



**Tesina de Graduación**  
**Licenciatura en Bioquímica**  
**Facultad de Ciencias- Universidad de la República**



**DESARROLLO DE MÉTODO  
PARA DETECCIÓN DE  
PRODUCTOS ELECTROFÍLICOS  
DE LA  
OXIDACIÓN DE TIROSINA**

**Silvina Acosta Deccia**

**Orientador: Dr. Matías Möller**

**Laboratorio de Físicoquímica Biológica**

**Instituto de Química Biológica**

**Marzo de 2015, Montevideo, Uruguay**



## Agradecimientos

Gracias a mi tutor, el Dr. Matías Möller, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesina de grado bajo el marco de este proyecto, y que como director de esta tesis, me ha orientado, apoyado y corregido con interés y entrega. Gracias por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento.

Gracias a la Dra. Ana Denicola por el apoyo, la amabilidad y motivación que me ha brindado desde que ingresé como pasante en el laboratorio. Gracias al Dr. Williams Porcal por su colaboración en el proyecto.

Gracias a todas las personas del laboratorio por su atención, amabilidad y la buena disposición a la colaboración que han demostrado.

Gracias a las personas que han sido claves en este período, en lo personal, quiero agradecer a mi familia, principalmente a mis padres que siempre me han apoyado y alentado, a Fabián por su compañerismo y motivación y finalmente a mis amigas que siempre están.

## Tabla de contenido

Abreviaturas .....	6
Resumen .....	9
1- Introducción .....	10
1.1- Especies reactivas y radicales libres.....	10
1.1.1- ¿Qué es un radical libre? .....	10
1.1.2- ¿Cómo reaccionan los radicales libres? .....	11
1.1.3- Especies reactivas de nitrógeno (RNS) .....	12
1.1.4- Especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	14
1.2- Oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ).....	17
1.2.1- Generación de oxígeno singulete por exposición a luz y en presencia de sensibilizadores.....	17
1.2.2- Generación de oxígeno singulete en otros procesos sin luz como mediador .....	17
1.2.3- Reacciones de oxígeno singulete.....	17
1.3- Oxidación de proteínas por $^1\text{O}_2$ .....	18
1.3.1- Transferencia del daño a otros blancos biológicos.....	18
1.4- Aminoácidos susceptibles a oxidación por $^1\text{O}_2$ .....	20
1.4.1- Reacción con triptófano.....	20
1.4.2- Reacción con histidina.....	21
1.4.3- Reacción con metionina .....	22
1.4.4- Reacción con cistina y cisteína.....	22
1.5- Oxidación de tirosina .....	22
1.5.1- Reacción de tirosina con oxígeno singulete .....	23
1.5.2- Reacción entre radical tirosilo y superóxido .....	25
1.5.3- Reacción de tirosina con radical hidroxilo.....	27
1.5.4- Reacción entre radical tirosilo y peroxilo lipídico.....	27
1.5.5- Conjugación de glutatión a tirosina oxidada.....	28
Objetivo general.....	30
2- Materiales y métodos.....	31
2.1- Lactona 1 .....	31
2.1.1- Caracterización de N-Boc Tirosina oxidada .....	31
2.1.2- Reacción con dinitrofenilhidrazina (DNPH).....	32

2.1.3- Reacción con ácido tionitrobenzoico (TNB).....	32
2.2- Dipéptido glicil-HOCHDA.....	33
2.2.1- Preparación de G-HOCHDA .....	33
2.2.2- Reacción con dinitrofenilhidrazina (DNPH).....	35
2.2.3- Reacción con ácido tionitrobenzoico (TNB).....	35
2.3- Desarrollo de sonda fluorescente .....	36
2.4- Ribonucleasa A (RNasa A) .....	37
2.4.1- Oxidación de proteína.....	37
2.4.2- Reacción con F-GSH.....	37
3- Resultados y discusión.....	39
3.1- Lactona 1 .....	39
3.1.1- Caracterización de N-Boc Tirosina oxidada .....	39
3.1.2- Reacción con dinitrofenilhidrazina (DNPH).....	40
3.1.3- Reacción con ácido tionitrobenzoico (TNB).....	42
3.2- Dipéptido glicil-HOCHDA.....	44
3.2.1- Preparación de G-HOCHDA .....	44
3.2.2- Reacción con DNPH .....	45
3.2.3- Reacción con TNB .....	48
3.3- Desarrollo de sonda fluorescente .....	49
3.3.1- Reacción entre F-GSH y G-HOCHDA.....	51
3.4- Ribonucleasa A .....	53
3.4.1- Reacción entre F-GSH y RNasa.....	53
4- Conclusiones.....	59
Bibliografía .....	60

## Abreviaturas

Abreviatura	Nombre completo
•Tyr	Radical tirosilo
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Arg	Arginina
$\text{CO}_3^{\bullet-}$	Radical carbonato
Cys	Cisteína
$\text{D}_2\text{O}$	Agua deuterada
DMF	Dimetil formamida
DMS	Dimetil sulfuro
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DTNB	Ditionitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
FA	Ácido fórmico
F-GSH	Fluoresceína-glutati6n
FMK	N-formilquinurenina
G-HOCHDA	Dipéptido glicil-HOCHDA
GSH	Glutati6n
GSSG	Glutati6n disulfuro
GY	Dipéptido glicil-tirosina
$\text{H}_2\text{O}$	Agua
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico

His	Histidina
HNO <sub>2</sub>	Ácido nitroso
HOCl	Ácido hipocloroso
HOCHDA	3-(1-hidroxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)-L-alanina
HOHICA	2,3,3a,6,7,7a-hexahidro-1H-indol-2-carboxílico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAM	Iodoacetamida
Kn	Quinurenina
Lys	Lisina
MB	Azul de metileno
MetOH	Metanol
Met	Metionina
MetO	Sulfóxido de metionina
MWM	Marcador de peso molecular
N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido de nitrógeno
NaBH <sub>4</sub>	Borohidruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NHS-F	N-hidroxisuccinimida-Fluoresceína
NO <sup>-</sup>	Anión nitroxilo
*NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
*NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>2</sub> <sup>*-</sup>	Radical superóxido

O <sub>3</sub>	Ozono
<sup>•</sup> OH	Radical hidroxilo
ONOO <sup>-</sup> /ONOOH	Peroxinitrito
PIDA	Fenil iododiacetato
ROS/RNS	Especies reactivas de oxígeno/nitrógeno
TFA	Ácido trifluoroacético
TNB	Ácido tionitrobenzoico
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
WL	Longitud de onda
β-ME	β-mercaptoetanol



## Resumen

Radicales libres y especies reactivas son producidos en el organismo tanto como productos secundarios del metabolismo aerobio como por enzimas especializadas, y algunos cumplen roles fisiológicos. En varias enfermedades la producción de especies reactivas deja de estar controlada y contribuyen al desarrollo y empeoramiento de la patología. Las proteínas son el grupo de biomoléculas más susceptibles a estas especies oxidantes, y la tirosina es uno de los aminoácidos que más se ha usado como "testigo" del daño oxidativo, ya que da diferentes productos estables con diferentes especies oxidantes, tales como *orto*-hidroxi-tirosina con radical hidroxilo, u *orto*-nitro-tirosina con peroxinitrito. En contraste, tanto la oxidación radicalar de tirosina con posterior adición de radical superóxido o radical peroxilo lipídico, como la reacción de tirosina con oxígeno singulete, llevan a la formación de derivados de la tirosina modificados en la posición *para*, que luego de un paso de reducción forman 3-(1-hidroxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)-L-alanina (HOCHDA). Dado la frecuencia de estas especies reactivas en medios biológicos, es de esperar que se formen cantidades significativas de HOCHDA en el organismo, especialmente en condiciones que aumenten el estrés oxidativo, como patologías vasculares y diabetes.

En este estudio se planteó desarrollar un sistema robusto y sensible que nos permita detectar la formación de HOCHDA en medios biológicos. Para ello se planteó utilizar en principio HOCHDA en péptidos pequeños. Como modelo se utilizaron la N-Boc-tirosina oxidada a la lactona correspondiente y al dipéptido glicil-tirosina oxidado a glicil-HOCHDA. Se ensayaron varios reactivos para derivatizar HOCHDA: dinitrofenilhidrazina (DNPH) para reaccionar con el carbonilo, y tionitrobenzoico (TNB) como reactivo de Michael. La lactona resultó ser un mal modelo de HOCHDA ya que se observaron reacciones adicionales debido al grupo lactona propiamente más que al grupo ciclohexadienona. Con glicil-HOCHDA se observó la formación de un único producto con DNPH correspondiente a la hidrazona. Con TNB se formó principalmente el monoadducto, y un poco de un diadducto. También se preparó una sonda fluorescente nucleofílica, glutatión-fluoresceína (F-GSH). Este reactivo reaccionó con éxito con glicil-HOCHDA, dando lugar principalmente a un monoadducto.

Como el objetivo último era utilizar el método de detección con proteínas, se probó F-GSH con la proteína ribonucleasa A oxidada con oxígeno singulete. Se observó la asociación de la sonda a la proteína oxidada por gel filtración y por electroforesis en gel. También se comprobó la unión preferencial de F-GSH a la proteína oxidada respecto a la nativa revelando el gel por fluorescencia. Si bien aún se necesita pulir este ensayo, es muy prometedor para la detección de proteínas con residuos oxidados electrofílicos en muestras biológicas más complejas, como lisados celulares o muestras de tejido.

## 1- Introducción

En el organismo se producen especies oxidantes continuamente como productos secundarios de la respiración aerobia y como mediadores o efectores de respuestas celulares. El daño a biomoléculas se evita por la presencia de antioxidantes. Cuando los oxidantes desbordan la capacidad antioxidante y provocan daño a biomoléculas se habla de “estrés oxidativo”<sup>1</sup>.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) son capaces de provocar daño a una amplia variedad de blancos moleculares *in vivo*, entre estos se incluyen lípidos, proteínas y ADN. Según cuál, dónde y cómo se generan estas especies además del blanco molecular al que atacan será el antioxidante que participará. Entonces, se define como antioxidante a toda sustancia que estando presente en una concentración menor a la de un sustrato oxidable puede retrasar o prevenir la oxidación del mismo <sup>1</sup>. En condiciones de estrés oxidativo los oxidantes aumentan o los antioxidantes disminuyen de forma progresiva y continua, siendo éste un proceso reversible<sup>2</sup>.

Hay varias enfermedades asociadas al estrés oxidativo que resultan de la disminución de antioxidantes por mutaciones que afectan la defensa enzimática, enfermedades que eliminen estas defensas o falta de consumo de antioxidantes en la dieta. También pueden generarse por un incremento en la producción de ROS/RNS causado por una alta exposición a O<sub>2</sub>, presencia de toxinas que actúen como especies reactivas o se metabolicen para dar las mismas, o excesiva activación de los sistemas que normalmente los producen<sup>1</sup>.

Generalmente el estrés oxidativo suele ser una consecuencia y no una causa del proceso primario de la enfermedad. Sin embargo juega un papel importante en la promoción de la lesión tisular en muchas enfermedades. Algunas de las afecciones que se asocian a este desbalance son: aterosclerosis, diabetes, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoidea, cáncer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas<sup>1</sup>.

### 1.1- Especies reactivas y radicales libres

#### 1.1.1- ¿Qué es un radical libre?

Un radical libre es cualquier especie capaz de existir independiente y que posee uno o más electrones desapareados. La presencia de estos electrones desapareados provoca que el radical libre sea en muchos casos altamente reactivo<sup>1</sup>.

Los radicales libres y especies reactivas están implicados en numerosos roles en los seres vivos, en fisiología y patología, por ejemplo, actúan a nivel del sistema vascular en la vasorrelajación, en la generación de memoria del sistema nervioso y en la respuesta inmune combatiendo patógenos.

Los radicales pueden ser generados a partir de la pérdida o ganancia de un electrón por parte de una especie no radicalar y mediante el proceso de fisión homolítica, donde un enlace covalente se rompe y uno de los electrones del par compartido se queda en cada átomo<sup>1</sup>. Si bien la formación de estas especies está muy regulada, hay varias situaciones en las cuales la producción de las mismas comienza actuar en contra del propio organismo y es cuando hablamos de estrés oxidativo.

Los metales de transición (Fe, Cu, Mn) por su capacidad de aceptar y donar electrones son actores importantes en el estrés oxidativo<sup>1</sup>. Por un lado, forman parte de enzimas antioxidantes como las superóxido dismutasas y catalasas, pero su liberación de otras proteínas puede promover el daño oxidativo. La movilización de éstos puede ocurrir por mecanismos que incluyen oxidación mediada por superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), desde clusters Fe-S de proteínas (ej.: deshidratasas), desde proteínas de almacenamiento o transporte (ej.: transferrina, ferritina, y ceruloplasmina), desde proteínas hemo (ej.: mioglobina y citocromo c) y oxidación de histidina con rotura de sitios de coordinación de metales. Estos metales liberados son un potencial peligro si su disponibilidad no es controlada ya que pueden catalizar reacciones de radicales libres no deseadas<sup>1,3</sup>.

### **1.1.2- ¿Cómo reaccionan los radicales libres?**

La reactividad depende tanto del radical analizado así como del otro compuesto que participará en la reacción, si dos radicales se enfrentan, los mismos pueden unir sus electrones desapareados y formar un enlace covalente generando una especie no radicalar. Sin embargo cuando un radical se enfrenta a una especie no radicalar, un nuevo radical resulta y pueden establecerse reacciones en cadena, donde el radical puede<sup>1</sup>,

- Unirse a la otra molécula y el aducto continúa teniendo el electrón desapareado.
- Actuar como agente reductor y donar un electrón a la otra molécula, la cual pasa a tener un electrón desapareado.
- Actuar como agente oxidante aceptando un electrón de la otra molécula, la cual pasa a tener un electrón desapareado.

- Quitar un átomo de hidrógeno desde un enlace C-H, dejando al compuesto como una especie radicalar con un electrón desapareado en el C.

La reactividad de algunas especies reactivas puede compartimentarse de acuerdo a su capacidad de atravesar biomembranas. Electrolitos sin carga pueden difundir a través de la membrana mientras que aquellas moléculas cargadas requieren un canal proteico o la formación de su ácido conjugado. Además, cuanto más pequeña y menos polar sea la molécula mayor será su permeabilidad. Por lo que el orden de permeabilidad es el siguiente:  $\cdot\text{NO}$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{NO}_2 \gg \text{H}_2\text{O}_2, \text{ONOOH}, \text{H}_2\text{O} \gg \text{O}_2^{\cdot-}, \text{ONOO}^-, \text{CO}_3^{\cdot-}$ <sup>4, 5</sup>.

### 1.1.3- Especies reactivas de nitrógeno (RNS)

#### *Óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ )*

El óxido nítrico o monóxido de nitrógeno presenta un electrón desapareado siendo una molécula paramagnética y un radical libre. Es producido a partir del metabolismo de L-Arginina en el que participa las enzimas óxido nítrico sintasa<sup>6</sup>.  $\cdot\text{NO}$  es una especie muy selectiva y solo reacciona con otros radicales o centros metálicos de proteínas, como superóxido o guanilato ciclasa<sup>7</sup>.

Este compuesto ha sido vinculado a múltiples procesos fisiológicos, algunos de estos pueden ser: neurotransmisión, respuesta a aminoácidos excitatorios, control de la presión sanguínea y eliminación de patógenos<sup>1, 6</sup>. Por su capacidad de reaccionar con radicales peroxilo orgánicos e inhibir las reacciones en cadena de peroxidación lipídica, se ha propuesto como un importante antioxidante *in vivo*<sup>8</sup>. Sin embargo su producción en exceso puede provocar daños celulares de manera directa por inhibición de la ribonucleótido reductasa o citocromo oxidasa, o de forma indirecta por su conversión a otras especies reactivas capaces de modificar proteínas y ADN alterando sus funciones<sup>1, 7</sup>.

En ausencia de otro reactivo, se da la reacción de autooxidación de  $\cdot\text{NO}$  con  $\text{O}_2$  que conduce finalmente a la formación de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). En este proceso se forman intermediarios reactivos como dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ) y trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ )<sup>4</sup>. Todos tienen efectos biológicos importantes,  $\text{NO}_2^-$  está involucrado en la eliminación de patógenos y vasorelajación;  $\cdot\text{NO}_2$  puede reaccionar con tioles, ascorbato y urato y no tan rápidamente con tirosina o ácidos grasos insaturados conduciendo a la nitración. Por su parte  $\text{N}_2\text{O}_3$  es considerado un importante mediador de la desaminación de bases del ADN que puede conducir a mutaciones y desarrollo

de cáncer, además de conducir a la nitrosación de aminas y tioles, siendo ésta una importante modificación postraducciona l de proteínas <sup>7</sup>.

El proceso de autooxidación se ve acelerado por muchos lípidos de membrana incluyendo membranas de fosfolípidos, de hepatocitos y la mitocondria, además de acelerarse en lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en micelas de detergentes. La consecuencia de la aceleración es el rápido consumo de  $\cdot\text{NO}$ , la catálisis de nitrosación, el control de la respiración mitocondrial y la regulación de la presión sanguínea <sup>7</sup>.

Por otro lado, el óxido nítrico puede reaccionar con superóxido para dar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) a velocidades controladas por difusión<sup>1,4</sup>.

#### *Dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ )*

Es un radical libre que se ha reconocido como un importante contaminante del medioambiente. A nivel celular puede generarse por varios mecanismos como descomposición promovida por ácido de Lewis del peroxinitrito derivado de  $\cdot\text{NO}$ , autooxidación de  $\cdot\text{NO}$  u oxidación de  $\text{NO}_2^-$  catalizado por peroxidasa, principalmente mieloperoxidasa<sup>5</sup>.

Reacciona con antioxidantes de bajo peso molecular, proteínas y lípidos insaturados, reacciona con otros radicales, por ejemplo con radical tirosilo para dar 3-nitrotirosina. Esta nitración resulta en un cambio en la función proteica, inactivación o activación, o también puede acelerar la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína. Al reaccionar con lípidos insaturados puede conducir a su oxidación y a la formación de nitro-lípidos. Las reacciones que involucran transferencia de electrón son rápidas, sin embargo aquellas que implican la extracción de un hidrógeno y adición a dobles enlaces son reacciones más lentas<sup>5</sup>.

#### *Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )*

Puede ser formado de múltiples maneras, por ejemplo, a partir de la reacción entre  $\cdot\text{NO}$  con  $\text{O}_2^-$  ( $k = 4\text{-}16 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>9</sup>, reacción entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{HNO}_2$ , irradiación de  $\text{NO}_3^-$ , entre otros <sup>1</sup>. Además de ser una especie reactiva *per se* puede generar  $\cdot\text{NO}_2$  y radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ )<sup>5</sup>.

Su forma aniónica,  $\text{ONOO}^-$ , reacciona con dióxido de carbono para formar un aducto muy reactivo, nitrosoperoxicarbonato ( $\text{ONOOCO}_2^-$ )<sup>6</sup> que decae a  $\cdot\text{NO}_2$  y radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ), éste es un oxidante más selectivo que radical hidroxilo <sup>4</sup>. Ambos productos son de corta vida media y fuertes radicales oxidantes, tienen como blanco principal a tioatos y residuos aromáticos de proteínas, además de participar en la modificación de bases del ADN <sup>9</sup>.

Su forma protonada, ONOOH, constituye una importante especie oxidante citotóxica, que reacciona con tioles, antioxidantes, lípidos, además de provocar la rotura de las hebras de ADN, nitración y desaminación de las bases nitrogenadas del ADN y nitración de aminoácidos aromáticos presentes en proteínas (ej.: formación de 3-nitrotirosina por nitración de tirosina). Este proceso de nitración de la tirosina representa una modificación postraduccional que se ha asociado con pérdida y ganancia de actividad, provocando respuestas inmunogénicas, interferencia de vías dependientes de tirosin-quinasa, alteración del ensamblaje y polimerización, facilitando degradación proteica y participando de agregados proteicos resistentes al proteasoma. De esta forma, la incorporación de un grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) a las proteínas puede llevar a cambios importantes a nivel estructural y funcional. 3-nitrotirosina se ha establecido como un biomarcador de “estrés nitrooxidativo” en células y tejidos y se correlaciona con varias patologías como enfermedades cardiovasculares <sup>10</sup>.

Peroxinitrito es un importante oxidante y se encuentra vinculado como mediador patogénico en varias enfermedades como cardiovascular, neurodegenerativa y procesos inflamatorios. También se ha demostrado que es un efector citotóxico de las células del sistema inmune hacia bacterias y parásitos <sup>9</sup>.

#### 1.1.4- Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Cuando se habla de ROS, se habla tanto de los radicales derivados de oxígeno así como de los derivados de oxígeno no radicales (Tabla 1) <sup>1</sup>.

**Tabla 1.** Especies reactivas de oxígeno

Radicales	No-radicales
Superóxido, O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Peróxido de hidrógeno, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Hidroxilo, •OH	Acido hipocloroso, HOCl
Peroxilo, RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Ozono, O <sub>3</sub>
Alcoxilo, RO <sup>•</sup>	Oxígeno singulete, <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Hidroperoxilo, HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	

### *Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

Es un débil agente reductor y oxidante y generalmente resulta ser poco reactivo, es capaz de inactivar pocas enzimas directamente, generalmente lo hace mediante oxidación de tioles del sitio activo de ciertas enzimas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. También puede oxidar ceto-ácidos como piruvato y 2-oxoglutarato<sup>1</sup>.

Muchas enzimas pueden generarlo *in vivo*, incluyendo xantina, urato y D-aminoácido oxidasas. Además mediante la dismutación de superóxido, cualquier sistema biológico que genere el mismo, generará también H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este derivado de oxígeno puede atravesar membranas y una vez dentro de las células puede reaccionar con iones de hierro y cobre para formar más especies reactivas como radical hidroxilo (\*OH)<sup>1</sup>.

### *Radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)*

A nivel celular, el superóxido puede ser producido por varias vías, siendo éste el producto de la adición de un único electrón al estado basal del oxígeno molecular, contiene así, únicamente un electrón desapareado<sup>1</sup>.

Es uno de los radicales más abundantes producidos en sistemas biológicos. Se genera en cada tejido y órgano por la familia de NADPH oxidasa, como producto de la respiración mitocondrial y puede además ser generado a partir de reacciones de auto-oxidación de ciertas biomoléculas (ej.: gliceraldehído, FMNH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>, adrenalina, entre otras)<sup>1, 11</sup>.

A nivel extracelular, una fuente de este radical es la enzima xantina oxidasa, la cual se encuentra en la sangre como xantina deshidrogenasa pero que puede convertirse en oxidasa por oxidación de un tiol o por fragmentación proteolítica. Dicha enzima se encarga de la oxidación de xantina/hipoxantina y transfiere electrones desde estos a NAD<sup>+</sup> u O<sub>2</sub>. De esta forma además producir superóxido produce también H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contribuyendo así al daño tisular en diferentes patologías<sup>1</sup>.

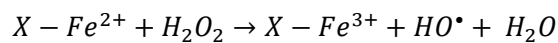
En comparación a \*OH, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es mucho menos reactivo con compuestos no radicalares pero cuando reacciona con otros radicales lo hace rápidamente. Su reacción con \*NO controlada por difusión genera peroxinitrito y junto a la reacción con ciertos clusters Fe-S proteicos contribuye a la toxicidad del superóxido<sup>1, 11</sup>. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reacciona también con radicales tirosilo y esta reacción se tratará en detalle más adelante. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> cumple funciones de regulación de la división celular, control de la vasorrelajación y en la respuesta inmune como agente tóxico. Pero también puede

tener efectos adversos en los sistemas biológicos, por lo que la enzima superóxido dismutasa reduce los efectos tóxicos del  $O_2^{\bullet-}$  generado endógenamente, siendo esencial para los organismos aeróbicos<sup>11</sup>.

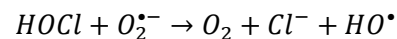
### Radical hidroxilo ( $\bullet OH$ )

Este radical puede reaccionar con casi todas las moléculas biológicas a velocidades controladas por difusión<sup>12</sup>. El radical hidroxilo puede generarse en sistemas biológicos de múltiples maneras, como se detallan a continuación<sup>1, 12</sup>.

- Reacción de Fenton, implica la fisión homolítica inducida por radiación UV o por hierro ferroso del enlace O-O de peróxido de hidrógeno para dar  $\bullet OH$ <sup>1, 3</sup>.

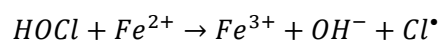
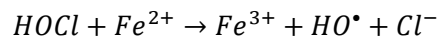


- Radiación ionizante, la exposición de agua a radiaciones de alta energía como rayos gama, siendo ésta la base de la radioterapia<sup>1</sup>.
- A partir de la reacción entre ácido hipocloroso (generado por la mieloperoxidasa a partir de cloruro y  $H_2O_2$ ) con superóxido, análoga a la reacción de Haber-Weiss<sup>1, 13</sup>.



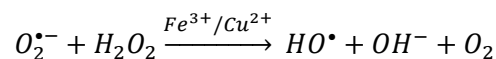
Esta reacción presenta una constante de velocidad  $k = 7.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ .

Además, la transferencia de un electrón en la reacción entre  $Fe^{2+}$  y HOCl se espera que genere radical hidroxilo o cloro, aunque el primero prevalece.

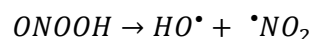
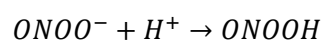
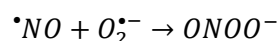


La reacción entre  $Fe^{2+}$  y HOCl es de mayor velocidad que la que presenta con  $H_2O_2$  (reacción de Fenton)<sup>13</sup>.

- Se ha propuesto que la toxicidad de  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  podría involucrar la conversión a  $\bullet OH$ . Para explicar esta conversión se han propuesto dos mecanismos,
  - Reacción Haber-Weiss catalizada por ion metálico



- Interacción entre superóxido y óxido nítrico ( $\bullet NO$ ), el cual es producido por varios tipos celulares. En esta reacción se forma como intermediario peroxinitrito que es un oxidante fuerte y puede además evolucionar a  $\bullet OH$ <sup>3, 12</sup>.





## 1.2- Oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ )

El estado  $^1\Delta_g$  del oxígeno molecular es el estado excitado más importante en reacciones fotosensibilizadas. Éste presenta ambos electrones en el mismo orbital molecular con spin apareado. Se forma rápidamente y de forma eficiente siendo su energía de 93.6 kJ sobre el estado basal  $^1$ , y tiene una larga vida media ( $10^{-6}$ – $10^{-5}$  s) en ausencia de moléculas con las que pueda reaccionar rápidamente. Otros estados excitados pueden formarse pero los mismos son de mayor energía, con menor vida media y generalmente su decaimiento es bastante rápido<sup>14</sup>.

### 1.2.1- Generación de oxígeno singulete por exposición a luz y en presencia de sensibilizadores

La formación de oxígeno singulete por absorción de luz solar de aminoácidos es un proceso limitado en ausencia de la unión a un cromóforo. Los principales aminoácidos cromofóricos son triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, cisteína y cistina, el resto no absorben de manera significativa a  $\lambda > 230$  nm y el enlace peptídico absorbe débilmente a 210-220 nm; de esta forma la fotoquímica directa que presentan las proteínas se debe a las cadenas laterales pero ninguna es muy eficiente para la generación de  $^1\text{O}_2$ <sup>14</sup>.

El oxígeno singulete se forma rápidamente bajo exposición a luz UV o visible y en presencia de un amplio rango de sensibilizadores ya sean endógenos o exógenos, incluyendo compuestos de coordinación como porfirinas y compuestos orgánicos como rosa de bengala (RB) o azul de metileno (MB), los mismos logran generar estados excitados que transfieren energía de manera rápida y eficiente al oxígeno molecular para dar oxígeno singulete<sup>1, 14, 15</sup>.

### 1.2.2- Generación de oxígeno singulete en otros procesos sin luz como mediador

Otra manera de generar oxígeno singulete es mediante reacciones en las que participan peroxidasas como, mieloperoxidasa, lactoperoxidasa y cloroperoxidasa, además mediante reacciones mediadas por lipoxigenasa. También puede formarse durante las reacciones de ozono ( $\text{O}_3$ ) con compuestos orgánicos e inorgánicos,  $\text{H}_2\text{O}_2$  con HOCl, molibdato de sodio y peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ ); como resultado de la descomposición de endoperoxidos y en las reacciones de dimerización de radicales peroxilo en peroxidación lipídica<sup>14-16</sup>.

### 1.2.3- Reacciones de oxígeno singulete

El  $^1\text{O}_2$  puede reaccionar con otras moléculas de dos maneras, mediante reacción química o puede transferirle su energía de excitación volviendo al estado basal en un proceso conocido

como quenching. Las reacciones más estudiadas son aquellas que involucran compuestos con doble enlace C-C, como pueden ser carotenoides, clorofila y ácidos grasos. Los compuestos que contienen dobles enlaces conjugados reaccionan con  $^1\text{O}_2$  para dar endoperoxidos <sup>1</sup>.

### 1.3- Oxidación de proteínas por $^1\text{O}_2$

Las proteínas resultan ser uno de los blancos principales para la oxidación dentro de las células debido a su abundancia y su rápida velocidad para reaccionar con especies excitadas y radicales entre los que se incluye el oxígeno singulete<sup>15</sup>.

Se ha demostrado la formación de peróxidos reactivos durante la exposición de un amplio rango de proteínas a  $^1\text{O}_2$ . Las proteínas analizadas presentan diferente composición aminoacídica pero se ha determinado que los peróxidos se generan en Trp, Tyr, o His en las proteínas. Como ejemplo se puede mencionar la formación de peróxidos en melitina, la cual contiene como residuo reactivo mayoritario Trp y en inhibidor de tripsina que contiene únicamente Tyr como residuo reactivo. Estudios han demostrado también la formación de peróxidos en proteínas dentro de células viables bajo exposición a luz visible en presencia de sensibilizadores<sup>17</sup>.

La identificación de estos peróxidos reactivos ha permitido determinar que los mismos son intermediarios inestables y pueden propagar el daño oxidativo mediante reacciones de tipo radicalar o no radicalar. Estos procesos pueden resultar en la transmisión del daño hacia otros blancos, o participar en reacciones oscuras<sup>14</sup>. Los hidroperóxidos formados en proteínas tienen la capacidad de inducir daño secundario al inactivar enzimas dependientes de tioles esenciales a nivel celular e inducir daño al ADN. Recientemente se han introducido unos reactivos derivados de boronatos que se vuelven fluorescentes al reaccionar con hidroperóxidos proteicos que van a permitir profundizar en la caracterización de los mismos<sup>18</sup>.

#### 1.3.1- Transferencia del daño a otros blancos biológicos

La reacción entre oxígeno singulete y proteínas puede tener múltiples efectos, incluyendo oxidación de cadenas laterales, fragmentación del esqueleto proteico, dimerización/agregación, cambios conformacionales e inactivación enzimática. Se cree que estos daños juegan un rol principal en el desarrollo de cataratas, quemaduras solares y algunos tipos de cáncer de piel<sup>15</sup>.

Otras consecuencias de la oxidación proteica son los cambios biofísicos y bioquímicos, como aumento de la susceptibilidad a proteólisis, alteraciones en propiedades mecánicas,

despliegamiento, cambios conformacionales, aumento de hidrofobicidad, alteración en la capacidad de dispersión de luz y rotación óptica, cambios en la unión de cofactores y metales iónicos<sup>14</sup>.

#### *Reacción con antioxidantes*

Los peróxidos generados pueden reaccionar rápidamente con tioles de bajo peso molecular entre los que se incluye el glutatión (GSH). La eficiencia con la que reaccionan otros compuestos es variable, por ejemplo, el compuesto organoseleno ebselen es muy eficiente ( $k = 1.1-1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>18</sup>, mientras que el ácido ascórbico y sus derivados son moderadamente eficientes, y metionina y el ácido 3,3'-tiodipropionico reaccionan más lentamente<sup>17</sup>. Además, la exposición de macrófagos murinos a hidroperóxidos ya formados en péptidos y proteínas, resultó en el consumo del hidroperóxido y la oxidación de tioles celulares y GSH en mayor velocidad<sup>19</sup>.

La descomposición de peróxidos puede llevar a una mayor formación de radicales que pueden participar en las reacciones en cadena. Diferentes antioxidantes pueden reparar radicales aminoacídicos. Algunos ejemplos son: Trolox C (análogo sintético de vitamina E) que repara radicales derivados de Trp libre y en lisozima rápidamente ( $k = 2-5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) y más rápido aun para los radicales derivados de Tyr, Met e His ( $k = 4-8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Otros antioxidantes son ácido úrico que repara radicales de Trp ( $k = 1.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) y ácido ascórbico ( $k = 9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>20</sup>.

#### *Reacción con otras proteínas*

Los tioles presentes en proteínas también reaccionan con los peróxidos formados, los de menor tamaño pueden inducir la oxidación del tiol de manera más rápida que los peróxidos de mayor tamaño. Así, la velocidad de este proceso varía con la estructura proteica, la naturaleza y tamaño del peróxido y el acceso y ubicación del tiol. Como resultado se puede destacar la inactivación enzimática, como sucede con la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, glutatión reductasa, caspasas y  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas<sup>17, 19</sup>.

Por otro lado, hay evidencia de la formación de agregados de alto peso molecular provocado por reacciones de entrecruzamiento. Algunos de estos agregados pueden derivar de la formación de ditirosina a partir de la unión de dos radicales tirosilo, o entrecruzamientos de disulfuros intermoleculares<sup>17</sup>.

Los grupos carbonilo formados como resultado de la oxidación pueden reaccionar de forma reversible mediante formación de base de Schiff con Lys y Arg de otras proteínas. Sin embargo el subsecuente rearrreglo Amadori resulta en un entrecruzamiento irreversible. Estas reacciones pueden ser las responsables de la inactivación de algunas enzimas por reacciones oscuras<sup>17</sup>.

Además se ha reportado algunos casos de fragmentación proteica inducida por intermediarios de la foto-oxidación. Radicales formados de los peróxidos pueden quitar un H de un C $\alpha$  para llevar a la formación del radical en el esqueleto proteico, y los mismos podrían dar lugar a la fragmentación<sup>17</sup>.

#### *Reacción con grupos prostéticos*

Se han demostrado modificaciones de grupos prostéticos presentes en proteínas provocadas por la exposición a  $^1\text{O}_2$ . Un ejemplo de esto es la enzima catalasa la cual al exponerse a  $^1\text{O}_2$  genera múltiples conformeros con puntos isoeléctricos más ácidos como resultado de la modificación del grupo hemo<sup>17</sup>.

### **1.4- Aminoácidos susceptibles a oxidación por $^1\text{O}_2$**

Las constantes de velocidad de las reacciones entre  $^1\text{O}_2$  con los diferentes residuos aminoacídicos varía de forma acentuada, lo que resulta en el daño selectivo de aminoácidos específicos.

Aquellos que reaccionan a una velocidad significativa a pH fisiológico son histidina, triptófano, tirosina, metionina, cisteína y cistina. Así, para Trp,  $k= 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , para His,  $k= 3.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.1 (presenta variaciones según el pH), para Tyr,  $k= 0.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , para Met,  $k= 1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y para Cys,  $k= 0.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ <sup>14</sup>. Las demás cadenas laterales reaccionan con  $k < 0.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH neutro<sup>17</sup>.

Como se mencionó anteriormente, tanto en sus formas libres como en proteínas, los aminoácidos Tyr, Trp e His, reaccionan con oxígeno singulete generando peróxidos, los cuales han podido ser detectados en proteínas presentes en células intactas mediante la exposición de estas a luz visible y en presencia de un fotosensibilizador<sup>15</sup>.

#### **1.4.1- Reacción con triptófano**

La reacción inicial entre oxígeno singulete y triptófano conduce a la formación de un hidroperóxido inestable que rápidamente es convertido en un hidroperóxido tricíclico, el cual se

obtiene como una mezcla de las formas *cis* y *trans* (WOOH). Este hidroperóxido puede descomponerse al alcohol correspondiente (WOH) y a N-formilquinurenina (FMK) que posteriormente puede descomponerse a quinurenina (Kn)<sup>14, 16, 21</sup>.

El derivado FMK es un mejor foto sensibilizador que el Trp lo que promueve una mayor producción de  $^1\text{O}_2$  bajo la exposición a luz UV<sup>22</sup>, y cuando la misma es prolongada puede conducir a un aumento en el daño por la descomposición de los endo- e hidro-peróxidos iniciales.

Tanto FMK como Kn se han asociado a condiciones patológicas como cataratas y formación de agregados covalentes de superóxido dismutasa implicados en esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades degenerativas de motoneuronas<sup>21</sup>.

#### **1.4.2- Reacción con histidina**

La oxidación inicial de His libre con  $^1\text{O}_2$  se da por la formación de endoperóxidos y el consumo de una molécula de  $\text{O}_2$  por mol de His<sup>14</sup>.

Se ha demostrado que los peróxidos son importantes intermediarios en la foto-oxidación de un amplio rango de especies derivadas de His entre las que se incluye el aminoácido libre así como residuos de este en péptidos. La formación de grandes cantidades de peróxidos se logran observar cuando se exponen las especies a luz visible en presencia de diferentes sensibilizadores, siendo estas cantidades dependientes de la presencia de luz y de la estructura del sensibilizador, ya que de esto también depende la formación de  $^1\text{O}_2$  fundamental como intermediario de reacción<sup>23</sup>.

Los peróxidos detectados decaen luego de algunas horas con el proceso acelerado por elevadas temperaturas, presencia de tioles, borohidruro, o Fe(II)-EDTA<sup>23</sup>. El endoperóxido inicial decae rápidamente a baja temperatura para dar intermediarios peróxidos y finalmente diversos productos como derivados de ácido aspártico, asparagina y urea<sup>17</sup>. Por ejemplo, el resultado final de la fotólisis de N-benzoyl-His a pH 11 cuando el anillo imidazol no se encuentra protonado y es susceptible al ataque nucleofílico, se obtuvo la formación de urea, N-benzoyl-Asp y N-benzoyl-Asn. Además, otros estudios han reportado la formación de compuestos peroxídicos a partir de la oxidación de derivados con imidazol sustituido. Estos peróxidos se han postulado como intermediarios importantes en reacciones de entrecruzamiento de aminoácidos oxidados con residuos sin modificar y en la modificación de enzimas<sup>23</sup>.

### 1.4.3- Reacción con metionina

La oxidación de metionina libre puede ocurrir mediante varias vías, las cuales varían con el pH, pero el producto final y mayoritario siempre es sulfóxido de metionina (MetO). La formación del mismo se da por la reacción entre una especie zwitteriónica ( $R_2S^+-OO^-$ ) que reacciona con una segunda molécula de Met dando dos moles de sulfóxido<sup>14, 24, 25</sup>.

Por un lado a  $pH \leq 6$ , la reacción es simplemente una, entre Met y  $O_2$  en relación estequiométrica 2:1. A pH 6-10 otra reacción entra en juego y es la que conduce a la formación de dehidrometionina, también se genera  $H_2O_2$ . Este compuesto, dehidrometionina lentamente se hidroliza a MetO. La estequiometría general incluyendo las reacciones oscuras es 1 mol de Met y  $O_2$  consumido para dar 1 mol de sulfóxido y uno de  $H_2O_2$ <sup>14, 24</sup>.

### 1.4.4- Reacción con cistina y cisteína

El aminoácido Cys libre reacciona rápidamente con  $^1O_2$  mediante la formación de un zwitterion ( $RS^+-OO^-$ ) el cual se descompone rápidamente para dar cistina (disulfuro), oxiácidos y ácido cistéico ( $RSO_3H$ ). Las cantidades de los mismos varían de acuerdo al impedimento estérico o barreras electrónicas según el aminoácido se encuentre libre o forme parte de la proteína<sup>14, 17, 25</sup>.

La oxidación de cistina libre se da mediante la formación de un intermediario peroxi-zwitteriónico que reacciona con otra molécula de cistina para dar dos moléculas de tiosulfonato ( $RSS(=O)R$ )<sup>17, 26</sup>.

## 1.5- Oxidación de tirosina

La tirosina es muy susceptible a daño oxidativo, ya que presenta la capacidad de reaccionar con la mayoría de las especies reactivas para dar productos característicos. Generalmente las modificaciones ocurren en la posición *orto* del anillo fenólico, adyacente al grupo hidroxilo. Algunos ejemplos son los productos de la reacción de tirosina con peroxinitrito, *o*-nitro-tirosina (mayoritario), *o*-hidroxi-tirosina y *o,o'*-ditirosina; producto de la reacción con HOCl, *o*-clorotirosina, entre otros<sup>27</sup>.

Esta posición, es preferida para la adición ya que las dos posiciones *orto* disponibles poseen menos impedimento estérico en comparación a la posición *para*, además de involucrar la rearomatización del anillo, dejando productos de oxidación relativamente inertes a otras reacciones. Estos productos de oxidación de la tirosina han sido los más estudiados, y se ha

observado que su formación se ve aumentada en varias patologías, evidenciando la formación del radical tirosilo intermediario *in vivo*.

Menos estudiados han sido los productos de oxidación de tirosina modificados en la posición *para*. Hay al menos cuatro formas de generar derivados de tirosina en *para* y son a partir de las siguientes reacciones: 1- entre tirosina y  $^1\text{O}_2$ , 2- entre radical tirosilo y superóxido, 3- hidroxilación de tirosina por radical hidroxilo y 4- entre radical tirosilo y radical peróxido lipídico.

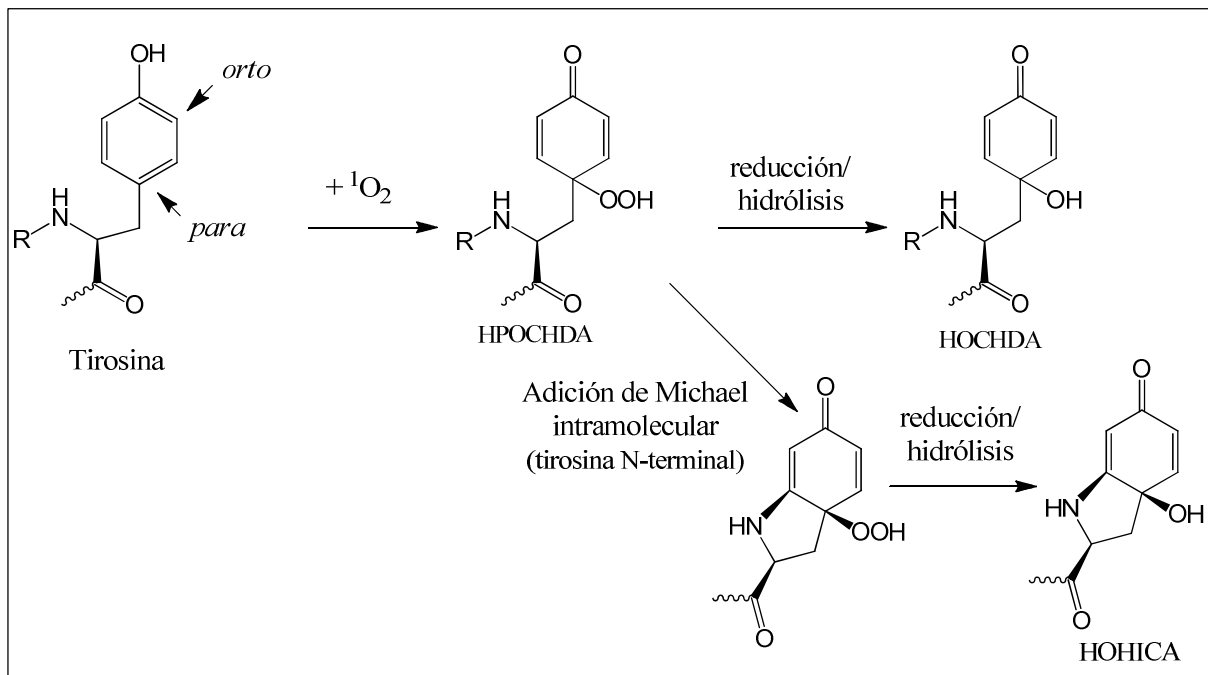
Estos productos no son estables como los modificados en *orto*, sino que son derivados electrofílicos que pueden reaccionar con otras biomoléculas. Todavía han sido poco estudiados, pero su formación podría tener importantes consecuencias biológicas, y por tanto es relevante profundizar en la caracterización de estos derivados electrofílicos de la tirosina.

### 1.5.1- Reacción de tirosina con oxígeno singlete

Inicialmente, la tirosina es oxidada por  $^1\text{O}_2$  mediante la 1,4-cicloadición del mismo al anillo fenólico conduciendo a la formación de un endoperóxido inestable que rápidamente abre su anillo para dar un hidroperóxido intermediario situado en la posición C1 del anillo (posición *para* del anillo fenólico). En presencia de un grupo  $\alpha$ -amino libre, como sucede en Tyr libre, el cierre del anillo es rápido y se da la formación de un hidroperóxido indólico que decae a su alcohol correspondiente ácido 3a-hidroxi-6-oxo-2,3,3a,6,7,7a-hexahidro-1H-indol-2-carboxílico (HOHICA, Fig. 1)<sup>15,28</sup>.

Aquellos hidroperóxidos que carecen de grupo  $\alpha$ -amino libre (como los formados en residuos de Tyr en péptidos) quedan como una ciclohexadienona *para*-OOH acíclica (HPOCHDA, 3-(1-hidroperoxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)-L-alanina; Fig. 1)<sup>27</sup>. Tienen mayor vida media y decaen lentamente a bajas temperaturas a su alcohol correspondiente. Este decaimiento se acelera a 37°C, en exposición a luz UV o a iones metálicos, y da origen a radicales reactivos, mediante la rotura del enlace peróxido. Estos radicales suelen estar implicados en la promoción del daño hacia otros blancos mediante la generación de más radicales<sup>28</sup>.

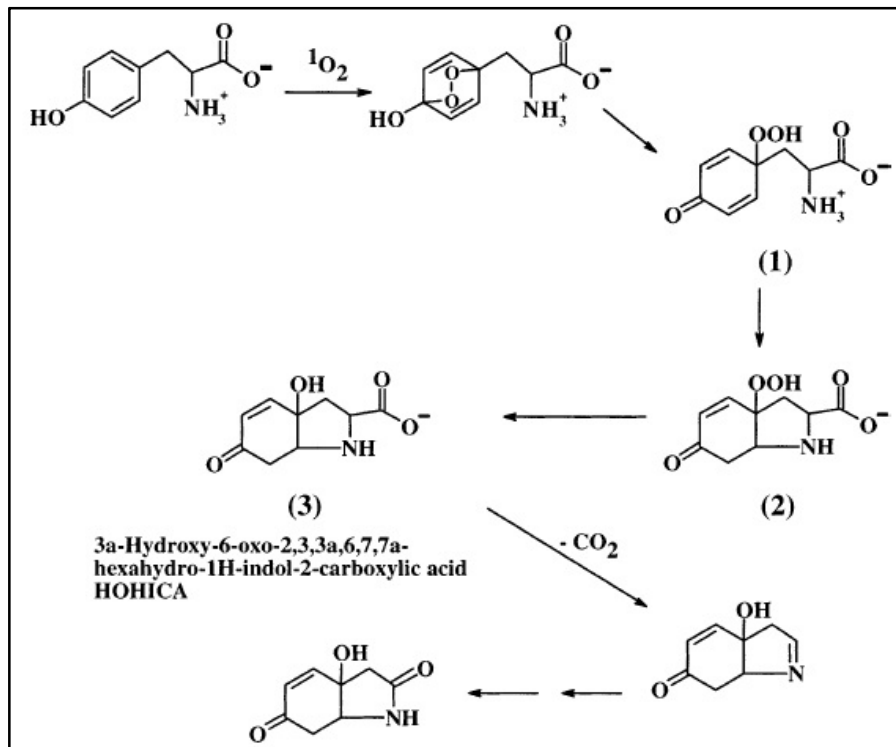
Por reducción o por hidrólisis HPOCHDA puede dar el derivado de tirosina 3-(1-hidroxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)-L-alanina (HOCHDA). A diferencia de los *orto*-derivados aromáticos, esta modificación cuenta con un carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado que convierte a estos derivados en electrófilos capaces de reaccionar con especies nucleofílicas así como con otras proteínas siendo potencialmente éste un importante mecanismo de agregación covalente de proteínas.



**Figura 1.** Esquema de reacción donde muestra la ciclación y formación de HOHICA cuando la tirosina es N-terminal, y HOCHDA cuando la tirosina está en otra parte del péptido.

Para el caso de la tirosina como aminoácido libre se ha propuesto como proceso de oxidación el esquema mostrado en la Fig. 2, donde se muestra con más detalle el proceso de ciclación previamente mencionado. El intermediario HPOCHDA (1) reacciona rápidamente con el grupo amina del aminoácido libre para dar el hidropéroxido de anillo cerrado (2). Esta especie decae subsecuentemente mediante un proceso no radicalar para dar el alcohol estable HOHICA, que resulta ser el producto mayoritario de la foto-oxidación de Tyr libre mediado por  $^1O_2$  aunque se ha reportado que el mismo puede oxidarse aún más en condiciones alcalinas para dar un compuesto ceto descarboxilado<sup>28</sup>.





**Figura 2.** Esquema de oxidación del aminoácido tirosina libre mediado por  $^1\text{O}_2$  obtenido de<sup>28</sup>.

Es posible que a bajas concentraciones estos *para*-derivados de tirosina desencadenen respuestas adaptativas como puede ser respuesta a shock térmico, o respuesta antioxidante impidiendo que el daño se promueva. Por otro lado, altas concentraciones de estos productos podrían contribuir al agregado proteico como sucede en enfermedades neurodegenerativas<sup>27</sup>.

### 1.5.2- Reacción entre radical tirosilo y superóxido

Las reacciones entre superóxido y otros radicales formados endógenamente como aquellos derivados de tirosina y guanina derivan en hidroperóxidos que presentan el potencial suficiente para contribuir a la naturaleza tóxica del superóxido<sup>11</sup>.

Los radicales fenoxilo son producidos por oxidación de tirosina que involucran un electrón, por ejemplo, por mecanismos que incluyen oxidación por peróxido de hidrógeno y peroxidasa como la mieloperoxidasa, oxidaciones catalizadas por radical hidroxilo y metales, y transferencia de electrones o de hidrógeno a otros radicales. En proteínas, los radicales tirosilo son parte del ciclo catalítico de la ribonucleótido reductasa, prostaglandina sintasa y lactoperoxidasa. Además son formados en mioglobina y hemoglobina durante la reacción con peróxido de hidrógeno<sup>29</sup>.

En ausencia de superóxido, radicales tirosilo ( $\bullet\text{Tyr}$ ) se combinan para formar ditirosina ( $k = 0.45 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>30</sup> de manera covalente (reacción 1, Fig. 3). Este tipo de enlace puede llevar al entrecruzamiento entre proteínas provocando la polimerización en condiciones de estrés oxidativo<sup>31</sup>, y se ha convertido en un biomarcador del mismo en varias patologías<sup>11</sup>. Entre estas se pueden destacar, cataratas, aterosclerosis, inflamación aguda, enfermedad de Alzheimer<sup>32</sup>. Así, elevados niveles de ditirosina se han encontrado como producto de envejecimiento, inflamación, exposición a UV y radiación gama ( $\gamma$ ) y otras condiciones de estrés oxidativo<sup>32, 33</sup>.

Sin embargo, las reacciones entre superóxido y radical tirosilo son lo suficientemente rápidas ( $k = 1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>27</sup> como para competir con la dismutación del superóxido y la formación de ditirosina. Estas reacciones pueden darse de dos formas, mediante transferencia de electrón (reacción 2a, Fig. 3) donde se repara el radical tirosilo y da  $\text{O}_2$ <sup>30</sup>, o mediante la adición del superóxido (reacción 2b, Fig. 3) para formar hidroperóxidos potencialmente tóxicos. La diferenciación entre éstas dos vías está influenciada por los grupos amino adyacentes que promueven la formación del hidroperóxido<sup>11</sup>.

La adición del superóxido puede darse tanto en posición *orto* como en posición *para* respecto al OH del anillo fenólico, pero resultados muestran que los productos predominantes son aquellos en posición *para*<sup>27</sup>. Estudios teóricos muestran que la adición de superóxido a la posición *orto* del radical tirosilo es más favorable desde el punto de vista termodinámico. Por otro lado, con el fin de encontrar una explicación válida para la formación del derivado en posición *para*, se ha estudiado la distribución de carga en el radical tirosilo. Se ha determinado que la carga negativa se distribuye sobre la posición *orto* y esto estaría actuando como barrera cinética que enlentece la reacción con el superóxido, lo que lleva a la formación del derivado preferencialmente en posición *para*<sup>34</sup>.

El hidroperóxido generado puede ser reducido en presencia de reductores (reacción 3, Fig. 3) a la especie monóxida, la cual mantiene centros electrofílicos que le permiten formar productos ya sea con glutatión como con otros tioles mediante adición de Michael, o formar un conjugado bicíclico (reacción 4, Fig. 3)<sup>11</sup>.

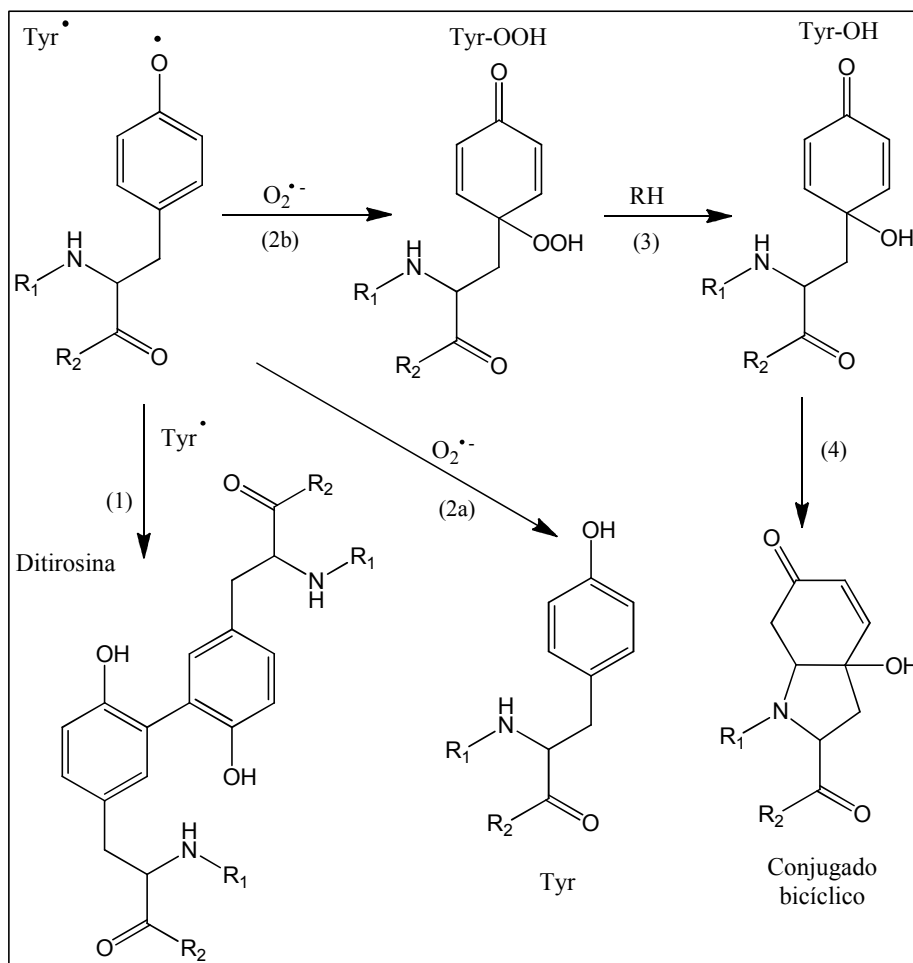


Figura 3. Esquema de reacción entre radical tirosilo y superóxido.

### 1.5.3- Reacción de tirosina con radical hidroxilo

El radical hidroxilo es la especie más reactiva de todas, pudiendo reaccionar básicamente con cualquier biomolécula. La oxidación de tirosina por radical hidroxilo genera como producto principal *o*-hidroxi-tirosina, llamado también L-dopa<sup>35</sup>, pero también puede darse en la posición *para* del anillo fenólico, aunque la misma se da en menor medida, entre un 6-12% respecto a la formación del derivado *o*-OH<sup>27</sup>.

### 1.5.4- Reacción entre radical tirosilo y peróxido lipídico

Se observó que cuando se oxidan lípidos polinsaturados en presencia de tirosina se forman productos de adición radicalar entre el radical tirosilo y radicales peróxido lipídicos. Los aductos estables de tirosina-peróxido lipídico han sido exclusivamente resultado de la adición a la tirosina en *para*. Los endoperóxidos resultantes pueden reducirse para dar HOCHDA, o

también se puede dar una reacción de Diels-Alder intramolecular para resultar en una estructura tricíclica<sup>36</sup>.

Los residuos de tirosina se observan frecuentemente en regiones de las proteínas que se unan a membrana y estudios sugieren que esta ubicación minimiza la energía libre relativa a su ubicación en sitios expuestos a solventes o sitios transitorios. Dicha ubicación y la de los lípidos de membrana indican la posibilidad de que se den reacciones enterradicales tirosilo y radicales derivados de lípidos<sup>33</sup>. La formación de estos últimos es una de las reacciones fundamentales que se establecen durante el proceso de estrés oxidativo, y estos peroxilos lipídicos son relativamente móviles en una membrana en comparación con un residuo proteico de tirosina<sup>36</sup>.

### **1.5.5- Conjugación de glutatión a tirosina oxidada**

Durante la oxidación proteica se pueden dar varios tipos de modificaciones ya sean reversibles o irreversibles. Una modificación proteica común es la S-glutationilación donde se da la formación de un enlace disulfuro (S-S), proceso reversible propuesto como uno de los mecanismos involucrados en la señalización redox. La glutatiónilación a través del enlace C-S puede también ocurrir si en la oxidación proteica se da el aumento de sitios electrofílicos que pueden formar aductos por adición de Michael<sup>37</sup>.

Como se mencionó anteriormente, en la oxidación de tirosina se forma un hidroperóxido que presenta un grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado que le brinda sitios electrofílicos, esto favorece la interacción con tioles y otros nucleófilos; la reducción del hidroperóxido al derivado hidroxilo mantiene dichos sitios por lo que el nuevo compuesto también puede establecer las reacciones mencionadas. Esto puede resultar en la conjugación de los derivados de tirosina con GSH, reacción que es un potencial mecanismo para entrecruzamiento entre Tyr y Cys en proteínas<sup>37</sup>.

Cuando GSH reacciona con el hidroperóxido lo reduce al derivado hidroxilado que rápida y eficientemente forma conjugados. Lo que provoca esta reducción es que se elimine la capacidad oxidativa pero las modificaciones estructurales se mantienen<sup>37</sup>.

Estudios muestran que la formación de HOCHDA por la reacción de radical tirosilo con superóxido y posterior reducción, puede llevar a un posterior paso de adición de uno o dos GSH. La formación de aductos entre GSH y HOCHDA se ha observado en proteínas. Utilizando diferentes sistemas para generar el radical tirosilo en estas proteínas junto con superóxido y posterior agregado de GSH, se ha observado la formación de aductos por espectroscopía de masa<sup>37</sup>. Se identificó la formación de un aducto GS-HOCHDA en la Tyr 151 de la mioglobina de

ballena <sup>37</sup>, y la formación de mono y diaductos GS-HOCHDA en la Tyr 14 de la insulina <sup>11</sup>. El entrecruzamiento de GSH puede revertirse lentamente, sin embargo a las concentraciones de GSH en las células es probable que persista <sup>11</sup>.

Dada la cantidad de reacciones que pueden dar lugar a HOCHDA en un contexto biológico, que probablemente aumenten en condiciones patológicas y la reactividad de HOCHDA hacia tioles y otros nucleófilos, consideramos que HOCHDA puede ser un intermediario importante en el estrés oxidativo y que merece ser estudiado en mayor profundidad. Por ello, en este trabajo proponemos estudiar métodos para detectar la presencia de HOCHDA en péptidos y proteínas. Para eso nos aprovecharemos de las diferencias de reactividad de HOCHDA con otros aminoácidos.

## Objetivo general

Desarrollar un método sensible y robusto para la detección del derivado electrofílico de tirosina, HOCHDA, en péptidos y proteínas.

### ❖ Objetivos específicos

Estudiar la aplicabilidad de DNPH y TNB para la detección de HOCHDA utilizando el derivado lactona de N-Boc-tirosina.

Estudiar la aplicabilidad de DNPH y TNB para la detección de HOCHDA utilizando glicil-HOCHDA.

Sintetizar y aplicar una sonda fluorescente para detectar HOCHDA en péptidos y proteínas.

## 2- Materiales y métodos

Los reactivos utilizados fueron de Sigma y Applichem. Las soluciones buffer que se emplearon más frecuentemente fueron buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 y buffer borato de sodio 100 mM pH 8.5. Las medidas de absorbancia se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50. Para el análisis de productos por HPLC se utilizó un HPLC Agilent Infinity 1260 cuaternario con detectores de absorbancia de arreglo de diodos (1260 DAD VL) y fluorescencia (1260 FLD), con inyección manual. Las fases móviles típicamente utilizadas fueron A: 0.1% trifluoroacético (TFA) en agua, B: 0.1% TFA en acetonitrilo y no serán mencionadas a continuación excepto cuando se cambie la fase móvil. Las columnas utilizadas fueron: Supelco Discovery C18, 25 cm x 4.6 mm (Supelco analítica), Supelco Discovery C18, 25 cm x 10 mm (Supelco semipreparativa) y Agilent Eclipse Plus C18, 100 x 4.6 mm (Eclipse analítica).

### 2.1- Lactona 1

#### 2.1.1- Caracterización de N-Boc Tirosina oxidada

*Síntesis de la lactona.* El derivado lactona 1 de N-Boc tirosina fue provisto por el Dr. Williams Porcal, obtenido a partir de la reacción de N-Boc Tirosina con fenil iododiacetato (PIDA) en tetrahidrofurano y agua.

Al considerar que el grupo reactivo de HOCHDA (la ciclohexadienona) es la misma para la lactona 1 se utilizó como análogo de HOCHDA.

*Caracterización de la lactona.* Se realizaron espectros de absorbancia en metanol, agua con 0.1% TFA y buffer fosfato para visualizar el cambio de absorbancia. Para esto se midió a  $\lambda = 200-400$  nm con el fin de determinar a qué longitud de onda absorbe el compuesto.

Para determinar el coeficiente de absortividad molar de la lactona 1 se realizó una curva de calibración utilizando una concentración inicial de 11.3 mM en metanol y se prepararon soluciones de 22.6, 45.2, 67.9, 90.5 y 113.1  $\mu$ M en agua con 0.1% TFA. En la realización de la curva de calibración se midió a la  $\lambda = 229$  nm.

### 2.1.2- Reacción con dinitrofenilhidrazina (DNPH)

*Preparación de DNPH.* Se preparó una solución 10 mM de DNPH en HCl 2M y luego se realizó la cuantificación midiendo a  $\lambda = 352 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 14900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ <sup>38</sup>. Para esto se preparó una solución 60  $\mu\text{M}$  en etanol. La concentración final resultó ser 12.9 mM.

*Reacción entre DNPH y lactona.* En la reacción se ensayaron diferentes condiciones, en relación estequiométrica 1:1 se probaron las concentraciones 2, 0.5 y 0.1 mM (de cada uno de los reactivos) y en relación 2:1 (donde el DNPH se encuentra en exceso respecto a la lactona) se probaron las concentraciones 4 mM de DNPH con 2 mM de lactona. Todas las soluciones fueron preparadas en HCl 2M partiendo de concentraciones iniciales de 11.3 mM para la lactona y 12.9 mM en el caso de DNPH. Se dejó reaccionar 20 min a Temp. amb., protegido de la luz.

Para el análisis de los productos de reacción se realizaron espectros de absorbancia. Cada una de las muestras se llevó a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  con HCl 2M, y además se preparó una solución de igual concentración de DNPH como control. Se realizaron espectros de absorción entre 200-700 nm.

También se realizó el análisis por HPLC, la columna utilizada fue Supelco analítica. Se aplicó un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. El método utilizado fue 100% del solvente A de 0-6 min, 100% del solvente B de 20-22 min y 100% del solvente A de 25-34 min. Se inyectaron 10  $\mu\text{l}$  de muestra. Se realizaron tres tipos de controles, uno de DNPH 1.29 mM en HCl 2M, otro de lactona 10 mM en MeOH y un blanco con HCl 2M. Se hizo la detección a las siguientes longitudes de onda: 228, 280, 322, 334 y 360 nm.

### 2.1.3- Reacción con ácido tionitrobenzoico (TNB)

*Preparación de TNB.* El tiol se obtuvo a partir de la reducción del reactivo de Ellman ditionitrobenzoico (DTNB) con exceso ditionitroretol (DTT). Para esto se preparó DTNB 100 mM en buffer fosfato con adición de NaOH 175 mM para mejorar su solubilización y DTT 200 mM. Se dejó reaccionar durante 1 h, a Temp. amb., protegido de la luz.

La purificación se realizó por separación en cartucho de extracción en fase sólida C18 de 500 mg (Baker, Phillipsburg, NJ). La activación de la columna se realizó con dos volúmenes de 1 ml de acetonitrilo, luego el equilibrado se hizo con tres volúmenes de 1 ml de 0.1% TFA en agua. Se inyectó 500  $\mu\text{l}$  de muestra previamente acidificada con 1% de TFA. El lavado se realizó con



tres volúmenes de 1 ml de 0.1% TFA en agua y finalmente el analito se eluye con tres volúmenes de 1 ml de acetonitrilo.

Para la cuantificación de TNB se realizaron espectros de absorbancia midiendo  $\lambda=350-450$  nm. La muestra es previamente diluída en pirofosfato de sodio 100 mM pH 9 con el fin de que se encuentre desprotonado. Finalmente la cuantificación se hizo midiendo a  $\lambda= 412$  nm,  $\epsilon= 14150$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-139</sup>.

Con el fin de verificar la pureza de TNB y determinar la ausencia de DTNB en la muestra se hizo reaccionar el producto obtenido con glutatión. En una primera instancia se midió la absorbancia de la solución realizada en pirofosfato y luego se agregó glutatión para obtener una concentración final de 1 mM y se midió la absorbancia nuevamente. La absorbancia no aumentó indicandola ausencia de restos de DTNB en la muestra.

*Reacción entre TNB y lactona.* En la reacción se analizan diferentes condiciones donde se mantiene fija la concentración de TNB 1 mM y se evalúa frente a concentraciones variables de lactona como: 1 mM, 500  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 50  $\mu$ M en buffer fosfato, durante 2 h, Temp. amb. y protegidos de la luz.

Se realizó el análisis de los productos mediante HPLC. La columna utilizada fue Supelco analítica. Se aplicó un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. El método utilizado fue 100% de A de 0-6 min, 100% de B de 20-22 min y 100% del solvente A de 25-34 min. Se inyectó 10  $\mu$ l de muestra. Se realizaron tres controles, uno de DTNB 1.82 mM en buffer fosfato, otro de lactona 1 mM y uno de TNB 2 mM a partir de una concentración inicial de 97 mM. Se hizo la detección a las siguientes longitudes de onda: 228 (donde absorbe la lactona), 280, 314 (donde absorbe DTNB), 320 (donde absorbe TNB), 410 y 500 nm.

## 2.2- Dipéptido glicil-HOCHDA

### 2.2.1- Preparación de G-HOCHDA

*Síntesis, purificación y análisis de productos.* Se basa en la oxidación de la tirosina del dipéptido glicil-tirosina (GY) con oxígeno singulete. Esta reacción produce un hidroperóxido que puede ser reducido a HOCHDA con dimetilsulfuro (DMS). El oxígeno singulete se produjo mediante fotosensibilización utilizando azul de metileno (MB) a 0 °C, con barboteo de oxígeno y expuesto a dos lámparas fluorescentes de 150 W de potencia. Se probaron diferentes condiciones con el fin de obtener una buena cantidad de producto y alto rendimiento.

En una primera instancia, se hizo reaccionar el dipéptido GY 20 mM con MB 30  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato durante 8 h bajo la producción de oxígeno singulete. A continuación se procedió a reducir con DMS 0.1 M durante 1 h en agitación.

El análisis de GY oxidado con  $^1\text{O}_2$  se realizó por HPLC, la columna utilizada fue Supelco analítica. Se aplicó un flujo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . El método utilizado fue 100% de A de 0-5 min, 30% de A de 15-18 min y 100% de A de 20-27 min. Se inyectó 10  $\mu\text{l}$  de muestra. Además de las muestras a  $t=0$ ,  $t=8 \text{ h}$  y la reducida, se realizó un blanco con buffer fosfato. La detección se realizó a las siguientes longitudes de onda: 230, 280 y 350 nm.

La purificación del producto se hizo mediante HPLC, con detección UV. Se utilizó la columna Supelco semipreparativa. Se aplicó un flujo de  $4 \text{ ml min}^{-1}$ . El método utilizado fue 100% de A de 0-8 min, 40% de A de 12-14 min y 100% de A de 16-24 min. Para la inyección de la muestra se adicionó a la misma TFA (2  $\mu\text{l}$  cada 0.5 ml de muestra) con el fin de que se realice una mejor mezcla con la fase móvil y se hizo un blanco con agua. La detección se realizó a las siguientes longitudes de onda: 230, 280 y 350 nm.

Se realizó la cuantificación del producto obtenido midiendo a  $\lambda= 227 \text{ nm}$ , longitud a la cual absorbe el compuesto de referencia adoptado, N-acetil HOCHDA glicilmetilester, y presenta un  $\epsilon= 9700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (M. Moller, N. Porter, comunicación personal).

Finalmente invirtiendo más tiempo en la optimización tanto de la síntesis como de la purificación se procedió a probar la reacción de síntesis en otras condiciones donde el dipéptido GY 20 mM se prepara en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) y se hizo reaccionar con MB 30  $\mu\text{M}$  durante 2 h y en producción de oxígeno singulete. Luego se procedió a la realización de la reducción del producto con DMS 0.1 M durante 1 h en agitación.

La purificación del producto se realizó primero mediante el uso de un cartucho de extracción en fase sólida de C18, de 200 mg SPE y otro de 500 mg. La activación de la columna de 200 mg se realizó con dos volúmenes de 500  $\mu\text{l}$  de metanol, luego el equilibrado se hizo con tres volúmenes de 500  $\mu\text{l}$  de 0.1% ácido fórmico (FA) en agua. Se inyectó 500  $\mu\text{l}$  de muestra pura. El lavado se realizó con dos volúmenes de 0.5 ml de 0.1% FA en agua. Para el caso del cartucho de 500 mg los volúmenes se duplicaron. Posteriormente, se analizaron las fracciones obtenidas de ambas purificaciones por HPLC y posterior cuantificación, ambos análisis se realizaron en las mismas condiciones anteriormente descritas.

### **2.2.2- Reacción con dinitrofenilhidrazina (DNPH)**

*Reacción entre DNPH y G-HOCHDA.* Se trabajó con la fracción de G-HOCHDA 6.5 mM y con el DNPH anteriormente preparado 12.9 mM. Las condiciones establecidas para la reacción fueron las siguientes, la concentración de G-HOCHDA se mantuvo constante en 1 mM y la de DNPH variable: 10 mM, 1 mM, 500  $\mu$ M en HCl 2M por duplicado durante 20 min, Temp. amb., protegido de la luz.

Los productos de reacción fueron analizados por HPLC. La columna utilizada fue Eclipse analítica. Se aplicó un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. El método utilizado fue 100% de A de 0-4 min, 100% de B de 16-18 min y 100% de A de 20-26 min. Se inyectó 5  $\mu$ l de muestra. Los controles realizados fueron los siguientes: G-HOCHDA 1 mM en HCl 2M, DNPH 1 mM en HCl 2M y dipéptido GY 2 mM. Se hizo la detección a las siguientes longitudes de onda: 228, 280, 322, 334 y 360 nm.

A partir de los cromatogramas obtenidos nos planteamos optimizar la separación entre producto de reacción y DNPH remanente, de esta forma se estableció una diferente combinación de fases móviles a la hora de realizar el análisis por HPLC. Las condiciones para la separación continuaron siendo las establecidas pero A: 0.1% FA en agua y B: acetonitrilo.

### **2.2.3- Reacción con ácido tionitrobenzoico (TNB)**

*Reacción entre TNB y G-HOCHDA.* Se trabajó con el TNB previamente sintetizado de concentración 100 mM y la fracción de G-HOCHDA de concentración 6.5 mM. Se analizaron diferentes condiciones donde la concentración de TNB fue constante, 1 mM, y la de G-HOCHDA variable: 1 mM, 500  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 100  $\mu$ M en buffer fosfato, durante 2 h, Temp. amb., en agitación y protegidos de la luz.

Se realizó el análisis de los productos de reacción por HPLC. La columna utilizada fue Eclipse analítica. Se aplicó un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. El método utilizado fue 100% de A de 0-15 min, 100% de B de 15-17 min y 100% de A de 18-23 min. Se inyectó 10  $\mu$ l de muestra. Se realizaron diferentes controles, TNB 2 mM en agua, TNB 1 mM en buffer fosfato, G-HOCHDA 1 mM en agua, G-HOCHDA 500  $\mu$ M en buffer fosfato y dipéptido GY 2 mM en buffer fosfato. Se hizo la detección a las siguientes longitudes de onda: 228, 280, 314, 320, 410 y 500 nm.

### 2.3- Desarrollo de sonda fluorescente

Se preparó un derivado de glutatión conjugado a un grupo fluorescente, a una fluoresceína, mediante un enlace amida.

*Síntesis de F-GSH.* Se hizo reaccionar glutatión disulfuro (GSSG) 25 mM preparado en buffer borato y N-Hidroxisuccinimida-Fluoresceína (NHS-F, Pierce/Thermo, Rockford IL) 12.5 mM preparada en dimetilformamida (DMF), durante 1 h, Temp. amb., protegido de la luz. El pH se ajustó a 8.5 mediante el agregado de NaOH 1 M. Posteriormente se procedió a la reducción del GSSG con DTT 40 mM durante 30 min, Temp. amb., bajo agitación.

Los productos se analizaron por HPLC, con detección UV-Vis y fluorescencia. La columna utilizada fue Eclipse analítica. Se aplicó un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. El método utilizado fue 100% A de 0-15 min, 100% B de 15-17 min y 100% A de 18-23 min. Se inyectó 5 µl de muestra. Se realizó el control NHS-F 1.25 mM en buffer borato, y se analizó cada muestra: GSSG + NHS-F y GSSG + DTT en agua. La detección de absorbancia se realizó a las longitudes de onda: 228, 280, 320, 495, mientras que la detección de fluorescencia se realizó a  $\lambda_{ex}$  = 495 nm,  $\lambda_{em}$  = 520 nm.

La purificación de la sonda se realizó mediante HPLC usando la columna Supelco semipreparativa. Se aplicó un flujo de 4 ml min<sup>-1</sup>. Se inyectaron volúmenes de 100 y 200 µl de muestra. La única detección realizada fue de fluorescencia usando  $\lambda_{ex}$  = 495 nm y  $\lambda_{em}$  = 520 nm. El método utilizado fue 75% A de 0-30 min. La muestra fue acidificada previamente utilizando TFA 1%.

Se realizó la cuantificación de cada uno de los picos recolectados midiendo a  $\lambda$  = 495 nm, donde NHS-F presenta un  $\epsilon$  = 70000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Instrucciones de fabricante). Para esto cada muestra se preparó en agua.

*Reacción entre F-GSH y G-HOCHDA.* A partir de la fracción de G-HOCHDA 4.3 mM se preparó una solución 1.1 mM que se hizo reaccionar con una fracción 94 µM de F-GSH (de concentración inicial 376 µM) y con 47.5 µM de la otra fracción de F-GSH (de concentración inicial de 190 µM) en buffer borato. La reacción se dejó transcurrir durante 120 min, Temp. amb., protegido de la luz y bajo agitación.

Se analizaron los productos por HPLC, con detección UV-Vis y fluorescencia. La columna utilizada fue Eclipse analítica. Se aplicó un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. El método utilizado fue 100% A

de 0-15 min, 100% B de 15-17 min y 100% A de 18-23 min. Se inyectó 5  $\mu$ l de muestra. La detección de absorción se realizó a las longitudes de onda: 228, 280, 320, 495, mientras que la detección de fluorescencia se realizó a  $\lambda_{ex}$ = 495 nm,  $\lambda_{em}$ = 520 nm y  $\lambda_{ex}$ = 450 nm,  $\lambda_{em}$ = 520 nm.

## 2.4- Ribonucleasa A (RNasa A)

### 2.4.1- Oxidación de proteína

Se hizo reaccionar 200  $\mu$ M de RNasa A preparada en agua deuterada con 30  $\mu$ M de MB durante 1 h con barboteo de oxígeno y expuestos a una lámpara fluorescentes de 150 W de potencia.

### 2.4.2- Reacción con F-GSH

*Condición 1.* Se trabajó con la RNasa oxidada 200  $\mu$ M y la sonda previamente sintetizada, F-GSH 190  $\mu$ M. Se hizo reaccionar 33.3  $\mu$ M de proteína con 127  $\mu$ M de F-GSH. Se controló pH y se adiciono 10  $\mu$ l de NaOH 500 mM. La reacción tuvo una duración de 3 h, Temp. amb., protegido de la luz.

La purificación del producto se realizó por gel filtración. Se utilizó PD-10 Desalting columns 8.3 ml Sephadex G-25 medium. Se equilibró con 25 ml de buffer fosfato. Se sembró 500  $\mu$ l de la muestra correspondiente a RNasa nativa-GS-F y se pasaron 2 ml de buffer fosfato. Luego se recolectó cada 0.5 ml del eluido. Cuando dejó de salir color se lavó la columna con 25 ml de buffer fosfato, se sembró la muestra correspondiente a RNasa oxidada-GS-F y se prosiguió de la misma manera. Se realizaron espectros de absorbancia de las distintas fracciones para construir cromatogramas.

*Condición 2.* Se trabajó en dos condiciones, una con RNasa oxidada 33.3  $\mu$ M y F-GSH 251  $\mu$ M a partir de concentraciones iniciales de 200  $\mu$ M y 376  $\mu$ M respectivamente, y por otra parte con RNasa nativa en las mismas condiciones. Ambas reacciones se hicieron en buffer borato y se les ajusto el pH a 8.5 con NaOH 500 mM. La reacción tuvo una duración de 3 h, Temp. amb., agitación y protegida de la luz. Una fracción de los productos obtenidos se las hizo reaccionar con borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) 10 mM durante 20 min, Temp. amb.

Se realizaron varios geles de poliacrilamida y la corrida electroforética varió con el fin de encontrar las mejores condiciones para la visualización del producto de interés que es el aducto de la proteína oxidada a la sonda fluorescente. Los geles fueron de poliacrilamida 15% y los

separadores variaron entre 1 y 1.5 mm. El MWM utilizado fue de BioLabs broad range #P7710S (10-230 kDa) del cual se sembraron 5  $\mu$ l. Los lavados del gel se realizaron con agua o bicarbonato de sodio 50 mM pH 8.5. La fluorescencia fue revelada utilizando escáner de geles G-box, usando filtro SW06 y lámpara Blue LED Module (M). Para la tinción de los geles se utilizó Azul de Coomassie coloidal, luego se destiñó con agua.

### 3- Resultados y discusión

Se ha demostrado que existen varias vías para la formación del derivado HOCHDA (3-(1-hidroxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)-L-alanina) a partir de la oxidación de tirosina, ya sea por oxidación directa con oxígeno singulete, formación de radical tirosilo que reacciona con superóxido o radical peroxilo lipídico y por hidroxilación por radical hidroxilo<sup>27, 36</sup>. El derivado ciclohexadienona presenta un grupo  $\alpha,\beta$ -insaturado que le da carácter de mayor reactividad pudiendo reaccionar con nucleófilos tales como tioles o aminas<sup>37</sup>, y podría tener consecuencias biológicas importantes, como por ejemplo la agregación proteica.

El objetivo principal de este estudio fue obtener un método sensible y robusto que permita detectar la formación del derivado HOCHDA en péptidos para luego poder aplicar el método a proteínas y eventualmente a muestras biológicas. Para ello se generó el derivado por oxidación de péptidos pequeños como glicil-tirosina y N-Boc tirosina. Estos se hicieron reaccionar con tioles conjugados a grupos cromofóricos o fluorescentes y con dinitrofenilhidrazina, con el fin de facilitar la detección de los productos formados por HPLC y otras técnicas analíticas.

Finalmente, como era de interés utilizar el método de detección con proteínas, se generó el derivado en Ribonucleasa A por oxidación con oxígeno singulete, y posteriormente se la hizo reaccionar con glutatión asociado a grupo fluorescente, para luego ser detectado en una electroforesis en gel de poliacrilamida.

#### 3.1- Lactona 1

##### 3.1.1- Caracterización de N-Boc Tirosina oxidada

Considerando que el grupo reactivo de HOCHDA (la ciclohexadienona) es la misma para la lactona y ésta era fácil de obtener en grandes cantidades (Fig. 4), se utilizó la misma como modelo químico.

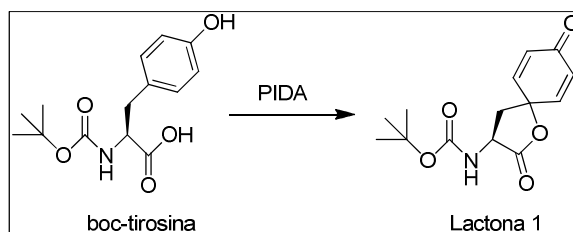
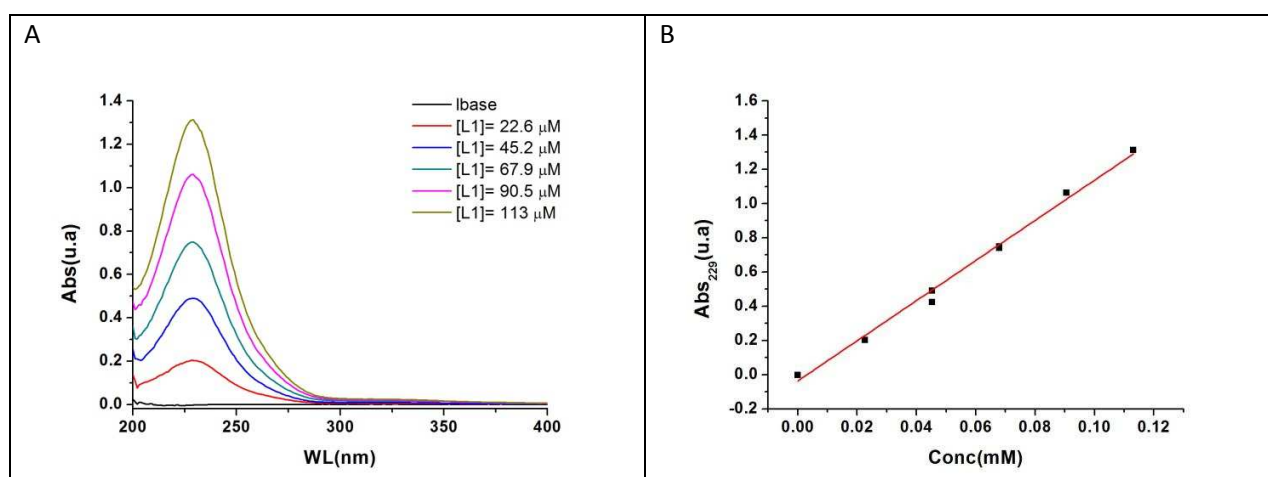


Figura 4. Esquema de síntesis de lactona 1 a partir de la oxidación de N-Boc tirosina.

Se probó solubilizar el compuesto con diferentes solventes, tales como acetonitrilo, buffer fosfato, dimetil sulfóxido (DMSO) y finalmente se logró preparar una solución en metanol.

Con el fin de caracterizar el compuesto se realizaron espectros de absorción, midiendo a  $\lambda = 200\text{-}400\text{ nm}$  (Fig. 5A) para determinar la longitud de onda máxima a la cual absorbe la lactona 1, que resultó ser  $229\text{ nm}$ . Posteriormente se realizó una curva de calibración (Fig. 5B), preparando diferentes concentraciones del compuesto en agua con  $0.1\%$  TFA y midiendo a  $229\text{ nm}$  para determinar el coeficiente de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) del compuesto, que resultó ser  $11700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , similar al que presenta el compuesto de referencia N-acetil HOCHDA glicil metilester,  $9700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (M. Moller, N. Porter, comunicación personal).



**Figura 5. A.** Espectros de absorbancia. La línea de base se realizó con agua con  $0.1\%$  TFA. **B.** Curva de calibración realizada midiendo la absorbancia a  $\lambda = 229\text{ nm}$  de cada una de las muestras utilizadas en A,  $r^2 = 0.992$  y  $\epsilon = 11700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

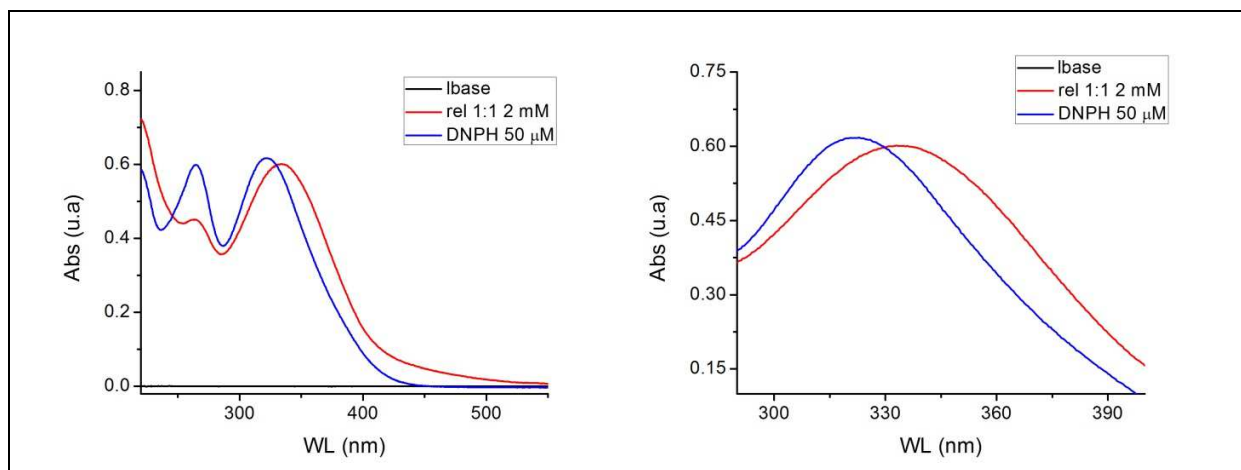
### 3.1.2- Reacción con dinitrofenilhidrazina (DNPH)

Se probaron diferentes condiciones de reacción, en relación estequiométrica 1:1 se probaron las concentraciones 2, 0.5 y 0.1 mM (de cada uno de los reactivos) y en relación 2:1 (donde el DNPH se encuentra en exceso respecto a la lactona) se probaron las concentraciones 4 mM de DNPH con 2 mM de lactona.

En una primera instancia los productos de la reacción entre DNPH y lactona 1 fueron analizados mediante la realización de espectros de absorbancia (Fig. 6). En la misma se puede observar que el DNPH en HCl presenta pico de absorción a  $\lambda = 322\text{ nm}$ . La formación del producto se observa para las muestras en las que ambos reactivos presentaban una concentración 2 mM, para estas el pico de absorbancia máxima se observa a  $\lambda = 334$

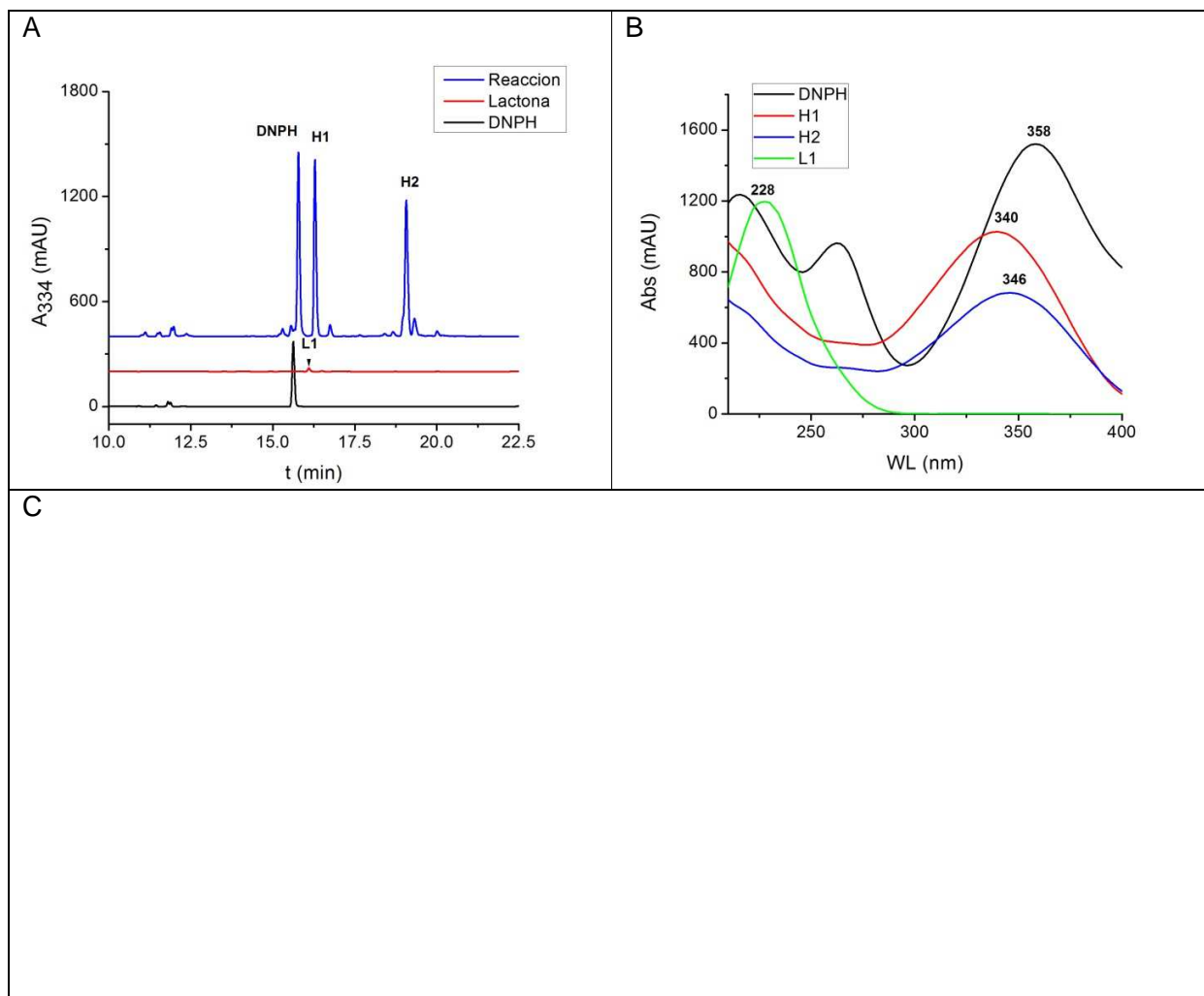


nm. Probablemente a concentraciones menores la reacción es más lenta y habría que esperar más para ver la formación de productos.



**Figura 6.** Espectros de absorbancia de los productos de reacción de L1 y DNPH, la línea de base se realizó con HCl 2M y cada una de las muestras se llevó a una concentración 50  $\mu$ M con HCl 2M.

Posteriormente se procedió al análisis de los productos obtenidos de la reacción mediante HPLC. A partir de los cromatogramas obtenidos (Fig. 7A) se puede decir que en condiciones equimolares se forma un producto principal que atribuimos a la hidrazona H1 -formada como producto entre la lactona y DNPH- mientras que en condiciones donde el DNPH se encuentra en exceso, que serían las condiciones en que se usaría la reacción generalmente, aparece un pico nuevo que probablemente corresponda al producto de la hidrazina atacando la lactona (H2). Los espectros de los picos se muestran en la Fig. 7B, donde se observa la diferenciación de los espectros de cada uno de los productos, H1 absorbe a 340 nm, mientras que H2 lo hace a 346 nm. En la Fig. 7C se muestran las dos estructuras posibles correspondientes a dichos productos.

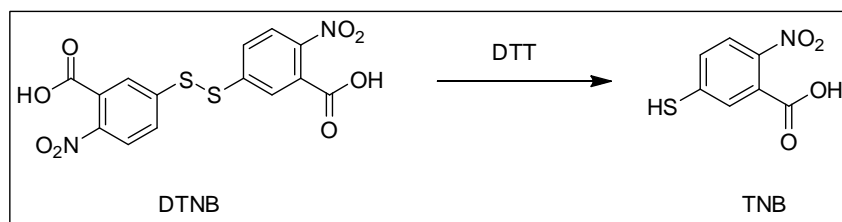


**Figura 7. A.** Cromatogramas realizados por HPLC midiendo a  $\lambda = 334$  nm, de DNPB, lactona 1 y la reacción donde DNPB se encuentra en exceso **B.** Espectros de absorbancia de cada uno de los productos formados (H1 y H2) y de cada uno de los reactivos (lactona 1 y DNPB) **C.** Esquema de reacción entre L1 y DNPB con la formación de H1 y H2.

Esto indica que hay que tener cuidado con los resultados obtenidos con la lactona 1, porque pueden ocurrir reacciones no relacionadas con la ciclohexadienona sino con el grupo lactona.

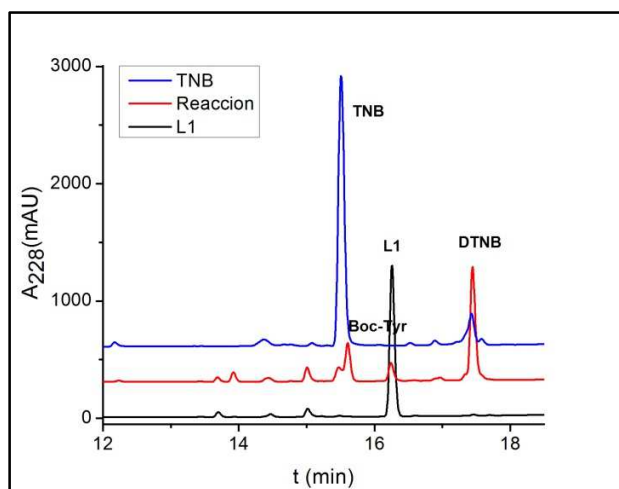
### 3.1.3- Reacción con ácido tionitrobenzoico (TNB)

El TNB se obtuvo a partir de la reducción del reactivo DTNB con exceso de ditiotreitól(DTT) como se explica en materiales y métodos y se muestra en la Fig. 8.



**Figura 8.** Esquema de reacción de reducción de DTNB con DTT para dar TNB.

El TNB sintetizado se hizo reaccionar con la lactona 1 y el análisis de los productos obtenidos fue realizado mediante HPLC (Fig. 9). En el ensayo con relación estequiométrica 1:1 de los reactivos se puede visualizar la formación de varios productos no identificados además de DTNB y Boc-Tirosina. Por su parte, la formación de DTNB se puede observar en las demás condiciones, siendo este resultado inconsistente con lo obtenido a partir del ensayo previo de glutatión con N-acetil HOCHDA alanina-metilester donde se observó la formación del aducto (M. Moller, N. Porter, comunicación personal), indicando que ésta puede ser una reacción particular de la lactona, por lo que no estaría representando correctamente a nuestro compuesto de interés: HOCHDA.



**Figura9.** Cromatograma midiendo a  $\lambda = 228$ , de TNB, lactona 1 y reacción de rel 1:1.

Este resultado junto con el obtenido a partir de la reacción entre lactona 1 y DNPH nos llevó a dejar de trabajar con este compuesto como modelo químico de HOCHDA, ya que podrían estar dándose reacciones entre los reactivos propuestos con el grupo lactona y no siendo tan específico para la detección de la ciclohexadienona. De este modo, nos propusimos optimizar la síntesis de glicil-HOCHDA.

## 3.2- Dipéptido glicil-HOCHDA

### 3.2.1- Preparación de G-HOCHDA

La síntesis del derivado peptídico de HOCHDA se encuentra representada en la Fig. 10, en la misma se observa como el residuo de tirosina del dipeptido GY se ve modificado por oxidación con oxígeno singulete a la formación del hidroperóxido el cual se reduce con dimetilsulfuro(DMS) a HOCHDA.

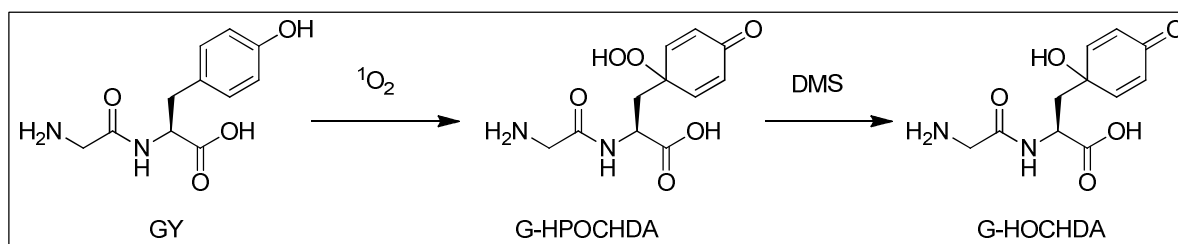
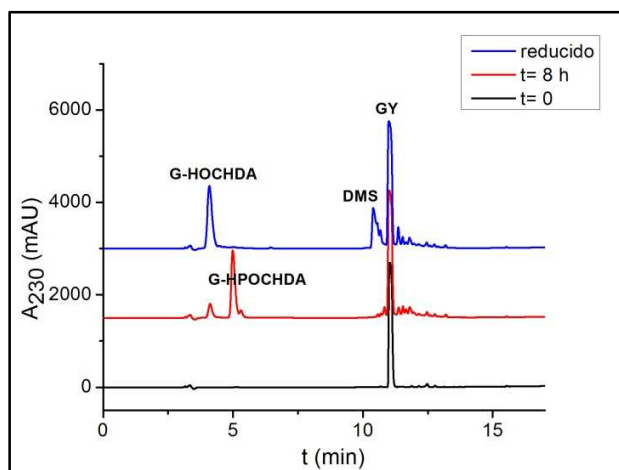


Figura 10. Esquema de síntesis de G-HOCHDA.

Como se detalla en materiales y métodos se probaron diferentes condiciones con el fin de obtener una buena cantidad de producto y alto rendimiento. En una primera instancia, la reacción se realizó en buffer fosfato y se analizaron los productos de las diferentes etapas por HPLC (Fig. 11). A  $t = 0$  se esperaba observar únicamente el dipeptido GY el cual absorbe a  $\lambda = 275$  nm, en el caso de la muestra a  $t = 8$  h, correspondiente a la oxidación se puede observar la presencia de un pico pequeño correspondiente al alcohol generado por hidrólisis, un pico mayor correspondiente al hidroperóxido con absorbancia a  $\lambda = 230$  nm y un remanente del dipéptido. Finalmente para el caso de la muestra reducida se observó que todo el hidroperóxido se convirtió en el alcohol.

La purificación del producto se hizo mediante HPLC, con detección UV con columna semipreparativa y la cuantificación se realizó midiendo la absorbancia de una de las muestras a  $\lambda = 227$  nm. De esta forma se determina la concentración de G-HOCHDA es de  $\approx 180 \mu\text{M}$ . Entonces, si bien esta purificación lograba obtener el producto puro, el mismo se conseguía a baja concentración y en cantidades de microgramos.



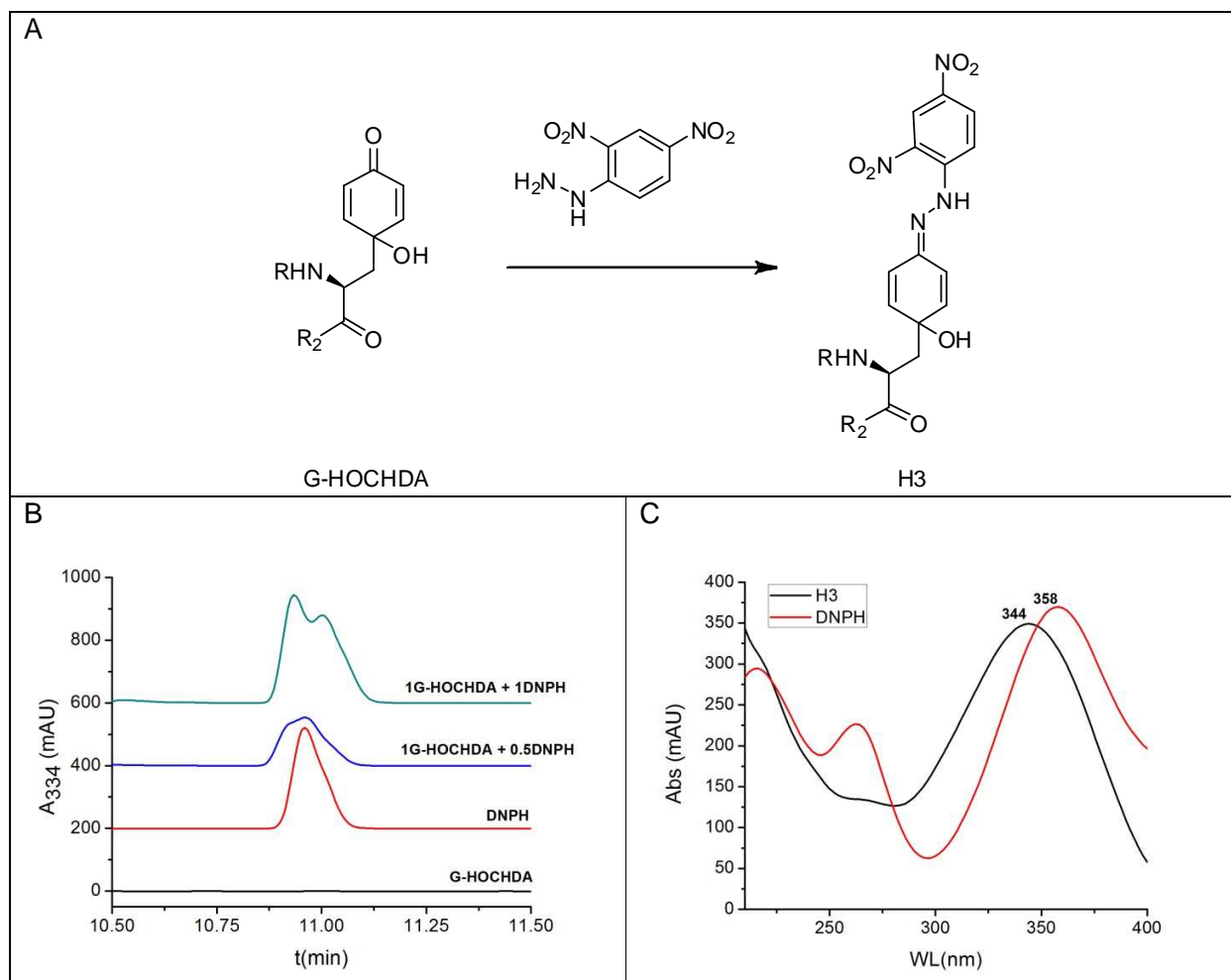
**Figura11.** Cromatograma midiendo a  $\lambda = 230$  nm, de la oxidación de GY a  $t_0$ ,  $t = 8$  h y la posterior reducción con DMS.

Finalmente invirtiendo más tiempo en la optimización tanto de la síntesis como de la purificación se procedió a probar la reacción de síntesis en agua deuterada. Se analizaron las fracciones de cada etapa de síntesis por HPLC, observando un rendimiento de reducción del 100%. La purificación del producto se realizó mediante uso de cartuchos de extracción en fase sólida de C18. Todas las fracciones recolectadas se analizaron por HPLC donde se observó la obtención de un producto puro.

La cuantificación del mismo se hizo midiendo a  $\lambda = 227$  nm,  $\epsilon = 9700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , de esta forma se determinó la concentración de dos fracciones una de 6.5 mM, y otra de 4.3 mM en cantidades de 1 mg, lo que permite realizar varios experimentos.

### 3.2.2- Reacción con DNPH

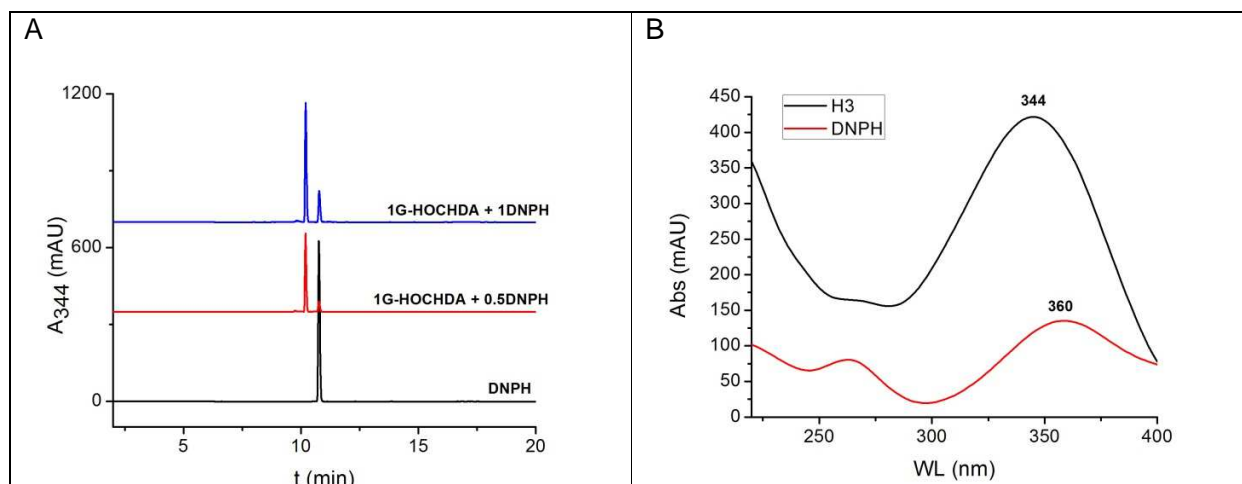
Para la reacción entre G-HOCHDA y DNPH (Fig. 12A) se probaron tres condiciones: en relación equimolar, HOCHDA en exceso y DNPH en exceso. Los productos de reacción fueron analizados por HPLC (Fig. 12B) y los resultados obtenidos evidencian principalmente la formación de un único producto en las tres condiciones propuestas, sin embargo esto se observa de manera más clara en condiciones equimolares y cuando G-HOCHDA se encuentra en exceso, como se muestra en la figura. En las condiciones cromatográficas utilizadas el producto eluye muy cerca del DNPH pero al analizar sus espectros (Fig. 12C) se observa que ambos absorben a diferentes longitudes de onda, el producto formado presenta un máximo de absorbancia a 344 nm, similar al espectro de H1 obtenido en la reacción de la lactona 1, mientras que el máximo de absorbancia de DNPH es a 358 nm.



**Figura12.** A. Esquema de reacción entre el derivado G-HOCHDA y DNP. B. Cromatograma midiendo a  $\lambda = 334$  nm, de G-HOCHDA, DNP y las reacciones en las proporciones indicadas. C. Espectros de absorbancia del producto H3 y de DNP.

A partir de estos resultados nos planteamos optimizar la separación entre el producto observado y el DNP remanente. Con este fin se propuso un cambio en el método de separación por HPLC modificando las fases móviles utilizadas en la cromatografía.

El resultado en esta oportunidad se muestra en la Fig. 13A, donde se puede observar una buena separación de los picos previamente observados en las dos condiciones analizadas anteriormente. El producto eluye de manera más temprana en el tiempo mientras que el DNP eluye después consistente con una mayor polaridad esperada para la hidrazona H3. Al analizar los espectros de cada uno (Fig. 13B) se puede observar que el producto tiene pico máximo de absorción a 344 nm mientras que el segundo pico absorbe a 360 nm al igual que el DNP.



**Figura 13. A.** Cromatograma realizado midiendo a  $\lambda=344$  nm de DNP y productos de reacción en las proporciones indicadas. **B.** Espectros de absorbancia de los dos picos observados en A.

En comparación a los resultados obtenidos con la reacción entre L1 y DNP, en esta oportunidad no se observa la formación de dos productos, ya que aquel derivado de la reacción con el grupo lactona no se estaría formando. Además, se puede decir que el producto formado entre G-HOCHDA y DNP, H3, presenta un espectro similar al producto H1 de la reacción con lactona 1, por lo que podemos decir que el mismo resulta del ataque del DNP al carbonilo del grupo ciclohexadienona de HOCHDA.

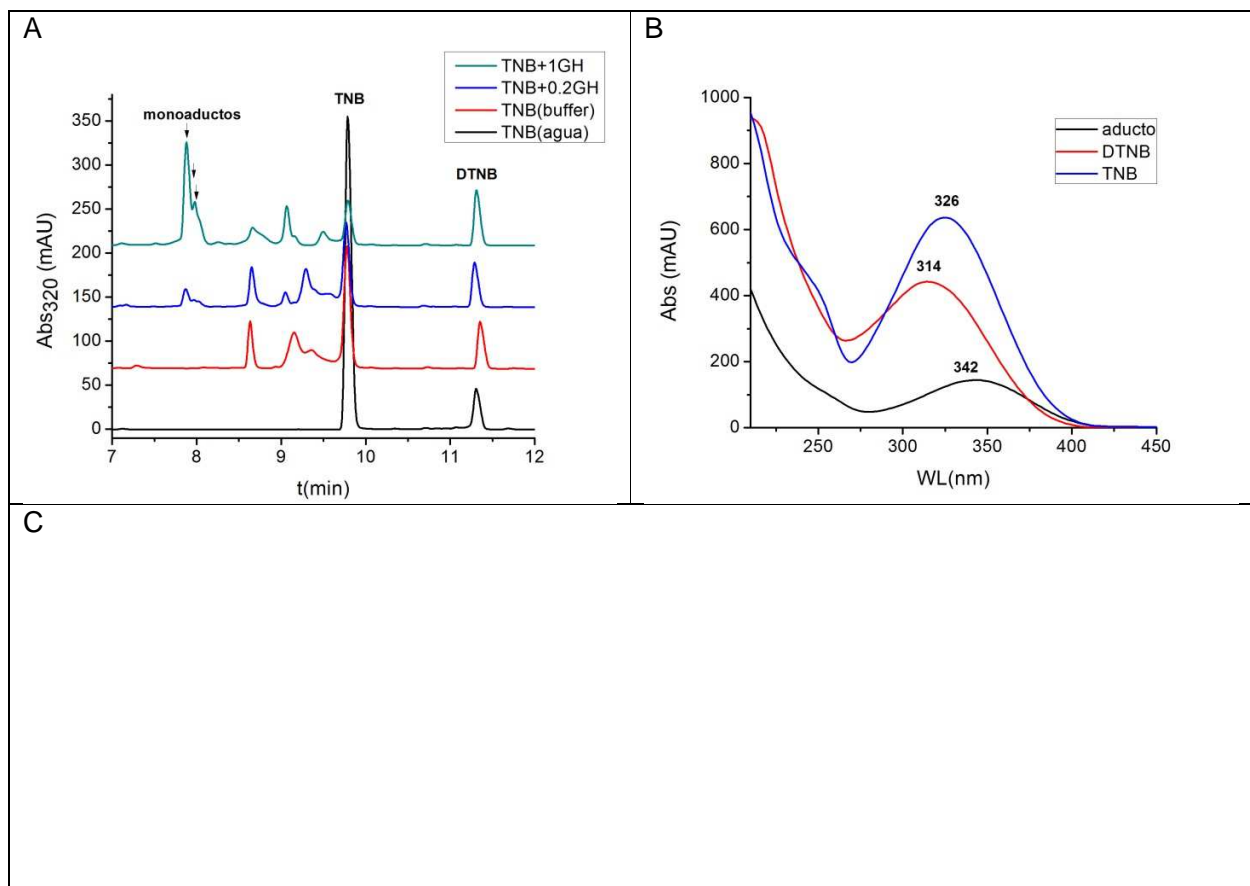
La reacción entre DNP y G-HOCHDA es interesante por varias razones. El DNP se usa para detectar carbonilos en proteínas en un método que puede ser colorimétrico o por inmunoblot (oxyblot, <sup>40</sup>). De hecho se observa el aumento de carbonilos proteicos en envejecimiento y en diferentes patologías, como ser enfermedad de Parkinson, de Alzheimer, artritis reumatoidea, fallo renal crónico, cáncer, diabetes, entre otras<sup>40-42</sup>. La formación de estos carbonilos se atribuye a la oxidación de proteínas por oxidantes fuertes, como ser radical hidroxilo o por complejos oxo-metálicos <sup>43</sup>. Nuestros resultados muestran que una oxidación más suave, por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> o por radicales y superóxido también producen derivados de aminoácidos capaces de reaccionar con DNP. Esto abre la pregunta de cuánto de los productos carbonilos detectados por oxyblot corresponden a HOCHDA relativos a otros productos más avanzados de oxidación.

Los resultados con DNP son interesantes y prometedores y se seguirán explorando en el futuro, pero dada la menor selectividad hacia HOCHDA que los tioles, se decidió priorizar la aplicación de estos últimos para la detección de HOCHDA.

### 3.2.3- Reacción con TNB

La reacción entre TNB y G-HOCHDA se examinó en condiciones equimolares o en exceso de tiol. Los productos obtenidos de la reacción y algunos controles se analizaron por HPLC.

En el análisis de los controles se pudo observar que el TNB se oxidó tanto en su preparación en buffer fosfato como en agua ya que aparece el pico correspondiente al disulfuro, DTNB. Además para el TNB en buffer se evidencia la presencia de contaminación que en agua no se observa atribuyendo la misma como contaminación presente en el buffer (Fig. 14A).



**Figura 14.** **A.** Cromatograma midiendo a  $\lambda = 320$  nm de los controles de TNB y las reacciones según las proporciones indicadas. **B.** Espectros de absorbanza de TNB, DTNB y el monoadducto **C.** Esquema de reacción entre G-HOCHDA y TNB.

El resultado observado para las reacciones (Fig. 14A) muestra que a diferencia de la lactona 1, G-HOCHDA sí forma aductos con TNB. Esto se evidencia por la desaparición de G-HOCHDA y la formación de nuevos picos en el cromatograma que absorben a 320 nm.



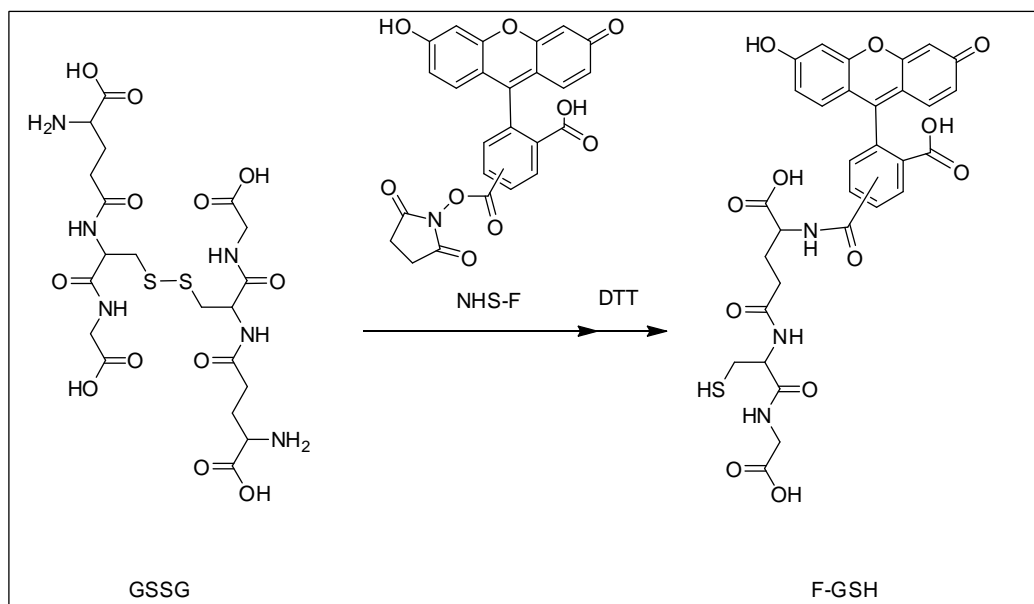
La generación de múltiples productos se da por la formación de centros quirales por la reacción con TNB (Fig. 14C, \*) y la formación de diferentes diastereoisómeros (4 configuraciones para el monoadducto). La cantidad de potenciales productos se duplica para los diadductos. Se pudo evidenciar los picos de los monoadductos de TNB, pero no se evidenció claramente la formación de diadductos.

El uso de TNB como método de detección de derivados HOCHDA sería teóricamente un buen candidato por su capacidad de ataque nucleofílico a los sitios generados a partir de la oxidación. Sin embargo, por su pequeño tamaño presenta baja estereoselectividad pudiendo llevar a la formación de múltiples diastereoisómeros. Además, el cromóforo tiene una absorptividad relativamente baja y sólo absorbe en el UV, una región muy sensible a interferencias por otras moléculas biológicas. Para aumentar significativamente la sensibilidad se decidió probar otro tiol, el glutatión, conjugado a una molécula fluorescente, fluoresceína.

### **3.3- Desarrollo de sonda fluorescente**

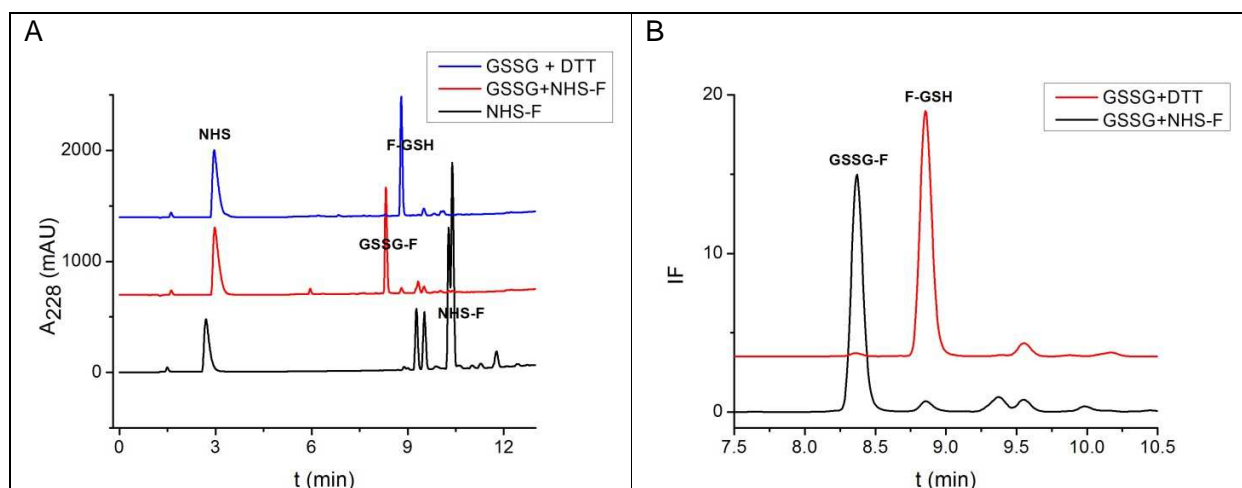
Se espera que un tiol más voluminoso presente mayores restricciones estéricas y sea más estereoselectivo que moléculas más pequeñas. Con este fin se preparó un derivado de glutatión conjugado a un grupo fluorescente, a una fluoresceína, mediante un enlace amida. Aún si no resultan estereoselectivos, serán útiles en el estudio de proteínas oxidadas que contengan electrófilos y más sensibles que el TNB.

En la síntesis de la sonda se hace reaccionar glutatión disulfuro(GSSG) con NHS-F y posteriormente se redujo con DTT (Fig. 15).



**Figura 15.** Esquema de síntesis de la sonda glutatión-fluoresceína (F-GSH).

Los productos de cada etapa de la reacción se analizaron por HPLC, con detección UV-Vis y fluorescencia (Fig. 16). El pico de NHS-F se visualiza a los 10.2 min y los productos de hidrólisis a los 9.2 min. Cuando se agrega GSSG, el pico de NHS-F desaparece rápidamente para dar un pico principal que eluye a 8.3 min. Luego de agregar DTT este pico desaparece y aparece otro de igual intensidad a los 9 min. Este pico corresponde a F-GSH ya que fue verificado por espectrometría de masa. El pico a 8.3 min debe corresponder a GSSG-F.

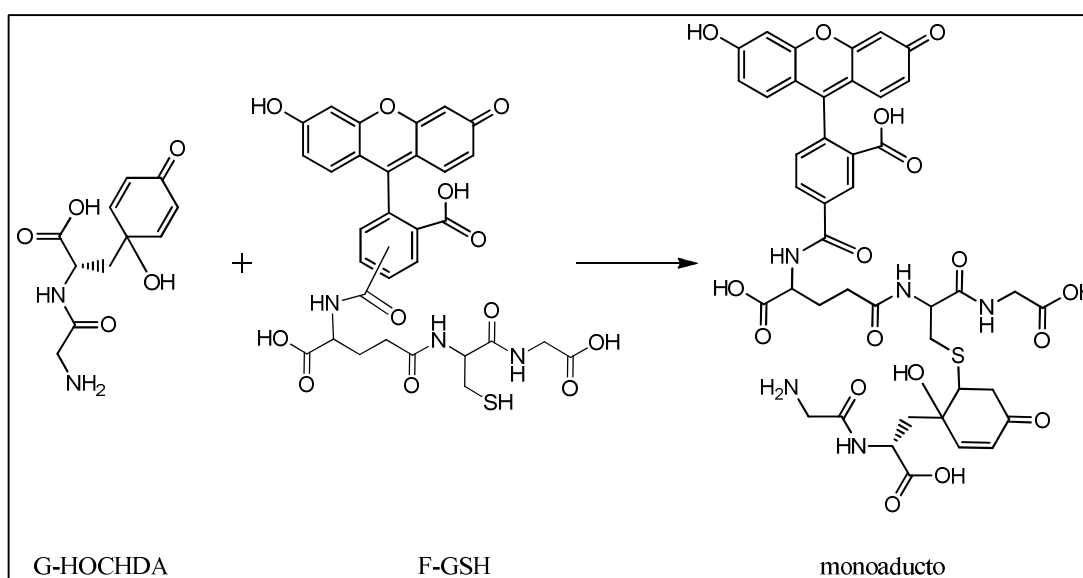


**Figura 16. A.** Cromatograma midiendo a  $\lambda = 228$  nm, de NHS-F y de los productos de cada paso de reacción de síntesis de la sonda. **B.** Fluorescencia de cada uno de los productos de los pasos de reacción,  $\lambda_{exc} = 495$  nm y  $\lambda_{em} = 520$  nm.

Posteriormente se procedió a la purificación de F-GSH con columna semipreparativa y método isocrático. En la misma se obtuvieron 2 picos que presuntamente serían las formas oxidada y reducida del producto. Se les realizó un análisis cromatográfico con columna analítica y gradiente de fase móvil y ambos picos presentaron el mismo tiempo de retención y el mismo espectro con pico máximo de absorbancia a 443 nm, por lo que se considera que los picos podrían corresponder a isómeros ambos reducidos. El NHS-F utilizado es una mezcla de dos isómeros: éster de succinimidilo, 5- (y 6-)carboxifluoresceína (Instrucciones de fabricante).

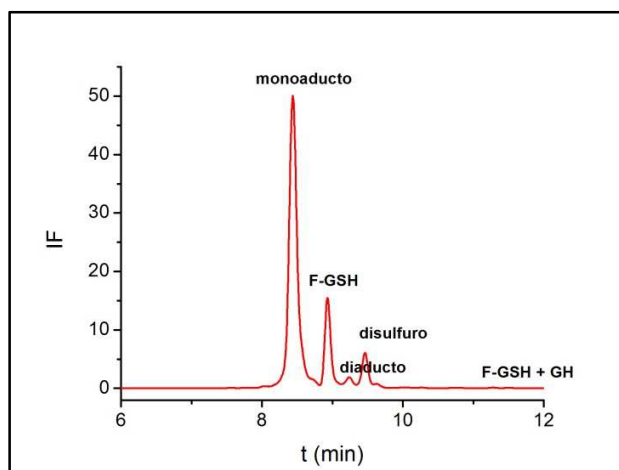
La cuantificación de cada fracción se realizó mediante medición de absorbancia a  $\lambda = 495$  nm, donde NHS-F presenta un  $\epsilon = 70000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . De esta forma se determina la concentración de cada una de las fracciones, 376  $\mu\text{M}$  y 190  $\mu\text{M}$ .

### 3.3.1- Reacción entre F-GSH y G-HOCHDA



**Figura 17.** Esquema de reacción entre G-HOCHDA y la sonda F-GSH.

La reacción entre F-GSH y G-HOCHDA (Fig. 17) se ensayó en diferentes condiciones que se detallan en materiales y métodos, y los productos de la misma fueron analizados por HPLC. Esto permitió distinguir que para ambos isómeros de F-GSH el resultado es el mismo y la única diferencia observable es la intensidad de fluorescencia debida a la diferencia de concentración. Se observó la formación de cuatro picos que absorben a 450 nm (Fig. 18). Basados en el cambio de en intensidades relativas de los diferentes picos, asignamos el pico que eluye a 8.4 min al monoadducto F-GS-G-HOCHDA, el que eluye a 9.2 min al diadducto F-GS-G-HOCHDA-GS-F, y el que eluye a 9.5 al disulfuro ((F-GS)<sub>2</sub>)



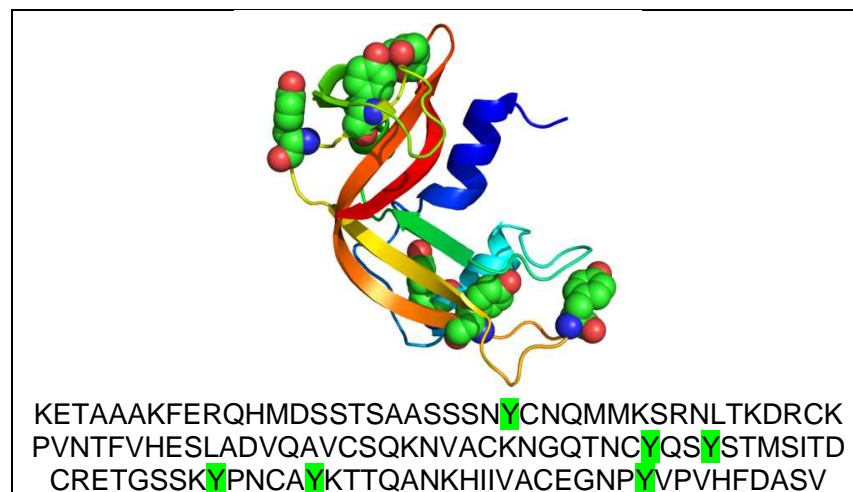
**Figura 18.** Fluorescencia  $\lambda_{ex}$ = 450 nm,  $\lambda_{em}$  520, de la reacción entre la fracción de F-GSH de mayor concentración (376  $\mu$ M) y HOCHDA en exceso.

El desarrollo del reactivo fluorescente para la detección de HOCHDA fue muy productivo ya que resulta en un ensayo con buena sensibilidad y especificidad, resultando en la formación de un único producto al hacerlo reaccionar con el dipéptido G-HOCHDA. En los estudios previos de HOCHDA y HPOCHDA, su cuantificación resultó muy complicada. En los primeros ensayos, Winterbourn *et al.* utilizaron el ensayo FOX para cuantificar HPOCHDA<sup>29</sup>, un ensayo que se sabe que tiene una respuesta variable dependiente de la estructura del hidropéroxido<sup>18</sup>. Luego utilizaron cromatografía líquida acoplada a detección por espectrometría de masa para lograr una cuantificación relativa de HPOCHDA y HOCHDA, pero sin lograr una cuantificación absoluta<sup>37</sup>. Más recientemente Möller *et al.* logró cuantificar los productos por HPLC-UV sintetizando los estándares, pero también se requería una calibración de concentraciones por RMN<sup>27</sup>. Todos estos ensayos son bastante complicados, y pensamos que la sonda fluorescente que desarrollamos va a facilitar de gran manera la detección de HOCHDA (y otros electrófilos) en péptidos y proteínas, ya que en principio solo consiste en una incubación con exceso de sonda. Sin duda se necesitará confirmación de la estructura por espectrometría de masa, pero la fluoresceína provee un buen grupo fluoróforo y cromóforo que facilitará la cuantificación.

La formación de mayoritariamente un monoadducto como producto de la reacción entre F-GSH y G-HOCHDA, y la buena sensibilidad de detección, nos motivaron a usar este sistema para detectar electrófilos en proteínas.

### 3.4- Ribonucleasa A

Uno de los objetivos planteados fue aplicar el método de detección en proteínas y para ello se eligió la Ribonucleasa A como modelo. Es una proteína pequeña de 13.7 kDa y la elección de la misma se basó en su composición aminoacídica. Se destaca principalmente la presencia de 6 Tyr, 4 His y ausencia de Trp (Fig. 19). Estos tres aminoácidos pueden generar electrófilos como productos de la oxidación por  $^1\text{O}_2$ <sup>23, 44-46</sup>. En el caso de la RNasa entonces se espera la formación de residuos electrofílicos mayoritariamente de la tirosina pero también de la histidina.



**Figura 19.** Estructura 3D y secuencia aminoacídica de la RNasa A bovina donde se muestra la posición de las tirosinas.

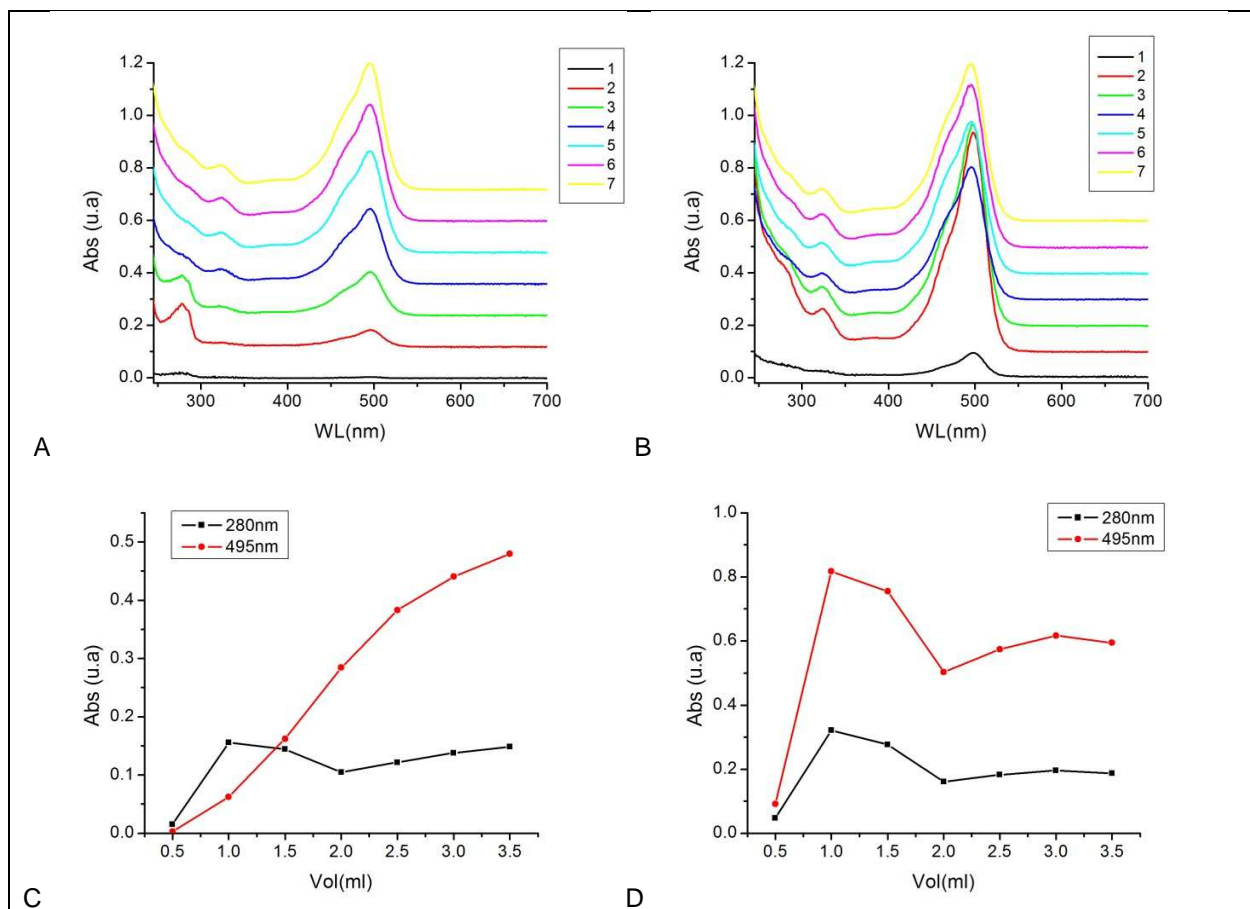
#### 3.4.1- Reacción entre F-GSH y RNasa

En una primera instancia se oxida con  $^1\text{O}_2$  a la RNasa para poder generar derivados electrofílicos en Tyr y probablemente His. Posteriormente se hace reaccionar la RNasa oxidada con la sonda fluorescente (F-GSH) con el fin de que se una a estos derivados y poder detectar dichas modificaciones.

De la reacción entre F-GSH y RNasa nativa y RNasa oxidada se separaron diferentes fracciones (7 fracciones de 0.5 ml cada una) por gel filtración. Dichas fracciones se analizaron mediante espectros de absorbancia y se construyeron los cromatogramas correspondientes (Fig. 20).

En el caso de la RNasa nativa (Fig. 20C) se puede observar que la absorbancia de la proteína dada a 280 nm, eluye primero con un pico de concentración a 1 ml y luego decrece. La sonda, que absorbe a 495 nm eluye luego con un pico a vol > 3.5 ml. Se observa una pequeña

contaminación de sonda fluorescente en la fracción proteica, ya que la columna resuelve pesos moleculares entre 1000-5000 Da reteniendo de manera eficiente aquellas moléculas de  $PM < 1000$  Da. Como la sonda utilizada pesa 665 Da, muy cercano al límite, puede que no se haya retenido bien. Por otro lado, para el caso de la RNasa oxidada (Fig. 20D) se observa que la sonda co-eluye con la proteína, y se observa un pico de Abs a 280 y 495 nm a 1 ml de elución lo que indica una unión covalente entre RNasa oxidada y sonda. Luego decrecen ambas absorbancias hasta 2 ml y vuelve a aumentar Abs a 495 nm por la elución de la sonda libre.



**Figura 20. A.** Espectros de absorbancia de las 7 fracciones colectadas de la purificación de FGS-RNasa nativa **B.** Espectros de absorbancia de las 7 fracciones colectadas de la purificación de FGS-RNasa oxidada **C.** Gráfico de absorbancia vs. volumen de elución a  $\lambda = 280$  y  $495$  nm de la FGS-RNasa nativa **D.** Gráfico de absorbancia vs. volumen de elución a  $\lambda = 280$  y  $495$  nm de la FGS-RNasa oxidada.

Para la aplicación de esta sonda en la detección de HOCHDA a un mayor número de muestras, se comenzó a optimizar el análisis por electroforesis en gel y revelado de fluorescencia. Se realizó el análisis por electroforesis variando las condiciones para mejorar la visualización del aducto de RNasa oxidada con F-GSH. El fin del revelado de los geles de dos maneras

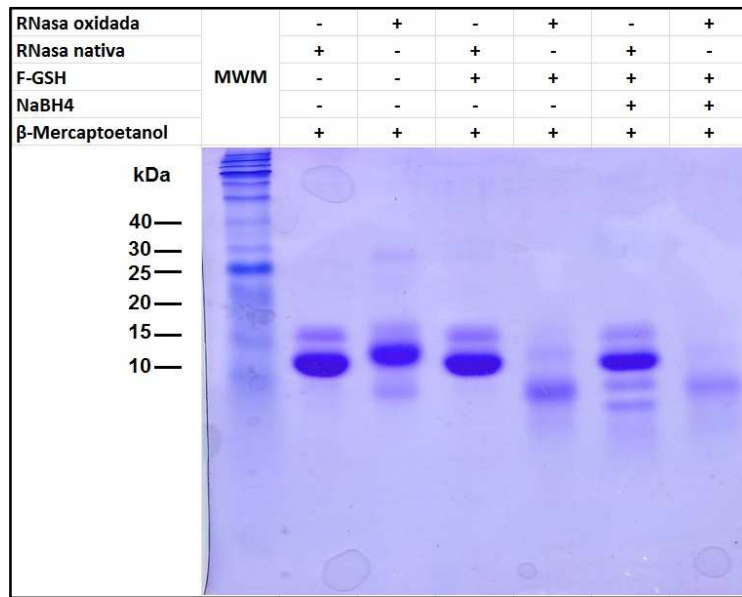
diferentes pretendía lograr por un lado, la visualización de las proteínas presentes en el gel mediante la tinción con Coomassie, mientras que el revelado de fluorescencia muestra únicamente la señal de las muestras en las que se encuentre unida la sonda.

En general, en los geles teñidos con coomassie se observó que la proteína nativa presenta un peso molecular de aproximadamente 10 kDa, similar al peso esperado de 13.7 kDa (Fig. 21). En todos los casos se observa una banda tenue de ~15 kDa por encima de la banda principal, indicando que la ribonucleasa comercial tiene otra proteína contaminante (~5%).

La proteína oxidada con  $^1\text{O}_2$  tiene una movilidad electroforética similar a la nativa y presenta una banda de menor peso molecular que indica que parte de la proteína se fragmenta al ser oxidada con  $^1\text{O}_2$ .

Cuando se agrega la sonda fluorescente, la proteína nativa mantiene el mismo perfil electroforético, mientras que la oxidada aumenta su movilidad electroforética, sugiriendo la unión de la sonda a la proteína oxidada, ya que la sonda aporta 4 cargas negativas que provocaría el aumento de movilidad hacia el polo positivo.

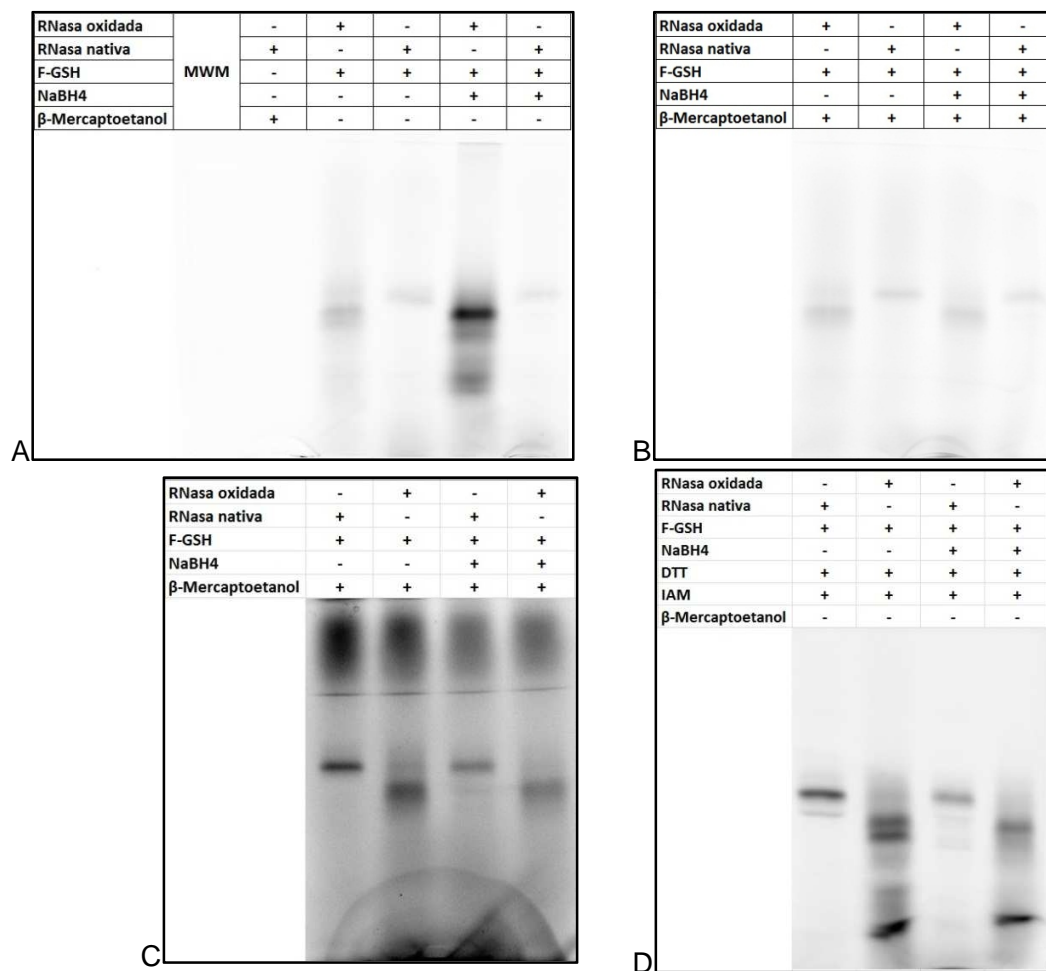
La formación del aducto de Michael es reversible, y la preparación de la muestra tiene un paso de reducción con  $\beta$ -ME a alta temperatura que podría promover el intercambio de tioles y provocar una disminución en la cantidad de sonda unida. La formación de estos aductos ha sido estudiada por *Nagy et al.* quienes han demostrado mediante HPLC y espectroscopía de masa la formación de aductos de Michael entre derivados de oxidación de Tyr en varios péptidos (ej.: Tyr-Gly) con glutatión<sup>37</sup>. Este grupo también ha demostrado que los derivados de tirosinas oxidadas presentes en proteínas, tales como mioglobina e insulina, pueden formar aductos con GSH, siendo esta reacción reversible y requiriendo un paso de reducción para estabilizar el aducto<sup>11, 37</sup>. Por ello se consideró necesario agregar  $\text{NaBH}_4$  para reducir el carbonilo y unir la sonda a la proteína de manera irreversible. En este caso se observa fragmentación de la proteína nativa y disminución de la intensidad de la banda de la oxidada, indicando fragmentación.



**Figura 21.** Gel de poliacrilamida 15% teñido con Coomassie coloidal.

Cuando se estudió la fluorescencia de las proteínas separadas en geles se observó, tal como se esperaba, la ausencia de fluorescencia para el marcador y la proteína nativa sin sonda. Cuando se agrega la sonda ambas proteínas muestran señal, aunque la de la proteína oxidada siempre es mayor que la de la proteína nativa y se cree que ésta última no estaría formando una unión covalente dado que su movilidad electroforética no se ve modificada. En condiciones no reductoras (Fig. 22A) al agregar NaBH<sub>4</sub> se ve un aumento de intensidad en las bandas de la proteína oxidada además de su fragmentación. Una posible causa sería que la muestra tratada con dicho reactivo no se analizó de inmediato, sino que quedó unos días en presencia de sonda. Aunque se conservó a -20°C, se puede haber dado autooxidación de tioles de la proteína y de la sonda que llevasen a la formación de disulfuros mixtos, resultando en el aumento de señal fluorescente para el caso de la proteína oxidada.





**Figura 22.** Geles de poliacrilamida 15% con revelado de fluorescencia por G-box.

Cuando se agregó  $\beta$ -ME (Fig. 22B), no se logró eliminar completamente la señal de la proteína nativa, pero sí disminuyó la señal de la proteína oxidada tratada con  $\text{NaBH}_4$ , indicando que la fuerte señal se debía a la formación de disulfuros mixtos y que siempre se debe realizar este análisis en condiciones reductoras.

Posteriormente se intentó aumentar la señal lavando el gel con buffer bicarbonato de sodio 50 mM, pH 8.5 (Fig. 22C). Si bien se logra aumentar la señal de las proteínas, y se sigue observando que la señal para la proteína oxidada es mayor que para la nativa, también se observa un aumento de la señal en todo el gel, sugiriendo que la sonda F-GSH está reaccionando con acrilamida del gel. Considerando que la señal que se observa en la proteína se puede deber a la formación de disulfuros mixtos entre F-GSH y RNasa, o incluso debido a reacciones de F-GSH con acrilamida del gel, se decidió pre-reducir las muestras con DTT y

luego bloquear los tioles libres con iodoacetamida (IAM) para evitar la re-formación de disulfuros mixtos.

Como se observa en la Fig. 22D, si bien este tratamiento logra disminuir la señal de la proteína nativa mientras que prevalece la señal de la proteína oxidada, no se logra evitar completamente la señal de la proteína nativa. Además aparecen bandas altamente fluorescentes de muy bajo peso molecular que todavía no hemos identificado.

La señal fluorescente que se observa en la proteína nativa no parece deberse a una interacción covalente entre sonda y proteína, ya que no se observan cambios en la movilidad electroforética de la proteína. Estas señales parecen deberse al exceso de sonda libre, por lo que se plantea en el futuro optimizar la separación del exceso de sonda libre de la proteína antes de realizar el gel. Para facilitar el tratamiento de muchas muestras a la vez nos proponemos explorar precipitación de la proteína por solventes, como acetona o metanol. Esperamos de esta manera disminuir aún más la señal de la proteína nativa, idealmente a cero.

Nuestro método pretende lograr la detección de modificaciones oxidativas en un amplio número de muestras mediante el análisis por gel de electroforesis y revelado de fluorescencia. Por su parte, *Das et al.* han analizado la formación de aductos entre insulina tratada con superóxido y GSH. En su método digieren la proteína con un sistema enzimático y el análisis lo hacen por espectrometría de masa, pudiendo obtener detalle de la localización del residuo modificado <sup>11</sup>. Sin embargo, esta metodología resulta compleja, costosa y complica la cuantificación. Nuestro procedimiento, en cambio, resulta mucho más ameno, más robusto y probablemente con una sensibilidad similar. Eventualmente también se podrían obtener datos de localización de los residuos modificados por espectrometría de masa.

## 4- Conclusiones

La oxidación de tirosina por  $^1\text{O}_2$  lleva a la formación de derivados electrofílicos que luego de un paso de reducción forman hidroxi-oxociclohexadienona (HOCHDA). Este derivado fue generado en una primera instancia en N-Boc tirosina, la cual se oxidó a su lactona correspondiente. Ésta nos permitía trabajar con grandes cantidades de producto y dado a la presencia del grupo ciclohexadienona pretendíamos fuese representativo de HOCHDA. Las reacciones de lactona 1 tanto con DNPH como con TNB mostraron que si bien el grupo ciclohexadienona participa de las reacciones también se daban reacciones particulares del grupo lactona, por lo que este modelo se descartó.

Por otro lado se generó el derivado HOCHDA en el dipéptido GY en cantidades suficientes para desarrollar varios ensayos. Al hacer reaccionar G-HOCHDA con TNB se pudo detectar la formación de diastereoisómeros de monoadductos lo que complica utilizar esta reacción con fines analíticos pero podría usarse para la detección de la modificación en proteínas. La formación de un solo producto entre G-HOCHDA y DNPH sugiere que también podría usarse DNPH con fines cualitativos, aunque habría que tener presente la capacidad de DNPH de reaccionar con otros carbonilos generados por oxidación en proteínas (catalizada por metales).

El problema con estos reactivos es la baja sensibilidad con la que permitían la detección por lo que nos propusimos desarrollar un reactivo fluorescente, una sonda que consiste en la unión de un glutatión a una fluoresceína (F-GSH) mediante un enlace amida. Dicha sonda, al presentar mayor coeficiente de absorción, aumentó la sensibilidad para la detección de HOCHDA. Cuando se hizo reaccionar con G-HOCHDA se comprobó por HPLC la formación de un producto mayoritario correspondiente al monoadducto: F-GS-G-HOCHDA. Esto nos motivó a probar la reacción entre la sonda y RNasa para la visualización directa de residuos electrofílicos utilizando gel de electroforesis y escáner de fluorescencia. Tanto la proteína oxidada como la nativa mostraron señal fluorescente, aunque la de la oxidada en todas las condiciones fue de mayor intensidad. Los resultados obtenidos sugieren que la RNasa oxidada se estaría uniendo de manera covalente a F-GSH, mientras que la señal de la nativa se estima se deba a un exceso de sonda libre que no hemos logrado separar.

Como proyecciones nos hemos planteado optimizar la detección de residuos electrofílicos generados por oxidación en proteínas mediante el uso de la sonda generada, ya sea mejorando el proceso de separación de la RNasa del exceso de sonda, o por la selección de otra proteína de mayor tamaño que facilite dicha separación.

## Bibliografía

- [1] Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine: Oxford University Press, 2003.
- [2] Alvarez S, Evelson P, Boveris A: Free Radical Pathophysiology. Kerala, India: Transworld Research Network, 2008.
- [3] Radi R: Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101:4003-8.
- [4] Moller MN, Lancaster JR, Jr., Denicola A: The interaction of reactive oxygen and nitrogen species with membranes. *Curr Top Membr* 2008:23-42.
- [5] Signorelli S, Moller MN, Coitino EL, Denicola A: Nitrogen dioxide solubility and permeation in lipid membranes. *Archives of biochemistry and biophysics* 2011, 512:190-6.
- [6] Kalyanaraman B: Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology* 2013, 1:244-57.
- [7] Moller MN, Li Q, Lancaster JR, Jr., Denicola A: Acceleration of nitric oxide autoxidation and nitrosation by membranes. *IUBMB life* 2007, 59:243-8.
- [8] Moller MN, Botti H, Batthyany C, Rubbo H, Radi R, Denicola A: Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280:8850-4.
- [9] Ferrer-Sueta G, Radi R: Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS chemical biology* 2009, 4:161-77.
- [10] Radi R: Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res* 2013, 46:550-9.
- [11] Das AB, Nauser T, Koppenol WH, Kettle AJ, Winterbourn CC, Nagy P: Rapid reaction of superoxide with insulin-tyrosyl radicals to generate a hydroperoxide with subsequent glutathione addition. *Free radical biology & medicine* 2014, 70:86-95.
- [12] Halliwell B, Gutteridge JM: Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS letters* 1992, 307:108-12.
- [13] Folkes LK, Candeias LP, Wardman P: Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Archives of biochemistry and biophysics* 1995, 323:120-6.
- [14] Davies MJ: Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical research communications* 2003, 305:761-70.
- [15] Gracanin M, Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ: Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free radical biology & medicine* 2009, 47:92-102.
- [16] Ronsein GE, Bof de Oliveira MC, Gennari de Madeiros MH, Di Mascio P: Characterization of 1O<sub>2</sub>-derived oxidation products of tryptophan: a combination in tandem mass spectrometry analyses and isotopic labeling studies. *Journal of the American Chemical Society* 2009, 131:188-97.
- [17] Davies MJ: Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2004, 3:17-25.
- [18] Michalski R, Zielonka J, Gapys E, Marcinek A, Joseph J, Kalyanaraman B: Real-time measurements of amino acid and protein hydroperoxides using coumarin boronic acid. *The Journal of biological chemistry* 2014, 289:22536-53.
- [19] Rahmanto AS, Morgan PE, Hawkins CL, Davies MJ: Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides. *Free radical biology & medicine* 2010, 48:1071-8.
- [20] Hawkins CL, Davies MJ: Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et biophysica acta* 2001, 1504:196-219.

- [21] Ronsein GE, Oliveira MC, Miyamoto S, Medeiros MH, Di Mascio P: Tryptophan oxidation by singlet molecular oxygen [O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>)]: mechanistic studies using <sup>18</sup>O-labeled hydroperoxides, mass spectrometry, and light emission measurements. *Chemical research in toxicology* 2008, 21:1271-83.
- [22] Walrant P, Santus R: N-formyl-kynurenine, a tryptophan photooxidation product, as a photodynamic sensitizer. *Photochem Photobiol* 1974, 19:411-7.
- [23] Agon VV, Bubb WA, Wright A, Hawkins CL, Davis MJ: Sensitizer-mediated photooxidation of histidine residues: Evidence for the formation of reactive side-chain peroxides. *Free radical biology & medicine* 2006, 40:698-710.
- [24] Sysak PK, Foote CS, Ching T: Chemistry of singlet oxygen-XXV. Photooxygenation of methionine. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 1977, 26:19-27.
- [25] Pattison DI, Rahmanto AS, Davies MJ: Photo-oxidation of proteins. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2012, 11:38-53.
- [26] Murray RM, Jindal SL: The photosensitized oxidation of disulfides related to cystine. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 1972, 16:147-51.
- [27] Moller MN, Hatch DM, Kim HY, Porter NA: Superoxide reaction with tyrosyl radicals generates para-hydroperoxy and para-hydroxy derivatives of tyrosine. *Journal of the American Chemical Society* 2012, 134:16773-80.
- [28] Wright A, Bubb WA, Hawkins CL, Davies MJ: Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochem Photobiol* 2002, 76:35-46.
- [29] Winterbourn CC, Parsons-Mair HN, Gebicki S, Gebicki JM, Davies MJ: Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides. *The Biochemical journal* 2004, 381:241-8.
- [30] Hunter EP, Desrosiers MF, Simic MG: The effect of oxygen, antioxidants, and superoxide radical on tyrosine phenoxyl radical dimerization. *Free radical biology & medicine* 1989, 6:581-5.
- [31] Aeschbach R, Amado R, Neukom H: Formation of dityrosine cross-links in proteins by oxidation of tyrosine residues. *Biochimica et biophysica acta* 1976, 439:292-301.
- [32] DiMarco T, Giulivi C: Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples. *Mass Spectrom Rev* 2007, 26:108-20.
- [33] Bartesaghi S, Wenzel J, Trujillo M, Lopez M, Joseph J, Kalyanaraman B, Radi R: Lipid peroxy radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes. *Chemical research in toxicology* 2010, 23:821-35.
- [34] Field SM, Villamena FA: Theoretical and experimental studies of tyrosyl hydroperoxide formation in the presence of H-bond donors. *Chemical research in toxicology* 2008, 21:1923-32.
- [35] Marumo K, Waite JH: Optimization of hydroxylation of tyrosine and tyrosine-containing peptides by mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys* 1986, 872:98-103.
- [36] Shchepin R, Moller MN, Kim HY, Hatch DM, Bartesaghi S, Kalyanaraman B, Radi R, Porter NA: Tyrosine-lipid peroxide adducts from radical termination: para coupling and intramolecular Diels-Alder cyclization. *Journal of the American Chemical Society* 2010, 132:17490-500.
- [37] Nagy P, Lechte TP, Das AB, Winterbourn CC: Conjugation of glutathione to oxidized tyrosine residues in peptides and proteins. *The Journal of biological chemistry* 2012, 287:26068-76.
- [38] Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues JV, Marcos JC: Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical biochemistry* 2014, 458:69-71.
- [39] Riener CK, Kada G, Gruber HJ: Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2002, 373:266-76.

- [40] Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2003, 329:23-38.
- [41] Beltran Valls MR, Wilkinson DJ, Narici MV, Smith K, Phillips BE, Caporossi D, Atherton PJ: Protein carbonylation and heat shock proteins in human skeletal muscle: relationships to age and sarcopenia. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2015, 70:174-81.
- [42] Oikawa S, Kobayashi H, Kitamura Y, Zhu H, Obata K, Minabe Y, Dazortsava M, Ohashi K, Tada-Oikawa S, Takahashi H, Yata K, Murata M, Yamashima T: Proteomic analysis of carbonylated proteins in the monkey substantia nigra after ischemia-reperfusion. *Free radical research* 2014, 48:694-705.
- [43] Berlett BS, Levine RL, Stadtman ER: Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95:2784-9.
- [44] Shen HR, Spikes JD, Kopeckova P, Kopecek J: Photodynamic crosslinking of proteins. II. Photocrosslinking of a model protein-ribonuclease A. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 1996, 35:213-9.
- [45] Shen HR, Spikes JD, Smith CJ, Kopecek J: Photodynamic cross-linking of proteins IV. Nature of the His-His bond(s) formed in the rose bengal-photosensitized cross-linking of N-benzoyl-L-histidine. *J Photochem Photobiol A* 2000, 130:1-6.
- [46] Verweij H, van Steveninck J: Model studies on photodynamic cross-linking. *Photochem Photobiol* 1982, 35:265-7.