

## Resumen

La mitocondria es un el sitio principal de generación de superóxido y otras especies reactivas y es uno de los principales sitios de formación de 3-nitrotirosina proteica tanto en condiciones basales como patológicas. En este trabajo se estudiaron dos proteínas mitocondriales, el citocromo c y la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) y de cobre y cinc (CuZnSOD), estudiando tanto la nitración de estas proteínas como cambios estructurales en condiciones similares a las encontradas *in vivo*. En el caso del citocromo c se estudió la nitración de tirosinas proteicas evaluando la presencia de un lípido mitocondrial, la cardiolipina. En los experimentos realizados se observó por diversas técnicas que en presencia de este lípido la nitración de citocromo c expuesto a peroxinitrito se encuentra aumentada, siendo este aumento mediado por un cambio conformacional mediado por la cardiolipina. A nivel estructural, se observaron los cambios sufridos por citocromo c en presencia de cardiolipina por técnicas de NMR para y diamagnético. Estos experimentos, si bien no fueron concluyentes mostraron que la proteína sufre un cambio conformacional global. Estudios de la reactividad de cada tirosina de citocromo c utilizando mutantes mostró que, en presencia de cardiolipina, tirosinas que no son preferencialmente nitradas o modificadas en ausencia de este lípido están involucradas en procesos oxidativos tales como la actividad peroxidasa de citocromo c mediada por cardiolipina. Esta actividad peroxidasa se estudió también utilizando un derivado carboximetilado en metionina de citocromo c que, a diferencia del citocromo c sin modificar permite la detección de un Compuesto I de peroxidasa. El agregado de cardiolipina a citocromo c carboximetilado expuesto a peróxido de hidrógeno aumenta la formación de compuesto I de citocromo c, y por lo tanto su actividad peroxidasa. Para profundizar el estudio de los cambios estructurales sufridos por citocromo c frente a diferentes oxidantes se sintetizó y purificó citocromo c mononitrado a nivel de Tyr 97 y 74, para generar anticuerpos monoclonales contra formas conformacionalmente modificadas de esta proteína que permitan la detección de las mismas tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.

En el caso de las superóxido dismutasas (SOD) se estudiaron las modificaciones sufridas en presencia de flujos de óxido nítrico y superóxido evaluando la capacidad de esta enzima de competir con el óxido nítrico por su sustrato, observándose que en presencia de estos flujos se forma peroxinitrito en concentraciones capaces de inactivar a la enzima y en el caso de MnSOD capaz de nitrarla. Por otra parte se re-estudió la reacción de MnSOD con peroxinitrito determinando un nuevo valor para la constante de reacción de  $1,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  por tetrámero. A nivel estructural se estudió el efecto de la nitración en la accesibilidad del sustrato al sitio activo utilizando métodos *in silico* donde se determinó que la nitración de Tyr 34, responsable de la inactivación de MnSOD por peroxinitrito genera un aumento en la barrera de energía libre para el acceso del superóxido al sitio activo, lo cual impide el acceso al sustrato, tanto por repulsión estérica como electrostática. También a nivel estructural, se determinó el efecto de mutaciones puntuales de MnSOD en la estructura cuaternaria de la enzima, evaluando, a su vez, el efecto de estas mutaciones en la sensibilidad de sus tioles.