seok, Y. M., Yang, E. S., Kim, D. K., Lim, D. G., Park, J. W., Bonventre, J. V., and Park, K. M. (2006) *J Biol Chem* **281**(29), 20349-20356
91. Leinenweber, S. B., Sheng, H., Lynch, J. R., Wang, H., Batinic-Haberle, I., Laskowitz, D. T., Crapo, J. D., Pearlstein, R. D., and Warner, D. S. (2006) *Eur J Pharmacol* **531**(1-3), 126-132
92. Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., and Rubbo, H. (2000) The biological chemistry of peroxynitrite. In: Ignarro, L. (ed) *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, Academic Press
93. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., and Cayota, A. (2001) *Free Radic Biol Med* **30**(5), 463-488.
94. Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., and Castro, L. (2002) *Free Radic Biol Med* **33**(11), 1451-1464.
95. Alvarez, B., and Radi, R. (2003) *Amino Acids* **25**(3-4), 295-311
96. Virag, L., Szabo, E., Gergely, P., and Szabo, C. (2003) *Toxicol Lett* **140-141**, 113-124.
97. Klotz, L. O., Schroeder, P., and Sies, H. (2002) *Free Radic Biol Med* **33**(6), 737-743.
98. Squadrito, G. L., and Pryor, W. A. (2002) *Chem Res Toxicol* **15**(7), 885-895.
99. Goldstein, S., Lind, J., and Merenyi, G. (2005) *Chem Rev* **105**(6), 2457-2470
100. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(4), 1620-1624
101. Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G., and Koppenol, W. H. (1998) *Chem Res Toxicol* **11**(5), 557
102. Lyman, S. V., and Hurst, J. K. (1995) *J. Am. Chem. Soc* **117**, 8867-8868
103. Bonini, M. G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A. M., and Augusto, O. (1999) *J Biol Chem* **274**(16), 10802-10806
104. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) *Arch Biochem Biophys* **333**(1), 49-58
105. Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P., and Wever, R. (1993) *Eur J Biochem* **215**(3), 767-775
106. Thomson, L., Trujillo, M., Telleri, R., and Radi, R. (1995) *Arch Biochem Biophys* **319**(2), 491-497
107. Herold, S., Matsui, T., and Watanabe, Y. (2001) *J Am Chem Soc* **123**(17), 4085-4086
108. Romero, N., Radi, R., Linares, E., Augusto, O., Detweiler, C. D., Mason, R. P., and Denicola, A. (2003) *J Biol Chem* **278**(45), 44049-44057
109. Furtmuller, P. G., Jantschko, W., Zederbauer, M., Schwanninger, M., Jakopitsch, C., Herold, S., Koppenol, W. H., and Obinger, C. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **337**(3), 944-954
110. Bartesaghi, S., Ferrer-Sueta, G., Peluffo, G., Valez, V., Zhang, H., Kalyanaraman, B., and Radi, R. (In press) *Amino Acids*
111. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) *J Biol Chem* **266**(7), 4244-4250

112. Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. (2000) *Nature* **407**(6801), 211-215
113. Jaeger, T., Budde, H., Flohe, L., Menge, U., Singh, M., Trujillo, M., and Radi, R. (2004) *Arch Biochem Biophys* **423**(1), 182-191
114. Trujillo, M., Budde, H., Pineyro, M. D., Stehr, M., Robello, C., Flohe, L., and Radi, R. (2004) *J Biol Chem* **279**(33), 34175-34182
115. Dubuisson, M., Vander Stricht, D., Clippe, A., Etienne, F., Nausier, T., Kissner, R., Koppenol, W. H., Rees, J. F., and Knoops, B. (2004) *FEBS Lett* **571**(1-3), 161-165
116. Nickel, C., Trujillo, M., Rahlfs, S., Deponte, M., Radi, R., and Becker, K. (2005) *Biol Chem* **386**(11), 1129-1136
117. Rettori, D., Oguscu, R., Munhoz, D. C., Netto, L. E. S., and Augusto, O. (2006) *Free Radic Biol Med* **In press**
118. Trujillo, M., and Radi, R. (2002) *Arch Biochem Biophys* **397**(1), 91-98.
119. Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A., and Radi, R. (1999) *J Biol Chem* **274**(2), 842-848
120. Masumoto, H., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1996) *FEBS Lett* **398**(2-3), 179-182
121. Briviba, K., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1998) *Chem Res Toxicol* **11**(12), 1398-1401
122. Arteel, G. E., Mostert, V., Oubrahim, H., Briviba, K., Abel, J., and Sies, H. (1998) *Biol Chem* **379**(8-9), 1201-1205
123. Briviba, K., Roussyn, I., Sharov, V. S., and Sies, H. (1996) *Biochem J* **319**(Pt 1), 13-15
124. Lyman, S. V., and Hurst, J. K. (1996) *Chem Res Toxicol* **9**(5), 845-850
125. Denicola, A., Souza, J. M., and Radi, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7), 3566-3571
126. Quijano, C., Alvarez, B., Gatti, R. M., Augusto, O., and Radi, R. (1997) *Biochem J* **322**(Pt 1), 167-173
127. Castro, L. A., Robalinho, R. L., Cayota, A., Meneghini, R., and Radi, R. (1998) *Arch Biochem Biophys* **359**(2), 215-224
128. Quijano, C., Hernandez-Saavedra, D., Castro, L., McCord, J. M., Freeman, B. A., and Radi, R. (2001) *J Biol Chem* **276**(15), 11631-11638
129. Stern, M. K., Jensen, M. J., and Kramer, K. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8735-8736
130. Misko, T. P., Highkin, M. K., Veenhuizen, A. W., Manning, P. T., Stern, M. K., Currie, M. G., and Salvemini, D. (1998) *J Biol Chem* **273**(25), 15646-15653
131. Salvemini, D., Jensen, M. P., Riley, D. P., and Misko, T. P. (1998) *Drug News Perspect* **11**(4), 204-214
132. Cuzzocrea, S., Mazzone, E., Di Paola, R., Esposito, E., Macarthur, H., Matuschak, G. M., and Salvemini, D. (2006) *J Pharmacol Exp Ther*
133. Brenneisen, P., Steinbrenner, H., and Sies, H. (2005) *Mol Aspects Med* **26**(4-5), 256-267
134. Parnham, M., and Sies, H. (2000) *Expert Opin Investig Drugs* **9**(3), 607-619
135. Briviba, K., Klotz, L. O., and Sies, H. (1999) *Methods Enzymol* **301**, 301-311
136. Riley, D. P. (1999) *Chem Rev* **99**(9), 2573-2588
137. Muscoli, C., Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Zweier, J. L., Thiemermann, C., Wang, Z. Q., and Salvemini, D. (2003) *Br J Pharmacol* **140**(3), 445-460
138. Salvemini, D., and Cuzzocrea, S. (2003) *Crit Care Med* **31**(1 Suppl), S29-38
139. Smith, R. A., Kelso, G. F., Blaikie, F. H., Porteous, C. M., Ledgerwood, E. C., Hughes, G., James, A. M., Ross, M. F., Asin-Cayuela, J., Cocheme, H. M., Filipovska, A., and Murphy, M. P. (2003) *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 6), 1295-1299
140. James, A. M., Cocheme, H. M., and Murphy, M. P. (2005) *Mech Ageing Dev* **126**(9), 982-986
141. Ross, M. F., Da Ros, T., Blaikie, F. H., Prime, T. A., Porteous, C. M., Severina, I., Skulachev, V. P., Kjaergaard, H. G., Smith, R. A., and Murphy, M. P. (2006) *Biochem J*
142. Filipovska, A., Kelso, G. F., Brown, S. E., Beer, S. M., Smith, R. A., and Murphy, M. P. (2005) *J Biol Chem* **280**(25), 24113-24126

143. Dhanasekaran, A., Kotamraju, S., Karunakaran, C., Kalivendi, S. V., Thomas, S., Joseph, J., and Kalyanaraman, B. (2005) *Free Radic Biol Med* **39**(5), 567-583
144. Dhanasekaran, A., Kotamraju, S., Kalivendi, S. V., Matsunaga, T., Shang, T., Keszler, A., Joseph, J., and Kalyanaraman, B. (2004) *J Biol Chem* **279**(36), 37575-37587
145. Asayama, S., Mizushima, K., Nagaoka, S., and Kawakami, H. (2004) *Bioconjug Chem* **15**(6), 1360-1363
146. Asayama, S., Kawamura, E., Nagaoka, S., and Kawakami, H. (2006) *Mol Pharm* **3**(4), 468-470
147. Asayama, S., Mori, T., Nagaoka, S., and Kawakami, H. (2003) *J Biomater Sci Polym Ed* **14**(11), 1169-1179
148. Lee, J., Hunt, J., and Groves, J. T. (1997) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 2913-2918
149. Duncan, I. A., Harriman, A., and Porter, G. (1980) *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **76**, 1415
150. Mendes, P. (1997) *Trends Biochem Sci* **22**(9), 361-363
151. Mendes, P. (1993) *Comput Appl Biosci* **9**(5), 563-571
152. Spasojevic, I., Batinic-Haberle, I., and Fridovich, I. (2000) *Nitric Oxide* **4**(5), 526-533
153. Conley, T. G., and Priest, D. G. (1980) *Biochem J* **187**(3), 727-732
154. Sled, V. D., Rudnitzky, N. I., Hatefi, Y., and Ohnishi, T. (1994) *Biochemistry* **33**(33), 10069-10075
155. Hagerhall, C. (1997) *Biochim Biophys Acta* **1320**(2), 107-141
156. Harris, C. M., Sanders, S. A., and Massey, V. (1999) *J Biol Chem* **274**(8), 4561-4569
157. Scheffler, I. E. (1999) *Mitochondria*, Wiley-Liss, New York

TRABAJO 0

Ferrer-Sueta, G., L. Ruiz-Ramirez and R. Radi (1997).
“Ternary copper complexes and manganese (III)
tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin catalyze
peroxynitrite-dependent nitration of aromatics.” *Chem
Res Toxicol* **10**(12): 1338-1344

Ternary Copper Complexes and Manganese(III) Tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin Catalyze Peroxynitrite-Dependent Nitration of Aromatics

Gerardo Ferrer-Sueta,^{§,1} Lena Ruiz-Ramírez,[‡] and Rafael Radi*[§]

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, and Unidad Asociada Enzimología and Departamento de Fisiología Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Av. Gral. Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay, and Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, UNAM, México 04510 D.F., México

Received July 8, 1997⁶

Peroxynitrite is a powerful oxidant formed in biological systems from the reaction of nitrogen monoxide and superoxide and is capable of nitrating phenols at neutral pH and ambient temperature. This peroxynitrite-mediated nitration is catalyzed by a number of Lewis acids, including CO₂ and transition-metal ion complexes. Here we studied the effect of ternary copper(II) complexes constituted by a 1,10-phenanthroline and an amino acid as ligands. All the complexes studied accelerate both the decomposition of peroxynitrite and its nitration of 4-hydroxyphenylacetic acid at pH > 7. The rate of these reactions depends on the copper complex concentration in a hyperbolic plus linear manner. The yield of nitrated products increases up to 2.6-fold with respect to proton-catalyzed nitration and has a dependency on the concentration of copper complexes which follows the same function as observed for the rate constants. The manganese porphyrin complex, Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin [Mn(tbap)], also promoted peroxynitrite-mediated nitration with an even higher yield (4-fold increase) than the ternary copper complexes. At pH = 7.5 ± 0.2 the catalytic behavior of the copper complexes can be linearly correlated with the pK_a of the phenanthroline present as a ligand, implying that a peroxynitrite anion is coordinated to the copper ion prior to the nitration reaction. These observations may prove valuable to understand the biological effects of these transition-metal complexes (i.e., copper and manganese) that can mimic superoxide dismutase activity and, in the case of the ternary copper complexes, show antineoplastic activity.

Introduction

Peroxynitrite¹ is a powerful oxidant that can be formed *in vivo* by the reaction of superoxide radical with nitrogen monoxide (1). Peroxynitrite has been shown to react with all classes of biomolecules, including lipids (2), proteins (3), DNA (4), and low-molecular-weight antioxidants (5, 6).

As an oxidant, peroxynitrite has a quite complex and interesting kinetic behavior. It can act as an oxidant in reactions that are first-order in peroxynitrite and first-order in substrate. Examples of this reactivity are reactions with thiols (8), cytochrome *c* (7), aconitase (3), ascorbate (5), and selenium compounds such as Ebselen (8, 9).

Peroxynitrite can also oxidize various substrates in reactions where the rate is independent of the substrate concentration. This type of reactivity includes the hydroxylation and nitration of aromatic compounds such as benzoate, phenol (10), salicylate (11), and the amino acids phenylalanine and tyrosine (12). Moreover, in many reactions peroxynitrite oxidizes substrates by both

first- and second-order reactions, yielding a complex kinetic scheme. Such reactions include the oxidation of methionine (13) and the nitration of tryptophan (14, 15).

The nitration of aromatic residues in proteins, particularly the occurrence of nitrotyrosine in biological systems, is considered a footprint of peroxynitrite formation *in vivo* (16, 17). Nitration by peroxynitrite has received much attention since it can cause alteration in protein structure and function (18) and could interfere with signaling pathways involving tyrosine phosphorylation (19).

Peroxynitrite-mediated nitrations occur in low yields if no catalyst is added; about 6% of peroxynitrite added is converted into nitrated products at pH = 7.5 with 4-hydroxyphenylacetate (4-HPA)² as target (20). The yield of nitration depends on many factors, such as concentration of the reagents, scavengers (11), and pH. The mechanism of nitration is not yet known, but many researchers agree that peroxynitrite (or an oxidant derived from it) could oxidize the phenol ring by one electron yielding nitrogen dioxide and phenoxyl radical, with these two radicals coupling to produce the nitro compound.

Peroxynitrite-mediated nitrations are catalyzed by a number of Lewis acids, including CO₂ (21), Fe(edta)⁻ (22), Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) (22), Mn(III)-(trnyp) (23), and copper(II) (11). Moreover, in the

* To whom correspondence should be addressed. Fax: (5982) 9249563. E-mail: radi@fmed.edu.uy.

[‡] Departamento de Bioquímica.

[§] Unidad Asociada Enzimología and Departamento de Fisiología Biológica.

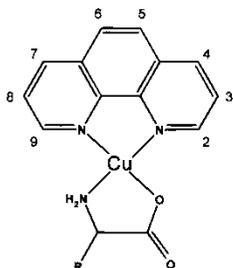
¹ Departamento de Química Inorgánica y Nuclear.

² Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, December 1, 1997.

³ The term peroxynitrite is used to refer to both peroxynitrite anion (ONOO⁻) and peroxynitrous acid (ONOOH). IUPAC-recommended names are oxoperoxynitrate(1-) and hydrogen oxoperoxynitrate, respectively.

⁴ Abbreviations: 4-HPA, 4-hydroxyphenylacetate; Mn(tbap), manganese(III) tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin; Mn(trnyp), manganese(III) tetrakis(4-N-methylpyridinium)porphyrin; Cu/Zn SOD, copper/zinc superoxide dismutase; dtpa, diethylenepentaaminotetraacetic acid.

Chart 1. General Structure of the Complexes Used



absence of catalysts, nitration proceeds through hydration of peroxynitrite anion and does not occur if hydrogen ion concentrations are low ($\text{pH} > 9$). Not all catalysts achieve the same yields: copper(II) catalysts can double or even triple yields, while iron(III) and manganese(III) catalysts seem to be more effective with yields of 40% or more, which is 6 times higher than in the uncatalyzed reaction.

In this study we have evaluated the reactivity of peroxynitrite with ternary copper complexes constituted by a phenanthroline and an amino acid as ligands (Chart 1), which have been recently shown to present antineoplastic activity (24). The ternary copper complexes we have used in this study are square-planar as determined by X-ray diffraction (25–27), and in aqueous solution the remaining two coordination sites at the copper atom are most probably occupied by water molecules. The presence of two different ligands in the complexes creates the possibility of many combinations and allows the modulation of the Lewis acidity of the metal center by changing the electron-withdrawing/donating characteristics of the ligands. In addition Cu(II) complexes with at least one coordination site occupied by water react very fast (at diffusion-controlled rates) in ligand substitution reactions. This is important because adduct formation between peroxynitrite and catalyst has been previously proposed to precede peroxynitrite activation (19–20). For comparative purposes we also studied nitration reactions of peroxynitrite in the presence of Mn(tbap), a compound with SOD-like activity (28) which may, however, redirect peroxynitrite reactivity by enhancing nitration yields.

Experimental Procedures

Reagents. Ternary copper complexes were synthesized as previously reported (29). Briefly, copper(II) nitrate and phenanthroline were dissolved in ethanol in a 1:1 ratio, this solution was mixed with a 20% excess of the amino acid dissolved in water, and the resulting solution was neutralized to $\text{pH} = 8$ with aqueous ammonia. Products were precipitated by partial evaporation of the solvent, recrystallized from hot water, and characterized by IR and UV-vis spectra.

We used the complexes listed in Table 1 and depicted in Chart 1, which are Cu(II) complexes containing a 1,10-phenanthroline and an amino acid as ligands; most of them are cationic complexes with nitrate as counterion.

Peroxyxynitrite was synthesized according to refs 6 and 30 from hydrogen peroxide and sodium nitrite in acidic solution.

All phenanthrolines were purchased from Aldrich; metallic copper was from Merck and nitric acid from J. T. Baker. All other reagents were from Sigma. Manganese(III) tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin [Mn(tbap)] was a kind gift from Dr. Bruce Freeman (University of Alabama at Birmingham, AL).

Table 1. Copper Complexes Used as Catalysts of Peroxynitrite-Mediated Nitration

complex	substituents on phenanthroline	amino acid
I	none	serine
II	5-methyl	serine
III	5-chloro	serine
IV	5-nitro	serine
V	5-phenyl	serine
VI	5,6-dimethyl	serine
VII	3,4,7,8-tetramethyl	serine
VIII	4,7-dimethyl	serine
IX	4,7-dimethyl	glycine
X	4,7-dimethyl	isoleucine
XI	4,7-dimethyl	tyrosine
XII	4,7-dimethyl	aspartate
XIII	4,7-dimethyl	methionine
XIV	4,7-dimethyl	proline
XV	4,7-dimethyl	arginine

Kinetic Studies. Stopped-flow spectroscopy (Applied Photophysics SF.17MV) was used to study reaction kinetics. Peroxynitrite decomposition was followed at 302 nm (8) or in the range of 320–340 nm in cases where complexes interfere with detection at 302 nm; nitration was followed at 430 nm (20). The kinetic runs were fitted to a first order equation by nonlinear regression. A typical run consisted of 400 points collected over more than 9 half-lives so that almost 99.9% of the reaction was completed. Final pH of the reaction was always measured at the outlet.

Yield Determinations. Nitration of 4-HPA in the presence of catalysts was carried out as described previously (30). In a typical experiment a solution containing 5 mM 4-HPA, phosphate buffer, and the complex to be tested (0–500 μM) was rapidly mixed with added peroxynitrite by vortexing. After 5 min, pH was measured and adjusted to 10–11 by adding 1 M NaOH, and A_{430} was then read. The concentration of 3-NO₂-4-HPA was calculated using $\epsilon_{430} = 4400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (20). Percent yield was always calculated with respect to initial peroxynitrite concentration.

pH Dependence Studies. For studies on the effect of pH on both nitration yields and reaction rates, the basic form of the buffer (K_2HPO_4) was always used as a starting point and the pH adjusted using hydrochloric acid. In this way, we minimized the catalytic effects of carbon dioxide (32, 33) which could be present if sodium hydroxide was used to adjust pH .

General Conditions. All experiments were performed in potassium phosphate buffer (50 mM) at 25 °C. These buffers were freed from most transition metal contamination by stirring with chelating resin overnight at alkaline pH before adjusting the pH . Unless otherwise indicated, 4-HPA concentration was 5 mM throughout and peroxynitrite was always in the range 0.5–0.8 mM.

Results

Peroxyxynitrite Decomposition in the Presence of Copper Complexes. Peroxynitrite decomposition is accelerated by (1,10-phenanthroline)(L-serinato)copper(II) nitrate (complex I; see Table 1) at $\text{pH} = 8.47$ following a single-exponential decay (Figure 1A). The dependence of the observed rate constant on complex I concentration is shown in Figure 1B. The data were fitted by nonlinear regression to the following equation using Microcalc Origin, version 3.73:

$$y = \frac{a_1[C]}{a_2 + [C]} + a_3[C] + a_4 \quad (1)$$

where y is the observed rate constant of peroxynitrite decay and $[C]$ is the concentration of complex I; a_1 – a_4 are the variable parameters of the fit. Equation 1 represents a rectangular hyperbola with a non-zero offset (a_4) plus a linear dependence ($a_3[C]$).

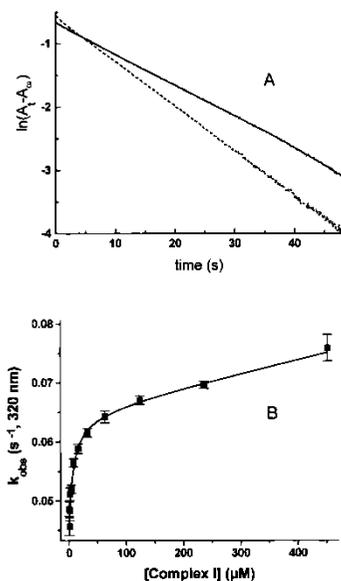


Figure 1. Effect of complex I on the rate of peroxyntirite decomposition in potassium phosphate buffer (50 mM, pH = 8.47). (A) Kinetic traces at 320 nm without complex I (solid line) and with 250 μM complex I (dashed line). (B) Observed rate constant of peroxyntirite decomposition at 320 nm versus complex I concentration can be fitted to eq 1. Best-fit values: $a_1 = 0.018 \text{ s}^{-1}$; $a_2 = 9 + 2 \mu\text{M}$; $a_3 = 23 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $a_4 = 0.047 \text{ s}^{-1}$.

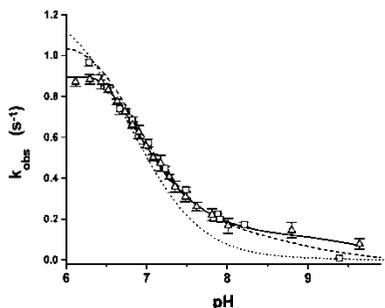


Figure 2. pH dependence of copper-catalyzed decomposition of peroxyntirite (continuous line, triangles) and peroxyntirite-mediated 4-HPA nitration (dashed line, squares). Conditions: [complex I] = 250 μM ; phosphate buffer = 50 mM; 25 °C. The dotted line corresponds to the hydrogen ion-catalyzed decomposition of peroxyntirite according to ref 34.

We studied the pH dependence of the peroxyntirite decomposition rate constant in the presence of 250 μM complex I (Figure 2) and found that the reaction is catalyzed at pH > 7. In Figure 2 the observed rate constant of this reaction is compared with that of the uncatalyzed reaction as reported elsewhere (34). A similar pH dependence of observed rate constants was obtained with complex IV (not shown).

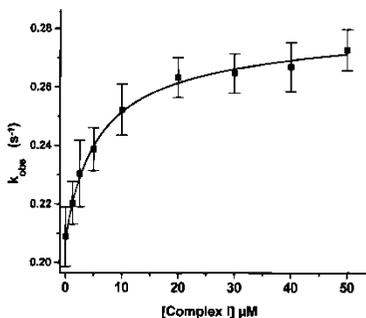


Figure 3. Effect of complex I on the rate of peroxyntirite-mediated 4-HPA nitration at pH = 7.57 and 25 °C. Best-fit values: $a_1 = 0.0661 \text{ s}^{-1}$; $a_2 = 5 \mp 1.4 \mu\text{M}$; $a_3 = 6.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $a_4 = 0.209 \text{ s}^{-1}$.

Table 2. a_1/a_3 Ratios Obtained in Kinetic and Yield Determinations

complex	a_1/a_3	
	kinetic	yield
I	0.32	0.81
II	0.53	1.09
III	0.63	1.60
IV	0.35	1.22
V	0.44	1.00
VI	0.27	0.34
VII	0.12	ND ^a
VIII	0.20	0.37
IX	0.27	0.72
X	0.25	0.34
XI	0.18	0.33
XII	0.47	ND
XIII	0.20	0.97
XIV	0.20	ND
XV	0.30	0.57

^a Not determined.

Rate of Nitration in the Presence of Copper Complexes. The rate of 4-HPA nitration by peroxyntirite, at pH = 7.5 ± 0.2 , is also enhanced by the ternary copper complexes in a fashion similar to that observed for peroxyntirite decomposition at pH = 8.47. In all complexes at pH = 7.5 ± 0.2 , the data can be fitted to eq 1 (Figure 3). The offset value (a_1) corresponds to the rate constant of the hydrogen ion-catalyzed peroxyntirite decomposition at the same pH, and the slope of the linear part (a_3) is usually small ($<10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). The height of the hyperbolic term in eq 1 (a_2) divided by the offset (a_4) was used as a measure of the increase in the observed rate constant produced by each complex. Values found for all complexes are presented in Table 2. The ratio a_2/a_4 was used instead of the more straightforward value of a_2 as a means to compensate for subtle differences in pH (<0.1 pH unit) among different experiments as both a_1 and a_4 are pH-dependent.

The pH dependence of the nitration rate constant is also complex. We studied it for complexes I (Figure 2) and IV (250 μM , not shown), and we found curves with a maximum k_{obs} of around 1.1 s^{-1} at pH ≈ 6 and an inflection point around pH = 6.9. The observed rate constant of nitration is slightly larger than the observed rate constant of peroxyntirite disappearance in most of the pH ranges studied.

Yield of Nitration in the Presence of Copper Complexes. Although the observed rate constant versus

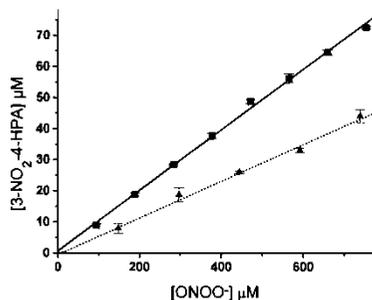


Figure 4. Catalytic effect of complex I on the yield of nitration of 4-HPA. Successive additions of peroxyntirite to a buffered solution containing 5 mM HPA with 25 μM complex I ($\text{pH} = 7.55 \pm 0.02$, squares) or without catalyst ($\text{pH} = 7.51 \pm 0.03$, triangles).

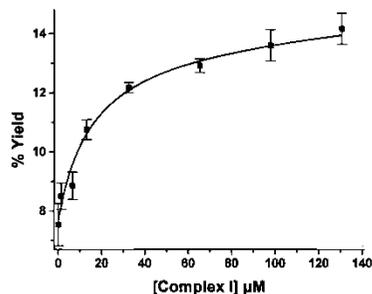


Figure 5. Effect of complex I on the nitration yield. Conditions: $[\text{ONOO}^-]_0 = 0.5 \text{ mM}$; $\text{pH} = 7.37$; 25°C . Best-fit values: $a_1 = 6.2\%$; $a_2 = 15 \mu\text{M}$; $a_3 = 0.005$; $a_4 = 7.7\%$.

[complex] plots only follow a linear behavior at high catalyst concentration, catalysis was demonstrated by experiments where repetitive amounts of peroxyntirite (100 μM /addition) were added to a solution containing 4-HPA, phosphate buffer, and 25 μM complex I. This experiment yields a straight line when a graph of $[\text{3-NO}_2\text{-4-HPA}]$ versus peroxyntirite is constructed (Figure 4). The slope of this graph indicates a 9.4% yield (against a 6% found here and in ref 20 for the uncatalyzed reaction) and shows no downward bend, indicating that complex I is not consumed in this process.

End point or yield determination of 3-nitro-4-HPA was also measured as a function of copper complex concentration. As in the case of the observed rate constants, the curves again show a hyperbolic plus linear behavior that can be fitted to eq 1 (Figure 5). Nevertheless the parameters are not the same as found for the reaction rate: especially a_2 , which measures the half-saturation of the hyperbolic part, is distinctly lower (3–10 times) for the yield versus [complex] curves. Again, the ratio a_1/a_4 was used as a measure of the increase in yield due to the catalyst; these values are presented in Table 2 for the complexes tested.

Yield of Nitration in the Presence of Mn(tbp). Mn(tbp) was chosen as a reference compound to evaluate the catalytic power of our complexes. This manganese porphyrin has been shown to increase the growth of the SOD-null J1132 strain of *Escherichia coli* (28) and

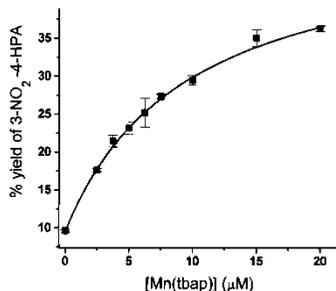


Figure 6. Effect of Mn(tbp) on nitration yield. Conditions: $[\text{ONOO}^-]_0 = 0.79 \text{ mM}$; $\text{pH} = 7.37$. Best-fit values: $a_1 = 40\%$; $a_2 = 9.6 + 0.5 \mu\text{M}$; $a_3 = 0$; $a_4 = 9.5 \pm 0.15\%$.

is referred to in the literature as a SOD-mimic and even as a peroxyntirite scavenger (35). Nevertheless a similar manganese porphyrin [manganese(III) tetrakis(4-*N*-methylpyridinium)porphyrin, Mn(tmppp)] has been shown to promote peroxyntirite-induced DNA strand breaks and 4-HPA nitration (20).

Mn(tbp) resulted in being much more efficient than the copper complexes in promoting peroxyntirite-mediated nitration (Figure 6). Unfortunately, this complex cannot be used for this assay in large concentrations because of its strong absorption at 430 nm. Nevertheless, Figure 6 shows that 20 μM Mn(tbp) increases the nitration yield up to more than 35%, a value that none of the ternary complexes evaluated herein were able to accomplish even at millimolar concentrations. Indeed, the trend of the yield versus $[\text{Mn(tbp)}]$, fitted to a hyperbolic function, leads to a a_1/a_4 ratio of 4, much higher than the 0.3–1.6 found for the copper complexes.

Structure-Reactivity Relationships. All ternary copper complexes tested showed similar influence in both the nitration rates and yields. We chose the parameter a_1/a_4 to compare the catalytic power of the complexes at $\text{pH} = 7.5 \pm 0.2$ because it can be understood as an enhancement factor for both reaction rates and yields. It also enables us to compare data obtained at slightly different pH's.

A plot of a_1/a_4 versus the $\text{p}K_a$ of the different phenanthrolines (36, 37) present as a ligand in the complex with the other ligand being always serine (complexes I–VIII) yields a straight line with a negative slope (Figure 7). On the other hand, no correlation was observed between the same parameter and any of the physicochemical properties ($\text{p}K_a$, $\text{p}I$, and dipole moment) of the amino acids tried (complexes VIII–XV, not shown).

Discussion

We have shown that all the ternary copper complexes of phenanthroline and amino acid studied herein moderately enhance both rate and yield of nitration at $\text{pH} = 7.5 \pm 0.2$. This behavior is similar in kinetic characteristics and yields to that of Cu/Zn SOD (20).

The mechanism of peroxyntirite-mediated oxidations is still a theme of debate in the scientific literature; no reaction scheme yet explains all its characteristics. One of the most convincing hypotheses of peroxyntirite oxidative chemistry invokes the existence of an "energized intermediate" (ONOOI^*) of which there is no present structural experimental data. This intermediate would

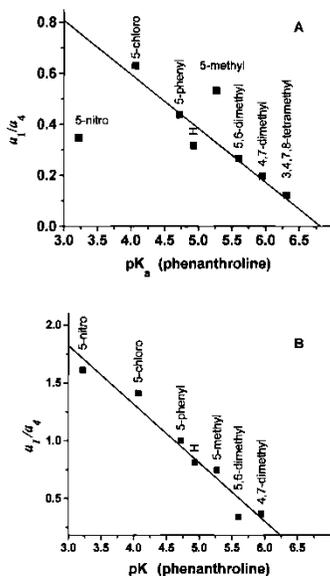
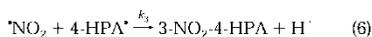
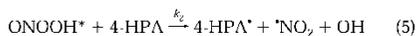
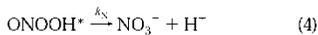
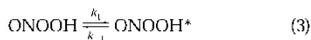
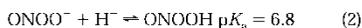


Figure 7. Linear dependence between a_1/a_4 ratios as defined for eq 1 and the pK_a of the ligand phenanthroline, for the rate constant (A) and yield (B) determinations. All values were obtained at $pH = 7.5 \pm 0.2$.

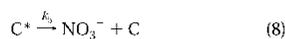
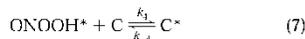
be formed from peroxyxynitrous acid in a rate-limiting step prior to isomerization (to yield nitrate) or one-electron oxidations of different substrates, for instance, 4-HPA, according to eqs 2–6:



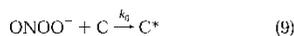
By this scheme, the rate of generation of 3-NO₂-4-HPA is independent of 4-HPA concentration, provided the reaction shown in eq 3 is rate-determining. Also, the yield of 3-NO₂-4-HPA depends on the steady-state concentrations of 4-HPA* and ¹NO₂ and the ratio of 4-HPA/4-HPA*, as there are alternate routes of reaction for these radicals other than eq 6: this was previously discussed in depth by Lyman et al. (33) and explains why the observed rate constant for peroxyxynitrite decomposition is smaller than that of nitration.

For explaining Cu/Zn SOD catalysis of peroxyxynitrite-mediated nitration, Beckman et al. (20) have proposed that only the trans rotamer of peroxyxynitrite anion fits into the active site of the enzyme, giving rise to kinetics similar to those observed in this work. Nevertheless, our complexes, due to their square-planar structures, present

readily accessible metal centers. Additionally, recent experiments by Bohle et al. (33) have shown that the conformational change between cis and trans rotamers of peroxyxynitrite is either very rapid (faster than NMR time scale) or inexistent in aqueous solution. Moreover, there is no need to invoke slow isomerization steps provided the catalyst (C) can react with ONOOH* to form a transient species, as will be shown in eq 10.



The mechanism represented in eqs 2–4, 7, and 8 yields an observed rate constant (k_{obs}) that depends hyperbolically on [C]. If C also reacts with ONOO⁻ (eq 9), k_{obs} also has a linear dependence on [C] at any given pH where ONOO⁻ is the predominating species. The reaction of a metal complex with the peroxyxynitrite anion has been also proposed before for Fe(edta)⁻ (20).



The reaction sequence of eqs 2–4 and 7–9 can be grouped as in Scheme 1, where it is easier to see that the observed rate constant consists in three components, two of which depend on copper complex concentration. Pathway 1 is the hydrogen ion-catalyzed peroxyxynitrite decay; pathway 2 accounts for the hyperbolic dependence of k_{obs} on copper complex concentration; pathway 3 accounts for the linear dependence.

Taking this reaction scheme into account, the overall observed rate constant of peroxyxynitrite decay has the following expression:

$$k_{obs} = \left(\frac{k_{-1}k_6[C] + k_{-1}k_1 \frac{[H^+]}{K_a} + k_2k_1 \frac{[H^+]}{K_a}}{k_Nk_3k_4[C] + k_Nk_4 + k_Nk_5 + k_1(k_4 + k_1k_3)} + \frac{k_4 \left(\frac{k_{-1}k_6[C] + k_{-1}k_1 \frac{[H^+]}{K_a} + k_2k_1 \frac{[H^+]}{K_a} \right) + k_6}{k_3k_4 \frac{K_a}{k_{-1} + k_3} + k_5} [C] \right) \times \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \quad (10)$$

This equation can be simplified in the limiting cases where [C] tends to zero or to infinity, namely:

If [C] = 0,

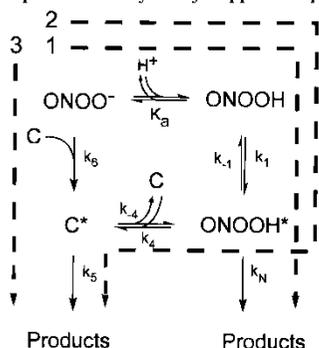
$$k_{obs} = \left(\frac{k_Nk_1}{k_N + k_1} \right) \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad (11)$$

that coincides with the expression first proposed by Keith and Powell (33) and represents the term a_1 in eq 1.

In the case where [C] → ∞,

$$k_{obs} = \left(\frac{k_Nk_{-1}k_6}{k_3k_4} + k_6[C] \right) \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \quad (12)$$

Scheme 1. Proposed Mechanism of Peroxynitrite Decomposition Catalyzed by Copper Complexes



which has a term independent of $[C]$ and equivalent to the parameter a_1 in eq 1

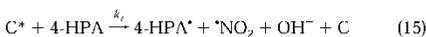
$$\frac{k_N k_4 k_6}{k_5 k_4} \left(\frac{K_a}{K_n + [H^+]} \right) = a_1 \quad (13)$$

and a term that is linear with $[C]$ equivalent to $a_3[C]$ in eq 1

$$k_6 \left(\frac{K_a}{K_n + [H^+]} \right) [C] = a_3 [C] \quad (14)$$

In this mechanism, copper catalysts act as ONOO^- activators much in the same way as H^+ but to a lesser extent (based on catalyst concentration); this fact is apparent from Figure 2 in the region of $\text{pH} > 7.5$, where the copper complexes are responsible for the increase in the rate of peroxynitrite decomposition and 4-HPA nitration. Peroxynitrite anion has been usually considered as a rather inert species with most of its oxidative chemistry dependent upon hydration; however, this is not the case when transition metals, carbon dioxide, or other Lewis acids are present in solution.

A plausible explanation of the catalysis by the ternary complexes tested involves the formation of a copper complex–peroxynitrite adduct with a reactivity similar to that of peroxynitrous acid. This adduct can rearrange to yield nitrate, which most probably dissociates from the copper, and can also perform a one-electron oxidation that promotes 4-HPA nitration. The reaction sequence leading to nitration would be



followed by eq 6.

This mechanism involves a rate-determining step leading to the formation of the energized intermediate (eq 3). This feature gives the observed rate constant versus [complex] plots their typical hyperbolic shape. Also in the mechanism, the linear part of the observed rate constant versus [complex] plots can be explained by eq 9 because the reaction between the catalyst and peroxynitrite anion provides an alternate route that avoids the rate-limiting step.

The relationship between a_1/a_3 (both in kinetics and yield determinations) and the acid–base properties of the

ligands further supports the hypothesis of adduct formation. The $\text{p}K_a$ of the phenanthrolines is an indirect measurement of the electron withdrawing/donating abilities of the substituents of the rings. These abilities can also modulate the Lewis acidity of the copper center. On the other hand, the fact that no simple correlation could be found using the $\text{p}K_a$ of the amino acid ligands can be understood in terms of the aliphatic character of their donating atoms. Aromaticity of the nitrogens on the phenanthrolines undoubtedly helps to more easily reflect the electronic influence of the substituents.

Compared to $\text{Mn}(\text{tbap})$, copper complex are poor catalysts, maybe because copper(II) lacks the possibility of forming high-valent metal–oxo compounds that are involved in the oxidative chemistry of manganese porphyrin complexes (40). The oxidized $\text{Mn}(\text{IV})$ or $\text{Mn}(\text{V})$ complexes could be responsible for the high yield of nitrated products (23).

Biological Relevance

Catalysis of peroxynitrite-dependent nitration of aromatic substrates is a potentially deleterious activity (41) and may contribute to the pathogenesis of degenerative processes such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Cu/Zn SOD and other metalloenzymes (i.e., myeloperoxidase and horseradish peroxidase) display this nitrating activity to a moderate extent (20, 31).

The ternary copper complexes studied here are capable of catalyzing superoxide dismutation,³ so we assayed the catalysis of peroxynitrite-dependent nitration of 4-HPA as a mean to ascertain a SOD-like property other than superoxide dismutation which might provide a molecular mechanism to account for the biological and pharmacological activities of these complexes *in vivo*. The catalytic behavior (in the nitration of 4-HPA) of our complexes is very similar, both in extent and in form, to that displayed by the copper/zinc enzyme and much weaker than those displayed by other SOD mimics such as $\text{Mn}(\text{tbap})$ and $\text{Mn}(\text{tmpyp})$. In this regard, we propose that future work using transition-metal ion complexes to protect against biological oxidative stress should consider the possibility of undesired side effects due to reactions with peroxynitrite which will lead to enhanced nitration.

For the ternary copper complexes, we have also found an easy way to predict this catalytic power by means of the acid–base properties of the phenanthroline ligand that constitutes the complex. These studies provide a model to account for copper-catalyzed nitration reactions and open the possibility of further *in vivo* testing of these compounds in the context of SOD-like activity versus enhanced biological nitration.

Acknowledgment. This work was supported by grants from CONICYT (Uruguay) and SARFC (Sweden) to R.R. G.F.S. was the recipient of a CSIC fellowship during part of this work. We would like to thank Dr. Bruce Freeman for providing the $\text{Mn}(\text{tbap})$ and Drs. Beatriz Alvarez, Ana Denicola, and Wim Koppenol for helpful discussion.

Supporting Information Available: Complete mathematical derivation of eq 10 (8 pages). Ordering information can be found on any current masthead page.

³ Ferrer Sueta, G.; Ruiz Ramirez, L.; Nausser, T.; Koppenol, W. H.; Radi, R. Unpublished results.

References

- (1) Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H., and Crow, J. (1994) Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* **233**, 229–240.
- (2) Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 481–487.
- (3) Castro, L., Rodriguez, M., and Radi, R. (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**, 29409–29415.
- (4) King, P. A., Anderson, V. E., Edwards, J. O., Gustafson, G., Plumb, R. C., and Suggs, J. W. (1992) A stable solid that generates hydroxyl radical upon dissolution in aqueous solutions: reaction with protein and nucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 5430–5432.
- (5) Isariotti, D., Ciurich, D. F., Bounds, P. L., and Koppenol, W. H. (1995) The kinetics of the oxidation of *t*-ascorbic acid by peroxynitrite. *Free Radical Biol. Med.* **18**, 85–92.
- (6) Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244–4250.
- (7) Thomson, J., Trujillo, M., Telleri, R., and Radi, R. (1995) Kinetics of cytochrome *c*⁺ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 491–497.
- (8) Matsumoto, H., and Sies, H. (1996) The reaction of Ebselen with peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 262–267.
- (9) Bevilacqua, K., Roussyn, I., Sharov, V. S., and Sies, H. (1996) Attenuation of oxidation and nitration reactions of peroxynitrite by selenothioamide, selenocysteine and ebselen. *Biochem. J.* **319**, 13–15.
- (10) Hallpenny, E., and Robinson, P. L. (1952) The nitration and hydroxylation of aromatic compounds by pernitrous acid. *J. Chem. Soc.* 939–946.
- (11) Ramezani, M. S., Padmaja, S., and Koppenol, W. H. (1996) Nitration and hydroxylation of phenolic compounds by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 232–239.
- (12) van der Vliet, A., O'Neill, C. A., Halliwell, B., Cross, C. E., and Kaur, H. (1994) Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. *FEBS Lett.* **394**, 89–92.
- (13) Pryor, W. A., Jin, X., and Squadrito, G. I. (1994) One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 11173–11177.
- (14) Alvarez, B., Rubio, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B. A., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite dependent tryptophan nitration. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 390–395.
- (15) Padmaja, S., Ramezani, M. S., Bounds, P. L., and Koppenol, W. H. (1996) Reaction of peroxynitrite with *L*-tryptophan. *Redox Rep.* **2**, 173–177.
- (16) Crow, J. P., and Ischiropoulos, H. (1996) Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: *in vivo* marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* **269**, 183–194.
- (17) van der Vliet, A., Eisertich, J. P., Kaur, H., Cross, C. E., and Halliwell, B. (1996) Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Methods Enzymol.* **269**, 175–184.
- (18) MacMillan-Crow, L. A., Crow, J. P., Kerby, J. D., Beckman, J. S., and Thompson, J. A. (1986) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 11853–11858.
- (19) Beckman, J. S. (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 836–844.
- (20) Beckman, J. S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Weerd, M., Smith, C., Chen, J., Harrison, J., Martin, J., and Tsai, M. (1992) Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 438–445.
- (21) Donicola, A., Freeman, B., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/dicarbonate: Kinetics and influence on peroxynitrite mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 49–58.
- (22) Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D., and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 431–437.
- (23) Cross, J. L., and Marla, S. S. (1995) Peroxynitrite-induced DNA strand scission mediated by a manganese porphyrin. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9578–9579.
- (24) Ruiz-Ramirez, L., Gomez Ruiz, C., Garcia Mota, L., and de la Garza, S. J. (1997) Antitumor activity *in vitro* of cisplatin I, II and III. New coordination compounds on cervix cancer. *J. Metal Based Drugs*, in press.
- (25) Solans, X., Ruiz-Ramirez, L., Martinez, A., Gasque, J., and Briand, J. L. (1988) Structures of chloro(glycinato)(1,10-phenanthroline)copper(II) monohydrate(II) and aqua(1,10-phenanthroline)(1-phenylalaninato)copper(II) nitrate monohydrate. *Acta Crystallogr.* **C44**, 628–631.
- (26) Solans, X., Ruiz-Ramirez, L., Martinez, A., Gasque, J., and Moreno-Esparza, R. (1993) Mixed chelate complexes. Structures of 1-alaninato(aqua)(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)copper(II) nitrate monohydrate and aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(nitrate)copper(II) monohydrate. *Acta Crystallogr.* **C49**, 890–893.
- (27) Moreno-Esparza, R., Molins, E., Briand-Peralva, J. L., Ruiz-Ramirez, L., and Redon, R. (1995) Aqua(1,10-phenanthroline)(6-serinato)copper(II) nitrate. *Acta Crystallogr.* **C51**, 1505–1508.
- (28) Faulkner, K. M., Lincoff, S. L., and Fridovich, I. (1994) Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase *in vitro* and substitute for it *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **269**, 23471–23476.
- (29) U.S. patent 5,107,005, April 21, 1992.
- (30) Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Cross, C. E. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 1620–1624.
- (31) Sampson, J., Rosen, H., and Beckman, J. S. (1996) Peroxynitrite-dependent tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase, nicotianoxylase and horseradish peroxidase. *Methods Enzymol.* **269**, 210–218.
- (32) Lymar, S. V., and Hurst, J. K. (1995) Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8867–8868.
- (33) Lymar, S. V., Jiang, Q., and Hurst, J. K. (1996) Mechanism of carbon dioxide catalyzed oxidation of tyrosine by peroxynitrite. *Biochemistry* **35**, 7855–7861.
- (34) Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 834–842.
- (35) Szabo, C., Day, B. J., and Salzman, A. (1996) Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase-mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett.* **381**, 82–86.
- (36) Kotly, S., and Sucha, I. (1995) *Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry*, Ellis Horwood Ltd., New York.
- (37) Martell, A. F., and Smith, R. M. (1977) *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York.
- (38) Bolle, R. S., Glassbrenner, P. A., and Hansert, B. (1996) *Methods Enzymol.* **269**, 302–311.
- (39) Keith, W. G., and Powell, R. F. (1969) Kinetics of decomposition of peroxynitric acid. *J. Chem. Soc. A* **90**.
- (40) Carnieri, N., Harriman, A., and Porter, G. (1982) Photochemistry of manganese porphyrins. Part 6. Oxidation-reduction equilibria of manganese(III) porphyrins in aqueous solution. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 931–938.
- (41) Beckman, J. S., Carson, M., Smith, C. D., and Koppenol, W. H. (1993) A1S, SOD and peroxynitrite. *Nature* **364**, 584.

TX970116H

Esta versión se editó por última vez el 20 de octubre de 2015