

Tesis Doctorado en Química PEDECIBA Química

Q.F. Natalia Ruth Rios Cresseri



Síntesis y caracterización de compuestos boronados diseñados como sondas para la detección y cuantificación de peroxinitrito

**Directores de Tesis: Dra. Gloria V. López y Dr. Rafael Radi
Ex. Director Dr. Gonzalo Peluffo.**

Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO) Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República.

Montevideo, 2020



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

A mis padres, a Gastón y a Máximo.

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	3
1. Evolución y comienzos de la biología redox aeróbica.....	3
2. Química biológica del oxígeno y especies derivadas.....	4
2.1 Especies derivadas del oxígeno	
<i>Productos de reducción</i>	6
• Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$).....	6
• Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2).....	8
• Radical hidroxilo ($\cdot OH$).....	9
<i>Otras especies derivadas</i>	
• Ácido hipocloroso (HOCl).....	10
3. Especies Reactivas del Nitrógeno.....	10
<i>Óxido nítrico ($\cdot NO$)</i>	11
• Propiedades fisicoquímicas y reactividad.....	11
• Bioquímica y acciones biológicas.....	11
• Producción biológica de $\cdot NO$	12
<i>Dióxido de nitrógeno ($\cdot NO_2$)</i>	14
<i>Peroxinitrito ($ONOO^-/ONOOH$)</i>	14
• Química del peroxinitrito.....	14
• Primeros reportes en el campo de la biología.....	17
• Generación endógena.....	17
• Reactividad en sistemas biológicos.....	18
Nitración de proteínas.....	19
Otras modificaciones oxidativas.....	20
4. Estrés Oxidativo y Nitroxidativo.....	21
5. Detección de peroxinitrito.....	21
<i>Desafíos en la detección de peroxinitrito</i>	22
<i>Métodos de detección de peroxinitrito</i>	22
<i>Sondas fluorescentes para la detección de peroxinitrito</i>	23
• Sondas redox.....	24
• Sondas electrofílicas.....	25
<i>Boronatos: ácidos y ésteres borónicos</i>	26

6. Sistemas detoxificantes no enzimáticos de peroxinitrito.....	29
7. Antioxidantes lipofílicos: Tocoferoles.....	30

Objetivos.....	34
-----------------------	-----------

Capítulo 1: Desarrollo de sondas fluorescentes para la detección de peroxinitrito.....	35
---	-----------

Parte 1. Derivados de cumarina

1.1 CBA, CBE y modificaciones estructurales.....	36
• Introducción y estrategia experimental.....	36
• Resultados y Discusión.....	37
• Conclusiones parciales.....	42
• Modificaciones estructurales de CBE.....	43
• Resultados y Discusión.....	44
• Conclusiones parciales.....	52
• Materiales y Métodos.....	54
1.2 Derivados de CBE dirigidos a la mitocondria con mejoras en las propiedades espectroscópicas: MitoCT.....	60
• Introducción y estrategia experimental.....	60
• Resultados y discusión.....	61
• Conclusiones parciales.....	69
• Materiales y Métodos.....	71

Parte 2. Derivados de fluoresceína

2.1 Fluoresceína-boronato (FI-B).....	79
• Introducción y estrategia experimental.....	79
• Resultados y discusión.....	81
• Conclusiones parciales.....	101
• Materiales y Métodos.....	104
2.2 Otras aplicaciones de FI-B: detección de hidroperóxidos.....	110
• Introducción y estrategia experimental.....	110
• Resultados y discusión.....	111
• Conclusiones parciales.....	122
• Materiales y Métodos.....	122
2.3 Validación de la sonda comercial MitoPY1 para la detección de peroxinitrito.....	124
• Introducción y estrategia experimental.....	124

- Resultados y discusión.....125
- Conclusiones parciales.....131
- Materiales y Métodos.....132

Capítulo 2: Origen de los átomos de oxígeno en los productos de oxidación de sondas boronadas.....134

- Introducción y estrategia experimental.....135
- Resultados y discusión.....138
- Conclusiones parciales.....147
- Materiales y Métodos.....149

Capítulo 3: Diseño y síntesis de nuevos boronatos derivados de tocoferoles y análogos para la modulación del daño nitrooxidativo.....152

- Introducción y estrategia experimental.....153
- Resultados y discusión.....154
- Conclusiones parciales.....159
- Materiales y Métodos.....159

Conclusiones generales y Perspectivas.....166

Publicaciones.....168

Colaboraciones.....171

Agradecimientos.....172

Abreviaturas.....174

Referencias.....177

Resumen

Este trabajo de Tesis Doctoral se centró en el desarrollo de sondas moleculares fluorescentes como herramientas para la detección y cuantificación de peroxinitrito en sistemas celulares. Dada la relevancia del desarrollo de técnicas sensibles y confiables para la detección de especies oxidantes en sistemas biológicos, en este período se trabajó intensamente en la obtención y validación de sondas fluorescentes para la detección de especies nucleofílicas, en particular peroxinitrito.

Analizando el estado del arte sobre métodos de detección y cuantificación de peroxinitrito, donde la inmensa mayoría de sondas reportadas carecen de la apropiada validación fisicoquímica y biológica, principalmente respecto al peroxinitrito producido endógenamente, y además la alta demanda del área redox en la necesidad de contar con métodos sensibles, conocidos y confiables es que se enfocó la presente Tesis en el estudio de este tema.

En el desarrollo del trabajo se exploraron diferentes fluoróforos derivados de fluoresceína y de cumarina soportando ácidos o ésteres borónicos como centro electrofílico capaz de reaccionar con oxidantes nucleofílicos. Además, modificaciones estructurales de los derivados boronados de cumarinas, permitieron modular sus propiedades espectroscópicas e incluso direccionarlas a un sitio subcelular específico, desarrollando nuevas moléculas para la detección de este oxidante.

Se desarrolló FI-B (fluoresceína-boronato) y mediante su caracterización *in vitro*, análisis cinéticos, ensayos de citotoxicidad y evaluación en sistemas celulares, se validó a FI-B como una sonda sensible para la detección directa de peroxinitrito producido endógenamente. Además, los datos obtenidos permitieron estimar el flujo intracelular de peroxinitrito en células endoteliales normales, y en un modelo de parásitos internalizados por macrófagos.

Estos estudios fueron punto de partida para colaborar tanto con los integrantes de nuestro grupo de investigación, como con otros grupos de investigación nacionales y extranjeros. Estas investigaciones utilizaron a FI-B aquí desarrollada, como herramienta para el entendimiento de los mecanismos moleculares y celulares en el desarrollo de patologías relacionadas con el estrés nitroxidativo generando un gran avance para el área redox.

Se realizó un estudio mecanístico con oxidantes marcados isotópicamente para completar la elucidación del mecanismo de reacción de boronatos con oxidantes de relevancia biológica. Como resultado se demostró inequívocamente el origen de los átomos de oxígeno en los productos formados. En este contexto, fue posible producir oxidantes marcados isotópicamente como radical superóxido ($^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxinitrito marcado ($^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$), y peroximonocarbonato marcado ($\text{HC}^{16}\text{O}_2^{18}\text{O}_2^-$). Se demostró por primera vez de forma directa que la formación de 2-hidroxi-etidio (2-OH-E⁺) a partir de la sonda hidroetidio (HE) ampliamente utilizada para la detección de superóxido, implica la incorporación de un átomo de oxígeno proveniente del $^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$. También se demostró que la oxidación de boronatos por $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ o $^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$ se acompaña de la incorporación de átomos de oxígeno provenientes de estos oxidantes, y no del medio de reacción. La incorporación de átomos de oxígeno provenientes del oxidante elimina cualquier tipo de ambigüedad sobre la identidad de la especie que se va a detectar. Conocer el mecanismo de reacción completo de las sondas reporteras con analitos

específicos, es crucial para un correcto y riguroso entendimiento del sistema en estudio tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por último, se trabajó en el diseño de una nueva clase de compuestos con una mejor capacidad antioxidante que actúen previniendo o modulando el daño nitrooxidativo, permitiendo el estudio y tratamiento de disfunciones redox. En este sentido, se desarrollaron nuevos compuestos basados en sustitución borónica derivados de tocoferoles para la detoxificación de peroxinitrito.

Introducción

1. Evolución y comienzos de la biología redox aeróbica

Todas las plantas y animales requerimos oxígeno molecular (O_2) para una eficiente producción de energía, con excepción de aquellos organismos que se encuentran especialmente adaptados para vivir en condiciones anaeróbicas.

Sin embargo, esto no siempre fue así. Temprano en la historia de la Tierra, aunque el oxígeno era uno de los elementos más abundantes en el planeta, prácticamente todo el oxígeno se encontraba unido en compuestos, principalmente formando agua y rocas de silicato, por lo que prácticamente no había oxígeno libre (1).

El O_2 libre apareció en cantidades significativas en la atmósfera terrestre hace más de 2.200 millones de años, en gran parte debido a la evolución de la fotosíntesis oxigénica por cianobacterias unicelulares. Esto provocó uno de los cambios más drásticos en la historia de la vida en la Tierra: al liberar oxígeno como subproducto del proceso de fotosíntesis, se modificó la composición de la atmósfera primitiva, y de esta forma se define el camino por el cual evolucionarían los seres vivos complejos: la vida aeróbica. La atmósfera terrestre comenzó a enriquecerse en oxígeno hasta entonces ausente. El oxígeno liberado tardó más de 1000 millones de años en acumularse, ya que al principio reaccionaba con el hierro presente en los mares y con gases de origen volcánico (1).

El aumento del O_2 atmosférico fue ventajoso en al menos dos formas (2); condujo a la formación de la capa de ozono (O_3) en la estratósfera que protege a los organismos vivos de la radiación UV-C (que pudo haber ayudado a los organismos a abandonar el mar y colonizar la tierra), y eliminó el hierro ferroso (Fe^{+2}) en ambientes acuosos formando complejos insolubles de hierro férrico (Fe^{+3}), los que precipitan en solución como Fe_2O_3 (s), dejando sólo trazas de hierro soluble en mares y ríos. Esta especie de Fe^{+2} reacciona con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para producir radical hidroxilo ($\cdot OH$) altamente reactivo y de gran toxicidad (2). Esta reacción llamada reacción de Fenton será descrita en la Secciones siguientes.

La aparición del oxígeno en un mundo anaeróbico trajo problemas para los organismos entonces existentes, además los subproductos del metabolismo del oxígeno eran sustancias tóxicas, por lo que debieron desarrollar mecanismos contra éstos. Muchos anaerobios murieron, mientras otros organismos desarrollaron defensas antioxidantes para protegerse contra la toxicidad del O_2 . Una de las primeras pudo haber sido el desarrollo de proteínas que unen hierro para proteger el ADN contra la reacción de Fenton (3).

El desarrollo de sistemas antioxidantes fue un camino ventajoso para los organismos, aquellos que toleraron el O_2 podrían evolucionar aún más y usarlo para transformaciones metabólicas, evolucionando a vías metabólicas mucho más eficientes y complejas que las anaeróbicas. La respiración aeróbica es un proceso mucho más rápido y eficiente en la obtención de energía, donde el O_2 participa en la cadena de transporte de electrones como el aceptador final, que la fermentación anaeróbica (4).

Este cambio en el metabolismo aeróbico aumentó el rendimiento en la producción de ATP más de 15 veces (4). La evolución en la producción más eficiente de energía permitió el desarrollo de organismos multicelulares complejos. Por lo tanto, los organismos aerobios, evolucionaron de manera de poder utilizar el gran potencial del

O_2 para su propio beneficio. Sin embargo, la utilización de la respiración los llevó conjuntamente a desarrollar sistemas de protección contra la oxidación de componentes celulares, resultando inevitablemente de los subproductos del O_2 .

El hecho de que los organismos aerobios necesiten de O_2 para sobrevivir, pero deban constantemente protegerse de su toxicidad se conoce frecuentemente como *la paradoja del oxígeno* (5).

El oxígeno permitió la evolución de metabolismos más eficientes, condicionando la evolución de la vida en una dirección que condujo al origen de los eucariotas, es decir al linaje celular que más tarde daría lugar a seres tan complejos como las plantas y los animales.

2. Química biológica del oxígeno y especies derivadas

A mediados del siglo XVII los científicos reconocieron que el aire contenía un compuesto asociado con la combustión y la respiración. Este componente fue aislado en forma gaseosa por primera vez en 1774 por Joseph Priestley, científico y teólogo inglés, quien descubre el O_2 (g), y reconoce su papel fundamental para los organismos vivos.

Antoine Lavoisier, químico, biólogo y economista francés, considerado el padre de la química moderna, dio posteriormente el nombre al elemento *Oxígeno*, que significa “formador de ácidos”. En la época en que se le dio esa denominación se creía, erróneamente, que todos los ácidos requerían oxígeno en su composición.(6)

El oxígeno tiene dos alótropos, O_2 y O_3 . El trioxígeno (O_3) se conoce habitualmente como ozono. Este se produce en la atmósfera superior cuando el O_2 se combina con el oxígeno atómico a causa de la escisión del O_2 por la radiación ultravioleta.

El oxígeno que encontramos en la naturaleza se compone de tres isótopos estables: ^{16}O , ^{17}O y ^{18}O , de los cuales el ^{16}O es el más abundante (99.762 % de abundancia natural), ^{17}O (0.038 % de abundancia natural) y ^{18}O (0.2 % de abundancia natural). (7)

La configuración electrónica del oxígeno atómico es $[He]2s^22p^4$. El oxígeno molecular O_2 es un birradical, una molécula con dos electrones desapareados con spines paralelos, llamado estado triplete (3O_2), (Figura 1). Esto le da la característica de paramagnético al O_2 . El O_2 basal en estado triplete puede excitarse, por ejemplo, fotoquímicamente haciendo que los e^- desapareados pasen a encontrarse en el mismo orbital. La especie energéticamente excitada del oxígeno se conoce como oxígeno singulete (1O_2). El oxígeno singulete tiene spin neto cero (todos están apareados) y no es paramagnético, (Figura 1). Este derivado de O_2 es muy reactivo, debido a que posee un orbital desocupado. Puede ser formado por transferencia de energía de cromóforos excitados, tanto exógenos como endógenos (8).

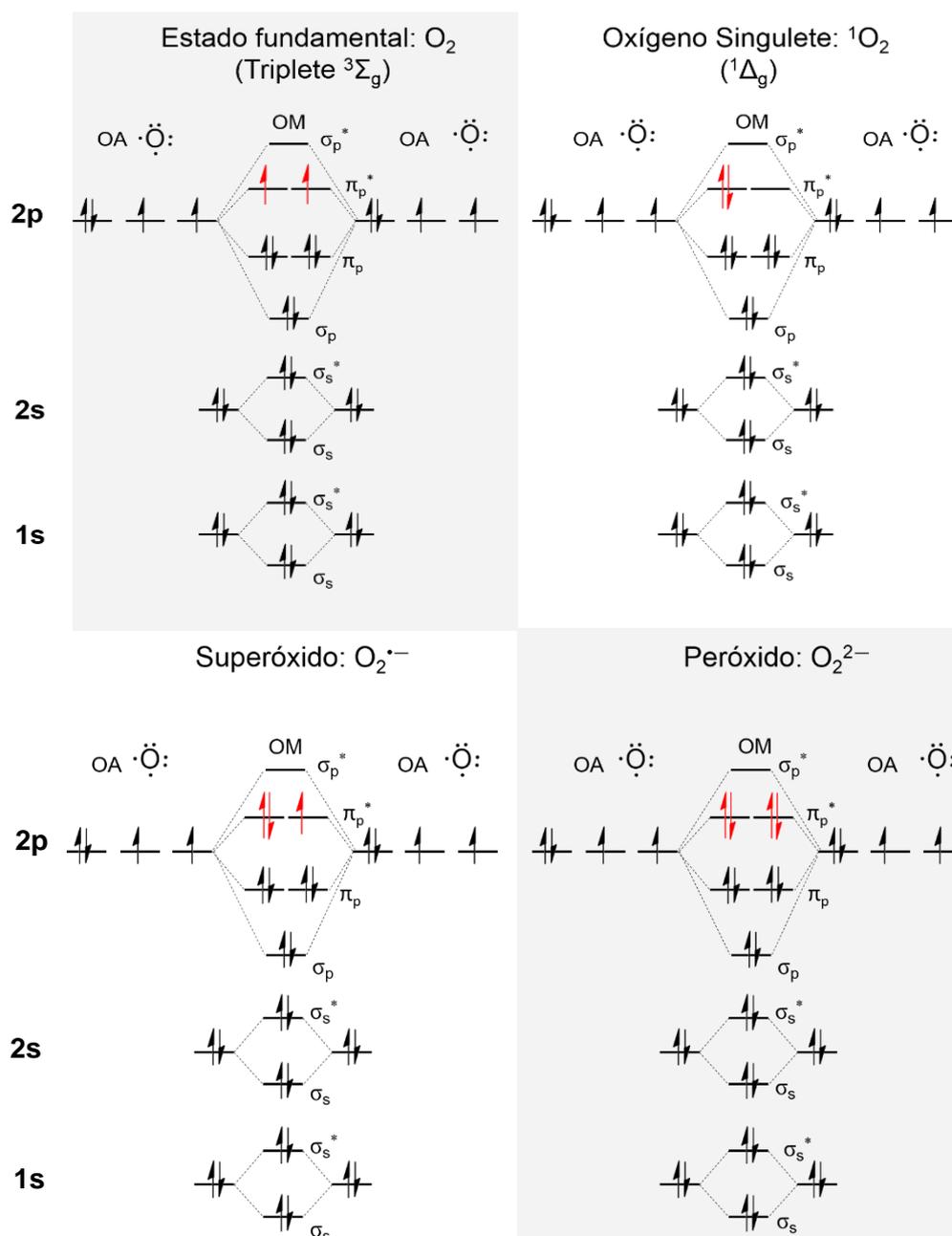
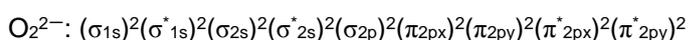
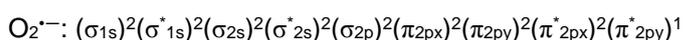
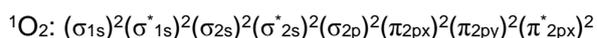
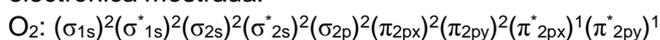


Figura 1. Distribución electrónica del oxígeno molecular en su estado fundamental (O₂) y sus especies derivadas, oxígeno singlete (¹O₂), radical superóxido (O₂^{•-}), y anión peróxido (O₂²⁻). La combinación de Orbitales Atómicos (OA) de dos átomos de oxígeno, da lugar a Orbitales Moleculares (OM) del O₂. La teoría de los Orbitales Moleculares (OM) describe la configuración electrónica mostrada:



El O_2 es esencial para la vida de los organismos aerobios. Como elemento se encuentra en combinación con otros en una amplia variedad de compuestos, y constituye el 89% del agua en masa (como H_2O), y el 20.9% del aire en volumen (como $O_2(g)$). (1)

A la temperatura corporal el oxígeno es relativamente inerte debido a una elevada energía de activación para las reacciones de oxidación. Las reacciones metabólicas tienen lugar a la temperatura corporal, bastante por debajo de la temperatura necesaria para activar el oxígeno libre. En las reacciones redox biológicas en las que participa el O_2 , este debe activarse, generalmente mediante iones metálicos como el hierro y el cobre; estos metales tienen electrones desapareados y forman complejos oxometálicos. Todas las enzimas que utilizan el O_2 *in vivo* son metaloenzimas, incluso las proteínas transportadoras de oxígeno, hemoglobina y mioglobina, contienen hierro en la forma hemo. (9)

Aproximadamente el 90% de nuestro consumo de O_2 se destina a la fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP. Las enzimas que precisan O_2 para las reacciones de hidroxilación y oxigenación consumen aproximadamente el 10%, y una fracción residual ~ 1%, se convierte en especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) (4, 9). Las especies reactivas del oxígeno intervienen también en la regulación del metabolismo y en las defensas inmunitarias frente a un agente patógeno.

2.1 Especies derivadas del oxígeno

Productos de reducción

La reducción total del O_2 por $4 e^-$ para dar 2 equivalentes de H_2O , según la Ecuación 1, es un proceso termodinámicamente favorable y la energía libre asociada tendrá signo negativo dada por la ecuación $G^\circ = -nFE^\circ$:



A pesar de que el proceso es energéticamente favorable, la reducción concertada por $4 e^-$ es muy rara en medios biológicos, ocurriendo generalmente por una serie de pasos que involucran reducciones de 1 o $2 e^-$.

Las reducciones parciales generan distintas especies reactivas derivadas del oxígeno, algunas radicalares como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), e hidroxilo ($\cdot OH$), y otras no radicalares como peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

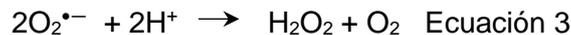
El O_2 en su estado fundamental triplete puede fácilmente aceptar un e^- , quedando el orbital π^*_{2px} completo con $2 e^-$ apareados confiriendo la carga negativa, y el otro orbital π^*_{2py} con un e^- desapareado dando el carácter de radical (Figura 1).

Por lo tanto, el superóxido es un radical aniónico producto de la reducción univalente del O_2 , Ecuación 2:



Ya en 1931 Linus Pauling, químico y bioquímico estadounidense, predijo la existencia del superóxido, basado exclusivamente en teorías de mecánica cuántica (11).

El superóxido es capaz de reaccionar consigo mismo en una reacción de dismutación generando H_2O_2 y O_2 , la cual puede ocurrir de manera espontánea (12), o ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (13), Ecuación 3. La velocidad de la dismutación espontánea depende del pH ($k = 2\text{-}3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.4 (14)), siendo más rápida a pH ácido que alcalino.



Desde el punto de vista redox, el superóxido es un moderado agente reductor y oxidante ($E^\circ_{\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}} = -0.18 \text{ V}$; $E^\circ_{\text{O}_2^{\bullet-}/\text{H}_2\text{O}_2} = 0.91 \text{ V}$) (15). Es capaz de reducir por un electrón a una gran variedad de metales de transición, como por ejemplo al hierro (Fe^{+3}) del citocromo *c* (Cyt *c*) (16) y de oxidar centros de hierro-azufre (Fe-S)(17). Por su propiedad de radical, el superóxido reacciona con otros radicales como el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) a velocidades controladas por difusión ($k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), con el radical fenoxilo ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^\bullet$) y el radical indólico (18).

La formación de superóxido conduce más que a efectos directos de esta especie, a la generación de nuevas especies con mayor poder oxidante como H_2O_2 y peroxinitrito, como se discute más adelante.

Los organismos vivos producen flujos sostenidos de radical superóxido de manera fisiológica, el cual puede ser producido enzimáticamente por las diferentes isoformas de la enzima NADPH oxidasa (Nox) o por Xantina oxidasa (XO). Esta especie radicalar también se genera de manera no enzimática mediante la fuga de electrones en diferentes sistemas enzimáticos como óxido nítrico sintasas (NOS), monooxigenasas y NADH deshidrogenasas, ciclooxigenasas, lipoxigenasas y principalmente en componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondriales especialmente en los Complejos I, II y III. (19)

En el catabolismo de purinas, la XO cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina en presencia de O_2 para dar ácido úrico, H_2O_2 y $\text{O}_2^{\bullet-}$ como productos de la reacción (20). La familia Nox, es un grupo de enzimas que sintetizan $\text{O}_2^{\bullet-}$ a expensas de NADPH y O_2 , las cuales varían en función, localización celular, y forma de regulación (21). La Nox-2 se expresa principalmente en fagocitos profesionales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, los que tienen la capacidad de activarse al fagocitar un agente patógeno y generar radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. Los macrófagos, junto a los neutrófilos y otras células reclutadas al sitio de invasión, forman parte de la primera defensa del huésped frente al ingreso de patógenos, controlando la proliferación y la diseminación. La actividad de la Nox-2 depende de los estímulos fagocíticos: luego del reconocimiento del patógeno, desencadena el ensamblaje del complejo enzimático activo en la membrana plasmática, con posterior fosforilación de componentes citosólicos claves (22). La invaginación de la membrana celular durante la fagocitosis genera que la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ sea hacia el lumen de la vacuola, destinado a causar daño oxidativo al patógeno internalizado, ya que se genera una alta concentración de esta especie en un pequeño volumen. En el fagosoma, también se genera H_2O_2 por la dismutación espontánea del $\text{O}_2^{\bullet-}$.

La producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ no ocurre indefinidamente, sino que es por un tiempo limitado. La producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en macrófagos por la Nox-2 se mantiene durante ~90 minutos,

a este evento se le ha dado el nombre de *Estallido Respiratorio*. El estallido respiratorio es la liberación rápida de especies reactivas del oxígeno ($O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2) por diferentes tipos celulares. Baldrige y Gerarde en 1932 describen el fenómeno por primera vez, donde observaron que la fagocitosis se acompañaba de un gran aumento del consumo de oxígeno de forma transitoria (23). Más adelante, se determinó en células polimorfonucleares (PMN) que dicho aumento en el consumo de oxígeno era independiente de la cadena respiratoria mitocondrial ya que no respondía a inhibidores mitocondriales, y que se acompañaba de un aumento en la ruta de las pentosas y en la producción de H_2O_2 (24, 25).

El óxido nítrico ($\bullet NO$) tiene un rol fundamental en la respuesta inmune mediada por macrófagos, el cual reacciona $O_2^{\bullet-}$ para dar peroxinitrito ($ONOO^-/ONOOH$) molécula central en el desarrollo de esta Tesis, que se describirá más adelante.

La vida media del radical $O_2^{\bullet-}$ es muy baja ($t_{1/2} < 1$ ms) en sistemas biológicos, debido fundamentalmente a la reacción de dismutación catalizada por las distintas isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD) ($k = 2 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$), siendo la constante de velocidad 10.000 veces mayor que la dismutación espontánea (Ecuación 3), y además por la reacción con el óxido nítrico ($\bullet NO$) ($k \sim 10^{10} M^{-1}s^{-1}$ (26)) dando peroxinitrito ($ONOO^-/ONOOH$).

Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

La reducción del radical superóxido por adición de un electrón genera otra especie derivada del oxígeno que se denomina peróxido (O_2^{2-}). El nuevo e^- incorporado se aparea con el electrón del orbital π^*_{2py} , formando un anión no radicalar (Figura 1).

Los compuestos llamados peróxidos contienen el enlace peroxilo O—O, con el oxígeno en un estado de oxidación de -1. Cuando la carga negativa es neutralizada por dos protones, el producto es peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un compuesto sin carga. No es un radical, es relativamente estable en condiciones fisiológicas y su permeabilidad es similar a la del agua, lo que le permite difundir a través de membranas.

El H_2O_2 tiene un pK_a de 11.7, por lo que a pH fisiológico sólo el 0.005% está en la forma desprotonada (HOO^-)(27). El anión HOO^- es un nucleófilo fuerte, pero sus reacciones en medios biológicos están limitadas por el alto pK_a .

El H_2O_2 es un oxidante fuerte por 2 electrones ($E^{\circ}_{H_2O_2/H_2O} = 1.35$ V, (15)), pero reacciona pobremente con la mayoría de las moléculas biológicas debido a una alta energía de activación, por lo que sus reacciones están controladas cinéticamente en lugar de termodinámicamente (28). Es un oxidante débil por un electrón ($E^{\circ}_{H_2O_2/\bullet OH} = 0.38$ V, (15)), sin embargo, el producto de reducción por un electrón, el radical hidroxilo ($\bullet OH$) es uno de los oxidantes más fuertes conocidos.

Una de las principales fuentes de H_2O_2 en sistemas biológicos proviene de la dismutación (enzimática o espontánea) del $O_2^{\bullet-}$, producido por la Nox-2, o por fuga de e^- en la cadena respiratoria mitocondrial. La producción directa de H_2O_2 por sistemas enzimáticos se produce por diferentes oxidasas, muchas de las cuales actúan en tipos celulares y en compartimentos subcelulares específicos, como la xantina oxidasa (XO), monamina oxidasa (MAO), o D-aminoácido oxidasa (DAO), entre otras (29).

El H_2O_2 ha sido identificado como un segundo mensajero en diferentes vías de señalización celular, en parte debido a que es capaz de reaccionar con residuos

específicos de cisteínas propensas a la oxidación debido a que se sitúan en entornos que reducen su pK_a , proporcionando la especificidad necesaria para la señalización (28, 29).

Su vida media depende principalmente de la actividad de enzimas detoxificantes como la catalasa que cataliza la conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2 , la glutatión peroxidasa que lo reduce a H_2O a expensas de la oxidación de glutatión (GSH), y otras peroxidasa que varían según el tipo celular (28, 29).

La concentración local de H_2O_2 depende de su generación y de su eliminación. El H_2O_2 tiene una gran difusión y además atraviesa membranas a través de canales llamados peroxiporinas (análogos a las acuporinas)(30). La difusión a través de membranas, junto a la rápida remoción por los sistemas antioxidantes intracelulares, genera un importante gradiente de concentración entre el medio intracelular y el medio extracelular.

El H_2O_2 producido por dismutación en el estallido respiratorio puede causar daño oxidativo al agente patógeno, por ejemplo, la toxicidad del H_2O_2 hacia *Trypanosoma cruzi* (agente causante de la enfermedad de Chagas) fue estudiada *in vitro* resultando una especie nociva para el parásito (31). Además, genera especies derivadas como radical $\cdot OH$ a partir de la reacción de Fenton (Ecuación 4) o el ciclo Haber-Weiss (Ecuación 6).

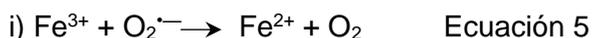
Radical hidroxilo ($\cdot OH$)

El $\cdot OH$ es una especie radicalar con un gran poder oxidante ($E^{o\cdot OH/H_2O} = 2.31$ V, (15)) y altamente reactivo.

Henry John Horstman Fenton, fue un químico británico quien describe por primera vez en 1893 el *reactivo de Fenton*, compuesto por una solución de peróxido de hidrógeno con un catalizador de hierro, generando un nuevo compuesto altamente oxidante utilizado para tratar contaminantes y desechos acuosos (32). La reacción de Fenton escrita en su forma más simple como muestra la Ecuación 4, donde el radical $\cdot OH$ se genera mediante la reacción entre el H_2O_2 y el Fe^{+2} libre.



El Fe^{+3} puede ser reducido nuevamente ya sea por el $O_2^{\cdot -}$ (ciclo Haber-Weiss, Ecuación 5). En el ciclo Haber-Weiss nombrado en homenaje a Fritz Haber, químico alemán y a su estudiante Joseph Joshua Weiss, quienes lo describieron en los años 1930s, se generan radicales $\cdot OH$ a partir de H_2O_2 y $O_2^{\cdot -}$. El primer paso del ciclo catalítico se produce por la reducción del hierro férrico a ferroso, y en un segundo paso la reacción de Fenton:



El radical hidroxilo debido a su alta reactividad es capaz de reaccionar de manera inespecífica con casi todas las moléculas biológicas a una velocidad controlada por difusión. Por lo tanto, *in vivo* tiene una vida media extremadamente corta ($t_{1/2} < 1$ ns), ya que se combina rápidamente con moléculas en su vecindad inmediata. Esto hace que

sea una especie con poca difusión, lo que le confiere un poder citotóxico relativo, debido a que muchas veces la reacción ocurre con moléculas o en residuos proteicos no críticos y por tanto, no tiene efecto sobre las funciones celulares.

Sin embargo, es capaz de oxidar bases purínicas y pirimidínicas del ADN generando mutaciones y/o muerte celular. También es capaz de abstraer un átomo de H de tioles, dando la especie radicalar tiilo ($-RS^{\bullet}$), la cual al combinarse con oxígeno genera especies radicalares oxo-sulfuradas con alta reactividad (33).

El radical $\bullet OH$ también es capaz de iniciar reacciones radicalares en cadena de peroxidación lipídica. Esto ocurre cuando el $\bullet OH$ se genera cerca de membranas celulares y ataca ácidos grasos y fosfolípidos de membrana, pudiendo generar especies peroxílicas radicalares ($-ROO^{\bullet}$), los que abstraen un protón dando el hidroperóxido lipídico ($-ROOH$) correspondiente.

La acumulación de hidroperóxidos lipídicos daña la membrana alterando su función, y además éstas especies generan aldehídos derivados altamente citotóxicos (33).

Las proteínas que unen iones metálicos (como transferrina, ferritinas y metalotioneínas) impiden la reacción de Fenton (Ecuación 4), limitando la formación de este radical (2).

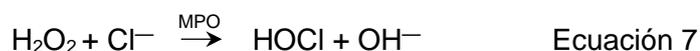
Otras especies derivadas del oxígeno

Ácido hipocloroso (HOCl)

El ácido hipocloroso (HOCl) es un ácido débil con un $pK_a = 7.47$ (27), por lo que a pH fisiológico existe tanto como anión hipoclorito (ClO^-) ~46%, y como ácido HOCl ~54 %. Es un oxidante por dos electrones moderado $E^{\circ}_{HOCl/Cl^-} = 1.07$ V (34), mientras que el potencial de reducción por un electrón es muy bajo, $E^{\circ}_{HOCl/Cl^{\bullet}} = 0.17$ V (34), sugiriendo que esta especie probablemente no reaccione por este mecanismo.

En medios biológicos, cuando el H_2O_2 no es sustrato de enzimas detoxificantes, puede dar lugar a la formación de HOCl por la acción de la enzima mieloperoxidasa (MPO).

Un mecanismo presente en neutrófilos (pero no por macrófagos) para eliminar agentes patógenos es mediante la enzima MPO, en donde la fagocitosis se acompaña de degranulación. Esta enzima cataliza la oxidación de aniones cloruro (Cl^-) por H_2O_2 , producido en la dismutación de $O_2^{\bullet -}$, para dar ácido hipocloroso (HOCl), Ecuación 7.



De manera análoga, si estuvieran presentes aniones bromuro en el medio, la MPO es capaz de catalizar la formación de ácido hipobromoso (HOBr).

3. Especies Reactivas del Nitrógeno

Las especies reactivas del nitrógeno (RNS) (del inglés, Reactive Nitrogen Species) son un grupo de compuestos que incluyen al óxido nítrico ($\bullet NO$), el peroxinitrito ($ONOO^-$ / $ONOOH$), y el dióxido de nitrógeno ($\bullet NO_2$), como las especies derivadas del $\bullet NO$ biológicamente relevantes. Tienen diferentes propiedades fisicoquímicas y diferente reactividad, como se describe a continuación.

Óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$)

Propiedades fisicoquímicas y reactividad

El óxido nítrico o monóxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}$), es una especie radicalar diatómica (tiene número impar de e^- , pero carga neta 0), es relativamente estable y existe en estado gaseoso a 25°C y 1 atm. Es poco soluble en agua (1.94 ± 0.03 mM) y 10 veces más soluble en disolventes orgánicos a 25°C (35). La hidrofobicidad del $\bullet\text{NO}$ permite la difusión a través de membranas lipídicas con alto coeficiente de permeabilidad en estas ($18 - 73 \text{ cm s}^{-1}$ (36, 37)) y con un alto coeficiente de partición en liposomas como modelos de membranas de 4.4 (38). Dicha permeabilidad hace que la mayoría de las membranas no sean un factor limitante en la difusión de esta especie, por lo que es capaz de actuar en compartimentos celulares distintos al de su origen, y además en células vecinas (acción parácrina).

A diferencia de otras especies radicalares, tiene poca capacidad redox ($E^{\circ}_{\text{NO}^+/\bullet\text{NO}} = 1.21 \text{ V}$; $E^{\circ}_{\bullet\text{NO}/\text{NO}^-} = 0.4 \text{ V}$ (39)), y no reacciona de forma rápida con la mayoría de las biomoléculas. Entre los blancos biológicos principales se encuentran los centros metálicos en proteínas, por ejemplo, la coordinación con el hemo ferroso (Fe^{+2}) en la guanilato ciclasa soluble responsable de muchos efectos fisiológicos del $\bullet\text{NO}$, también grupos hemo de oxihemoglobina, o citocromo oxidasa.

Es capaz de reaccionar rápidamente con especies radicalares como $\text{O}_2^{\bullet-}$, radical tiilo ($-\text{RS}^{\bullet}$), radicales proteicos y lipídicos mediando reacciones de terminación (40).

El $\bullet\text{NO}$ da lugar a varias especies que derivan de él, destacándose por sus efectos patogénicos al peroxinitrito, formado por la reacción de $\bullet\text{NO}$ con $\text{O}_2^{\bullet-}$ a velocidades controladas por difusión ($k \sim 10^9\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (26), y al radical dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) formado por la reacción de $\bullet\text{NO}$ con O_2 ($k = 6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (41).

La reacción de $\bullet\text{NO}$ con oxígeno molecular, denominada autoxidación, es un proceso complejo que genera diferentes productos y varias especies intermedias.

Entre las especies intermedias reactivas que se forman en este proceso, está el radical dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$), el óxido de nitrógeno (III) (N_2O_3) y el óxido de nitrógeno (IV) (N_2O_4), llegando a productos finales más estables como el nitrito (NO_2^-) y el nitrato (NO_3^-) (42). El proceso de autoxidación se considera demasiado lento para ser relevante en la mayoría de las condiciones fisiológicas, debido a las concentraciones fisiológicas de $\bullet\text{NO}$ y O_2 , por lo que la autoxidación no limitará su difusión desde el sitio de producción hasta su sitio de acción. Sin embargo, la reacción del $\bullet\text{NO}$ con el O_2 es particularmente importante en membranas, ya que ambas moléculas se concentran en dicho ambiente y la reacción puede ocurrir hasta ~ 300 veces más rápido (43).

Bioquímica y acciones biológicas del $\bullet\text{NO}$

El factor de relajación derivado del endotelio (EDRF) (del inglés, endothelium-derived relaxing factor) fue descubierto primeramente por Furchgott y Zawadzki en 1980 (44), y posteriormente demostrado por Ignarro y colaboradores (45), y paralelamente y de manera independiente, por el grupo de Moncada y colaboradores (46), que se trataba efectivamente de la molécula de $\bullet\text{NO}$. Su descubrimiento como una molécula señalizadora del sistema cardiovascular condujo al Premio Nobel en 1998.

La concesión del Premio Nobel de Medicina y Fisiología de 1998 a los científicos estadounidenses Robert Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad por sus descubrimientos en relación con el óxido nítrico como una molécula mensajera en el aparato cardiovascular, generó una importante polémica al excluir al científico hondureño Dr. Salvador Moncada de dicha mención.

El •NO es el principal agente que media la vasorrelajación del endotelio. El mecanismo involucra la formación de •NO por parte de las células endoteliales, que luego difunde hacia la capa de músculo liso vascular adyacente, donde activa a la enzima guanilato ciclasa soluble al unirse a su grupo hemo, desencadenando la producción de GMP cíclico (GMPc). Este segundo mensajero produce una disminución en la concentración de calcio en el sarcoplasma de las células lisas vasculares, que induce la relajación del vaso sanguíneo y descenso de la presión arterial (9, 47).

Otra importante propiedad biológica del •NO es su capacidad para inhibir la agregación plaquetaria, así como también la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular (48). Se ha demostrado, que el •NO inhibe la adhesión de leucocitos al endotelio al disminuir la expresión de moléculas de adhesión intercelular como VCAM-1, ICAM, MCP-1 y de varias citoquinas proinflamatorias (49). Por otra parte, el •NO inhibe la proliferación y migración de las células musculares lisas, lo que contribuye a sus acciones antiaterogénicas y a sus efectos beneficiosos sobre la remodelación vascular observada en algunas enfermedades cardiovasculares (50, 51).

Además de su rol central en la homeostasis del sistema cardiovascular, el •NO es sintetizado por otros tipos celulares como neuronas, neutrófilos y macrófagos, en los que participa en procesos fisiológicos tales como la neurotransmisión y la actividad citostática y citotóxica del sistema inmune, como se describe a continuación.

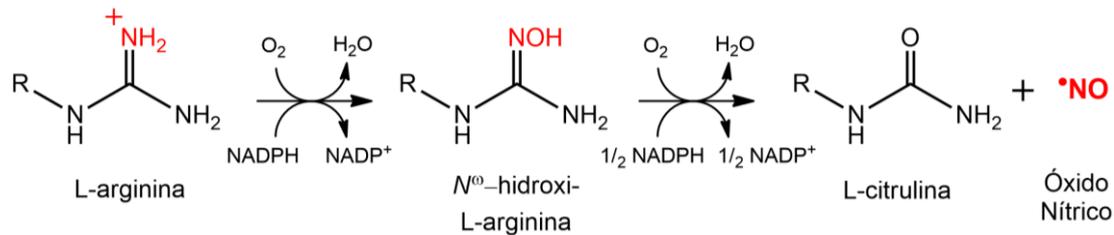
Por otro lado, el •NO inhibe la respiración mitocondrial principalmente por su unión a la citocromo oxidasa (Complejo IV), lo que produce un aumento de $O_2^{\cdot-}$. Así, el •NO promueve la fuga de e^- , que conduce a la generación de $O_2^{\cdot-}$, y por lo tanto formación de peroxinitrito intramitocondrial (52).

Además, sus especies derivadas (•NO₂, ONOO⁻) son productos potencialmente citotóxicos, vinculadas a procesos patológicos como la inflamación, el síndrome de isquemia-reperfusión, la neurodegeneración y la sepsis, entre otros (53).

Producción biológica de •NO

La familia de enzimas Óxido Nítrico Sintetas (NOS) son las responsables de la producción de •NO en sistemas biológicos, catalizando la oxidación del grupo guanidinio del aminoácido L-arginina, dando •NO y L-citrulina, como se muestra en el Esquema 1. Esta familia consiste en tres isoformas: la isoforma constitutiva endotelial (eNOS), la isoforma constitutiva neuronal (nNOS) que se expresan de forma ubicua, y la isoforma inducible (iNOS) controlado por expresión génica en respuesta a citoquinas proinflamatorias.

Las tres isoformas poseen el mismo mecanismo catalítico, pero difieren en sus estructuras primarias y en sus regulaciones. Las dos formas constitutivas son estrictamente dependientes del aumento de la $[Ca^{+2}]$ citosólico, mientras que, para la iNOS, los niveles de Ca^{+2} basales son suficientes para que una vez inducida, sea completamente activa por varias horas.



Esquema 1. Generación de •NO. Reacción catalizada por las diferentes isoformas de la NOS, donde la oxidación del grupo guanidinio del aminoácido L-arginina genera •NO y L-citrulina como productos.

La enzima activa es un homodímero, cada monómero con un dominio reductasa C-terminal, un dominio oxigenasa N-terminal y una región de unión a la proteína calmodulina (CaM) en el medio de ambos. Al aumentar la concentración de Ca^{+2} , se activa la NOS al acoplar el dominio oxidasa y reductasa a través de la unión Ca^{+2} -CaM. La transferencia de e^- ocurre desde el NADPH al FAD y luego al FMN en el dominio reductasa, pasando finalmente al hierro hémico de la subunidad oxidasa adyacente, que permite la unión de O_2 para formar un complejo transitorio oxígeno-ferroso.

Si bien la iNOS fue clásicamente descrita en fagocitos profesionales, más tarde se demostró que también estaba presente en otros tipos celulares como cardiomiocitos (54). La isoforma inducible presente en los fagocitos profesionales está especializada en producir grandes cantidades de •NO tras aumentar su expresión luego de la inducción por estímulos proinflamatorios como ser el IFN- γ y el lipopolisacárido (LPS). La iNOS sintetiza mayores cantidades de •NO que las otras isoformas, aumentando la concentración en estado estacionario de esta molécula cerca de 1000 veces (de nM a μM). Por otro lado, la duración en su producción es de muchas horas (> 20 h), hasta que la misma es degradada. La iNOS se localiza difusamente dentro del citoplasma, y además en vesículas que son transportadas hasta el fagosoma tras la activación macrofágica.

La activación simultánea de iNOS y la producción intrafagosomal de $\text{O}_2^{\bullet-}$, lleva a la formación de peroxinitrito dentro de la vacuola del fagocito. Así el •NO formado en el citosol del macrófago difunde a través de la membrana, y la formación de peroxinitrito ocurre en el sitio de producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$. La generación de peroxinitrito explica la mayor capacidad citotóxica de macrófagos contra muchos microorganismos, como *T. cruzi* (55, 56), *Mycobacterium tuberculosis* (57), y *Leishmania sp.* (58), entre otros.

Las isoformas endotelial y neuronal se expresan constitutivamente y pueden generar concentraciones de •NO en estado estacionario en el rango nM, participando en procesos donde el •NO actúa como molécula señalizadora (59).

La NOS endotelial (eNOS), modula el tono vascular a través de la activación mediada por •NO de guanilato ciclasa y consecuente formación de cGMP en el músculo liso, como se describió anteriormente.

La tetrahidrobiopterina (BH₄) es un cofactor requerido por todas las isoformas de NOS para su actividad, aunque su rol preciso en el mecanismo de reacción ha sido controversial. Sin embargo, si los niveles de BH₄ intracelulares se vuelven insuficientes para sostener la actividad de la enzima, se produce el desacople entre la oxidación de la L-arginina y la reducción del oxígeno molecular, lo que resulta en la formación de O₂^{•-} por reducción monoeléctrica del O₂ en el dominio oxigenasa. Esta situación, que se conoce como desacople de la NOS, también ocurre frente a bajas concentraciones de L-arginina, así como por oxidación y desensamblaje del cluster Zn⁺-tiolato presente en la enzima (60).

Este estado desacoplado de la eNOS, lleva a la co-existencia simultánea de O₂^{•-} y •NO, por lo tanto a la formación de peroxinitrito en el citosol celular. El desacople de la eNOS, ha sido asociado con diferentes trastornos que involucran disfunción endotelial, como la hipertensión y la aterosclerosis, entre otras (53, 61).

Dióxido de nitrógeno (•NO₂)

El dióxido de nitrógeno (•NO₂) es una especie radicalar gaseosa a 25°C y 1 atm. Tiene baja solubilidad en agua y dimeriza a N₂O₄, el cual es más soluble en agua, pero rápidamente homoliza a NO₂⁻ y NO₃⁻ ($k = 1000 \text{ s}^{-1}$) (62). Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas donde la concentración de •NO₂ es baja (< 1 μM), la dimerización que es un proceso reversible ($K_{eq} = 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), compite con reacciones bimoleculares de •NO₂ con diferentes blancos presentes en mayor concentración (42).

Es un oxidante moderadamente fuerte ($E^{\circ'}_{\text{NO}_2/\text{NO}_2^-} = 0.99 \text{ V}$ (63)), y participa en reacciones de recombinación con otros radicales, adición a dobles enlaces, reacciones de transferencia de e⁻, y es capaz de abstraer átomos de H del enlace C—H en compuestos aromáticos. Entre las reacciones de recombinación se encuentran las reacciones con radicales lipídicos y proteicos que llevan a la formación de los correspondientes compuestos nitrados. Es de destacar la reacción a velocidades controladas por difusión con el radical tirosilo (TyrO•) en proteínas dando 3-nitrotirosina (3-NO₂-Tyr), un biomarcador clásico de nitración (64).

En sistemas biológicos, existen diferentes fuentes endógenas de producción de •NO₂, como: (i) la autooxidación del •NO, mencionada más arriba, (ii) oxidación de NO₂⁻ catalizada por diferentes hemo-peroxidadas (mieloperoxidasa MPO y eosinófilo peroxidasa), (iii) oxidación no enzimática de nitrito por oxidantes fuertes de un electrón como •OH, CO₃^{•-} y ROO•, (iv) o proveniente de la homólisis del enlace peroxilo (O—O) del ácido peroxinitroso (ONOOH), o del nitrosoperoxocarboxilato (ONO₂CO₂⁻) aducto formado entre el anión peroxinitrito y CO₂ (53), como se describe más adelante.

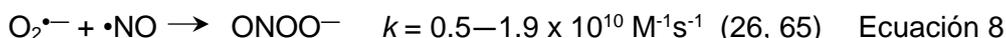
Peroxinitrito (ONOO⁻/ONOOH)

Química del peroxinitrito

El peroxinitrito (ONOO⁻/ONOOH)¹, es una especie altamente reactiva, central en el desarrollo de esta Tesis. Es producto de la reacción radicalaria entre superóxido (O₂^{•-})

¹ De acuerdo a IUPAC, los nombres recomendados para el peroxinitrito anión y su ácido conjugado son oxoperoxonitrato(1-) y oxoperoxonitrato de hidrógeno, respectivamente.

y óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), la velocidad de esta reacción radicalar es extremadamente rápida, cercana a los límites controlados por difusión ($k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), formando como producto al anión no radicalar (ONOO^-) Ecuación 8, (26).

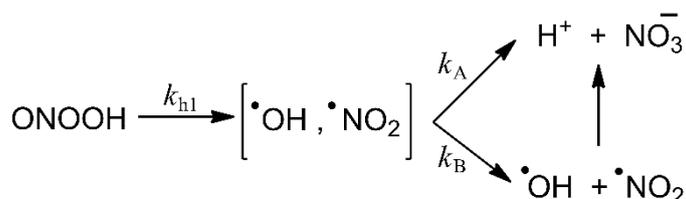


La reacción de formación es termodinámicamente favorable por la formación de un nuevo enlace covalente N—O, a expensas de la combinación de dos e^- desapareados de las especies precursoras (66).

La forma aniónica (ONOO^-) está en equilibrio con su ácido conjugado, ácido peroxinitroso¹ (ONOOH , $\text{pK}_a = 6.8$ (67)), Ecuación 9. Por lo tanto, debido a su pK_a a pH fisiológico predomina la forma aniónica (80%), sobre la forma ácida (20%).



El ácido peroxinitroso puede sufrir ruptura homolítica del enlace peroxilo (O—O) a los radicales derivados $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$, con una constante de homólisis (k_{hl}) de primer orden de 0.9 s^{-1} a pH 7.4 y 37°C , Esquema 2.



Esquema 2. El ONOOH puede sufrir homólisis a los radicales $\bullet\text{NO}_2$ y $\bullet\text{OH}$ con un 30% de rendimiento (k_B), o reorganizar a NO_3^- con un 70% de rendimiento (k_A). Los radicales $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$ se pueden recombinar en la caja del disolvente para dar nitrato o difundir a la solución.

La forma ácida sin carga ONOOH puede difundir a través de membranas biológicas (constante de permeabilidad $\sim 1 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$), mientras que el anión ONOO^- , puede utilizar canales aniónicos (68).

El anión ONOO^- podría existir como dos isómeros geométricos *cis* y *trans*, sin embargo está presente en solución mayoritariamente en la forma *cis*, Figura 2.

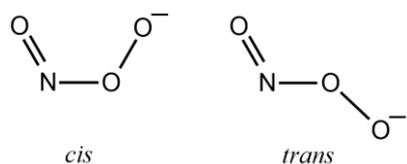


Figura 2. Las dos conformaciones de peroxinitrito anión. En solución y a pH fisiológico está presente mayoritariamente en la forma aniónica como isómero *cis* (69).

La carga negativa en la conformación *cis* del peroxinitrito está parcialmente deslocalizada sobre toda la molécula, lo que genera un enlace parcial débil entre los oxígenos terminales, con la fuerza semejante a un enlace de hidrógeno. De hecho, esta estabilización hace que el peroxinitrito tenga el pK_a más bajo ($\text{pK}_a = 6.8$), que cualquier otro peróxido, además esta deslocalización bloquea al peroxinitrito anión en la conformación *cis* limitando la rotación del oxígeno terminal alrededor del enlace OO—NO . Así el oxígeno terminal del resto peroxilo no puede atacar directamente al N

para formar nitrato (NO_3^-), debido a que la contracción del ángulo O-O-N generaría una fuerte repulsión entre el oxígeno peroxílico terminal y el oxígeno unido al N, Figura 3. Por el contrario, el oxígeno terminal en el isómero *trans* puede atacar directamente al nitrógeno por contracción del ángulo de enlace N-O-O, con un ligero alargamiento del enlace peroxilo O-O permitiendo que el peroxinitrito *trans* se transforme directamente en nitrato (70), Figura 3. La energía de activación en la isomerización entre las formas *cis* y *trans* es de 21 – 24 kcal/mol, esta barrera es alta para que la isomerización ocurra a una velocidad significativa a temperatura fisiológica. Sin embargo, la protonación para formar ácido peroxinitroso (ONOOH), reduce sustancialmente la barrera energética para la isomerización del ácido de *cis* a *trans* (70). A pesar de que el ácido peroxinitroso también es más estable en la forma *cis*, puede isomerizar a *trans* y dar NO_3^- en una considerable proporción (~ 70%), a diferencia del ONOO^- .

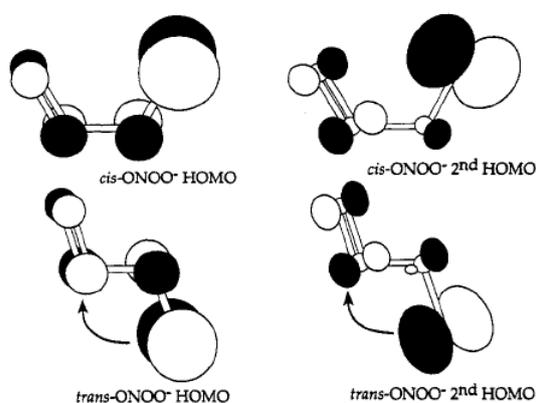


Figura 3. Orbitales moleculares ocupados más altos y segundos más altos (HOMO y 2nd HOMO) para peroxinitrito aniónico *cis* y *trans*. Las fases positivas y negativas de la función de onda se indican en blanco y negro respectivamente. La flecha indica cómo el oxígeno del resto peroxilo terminal puede atacar directamente al nitrógeno en el isómero *trans* del peroxinitrito para formar nitrato (NO_3^-). Mientras que este ataque está más impedido para el isómero *cis*. Figura tomada de (70).

El peroxinitrito es un potente oxidante y un nucleófilo fuerte, que puede generar oxidaciones a múltiples blancos biológicos por uno o dos e^- , con potenciales de reducción de $E^{\circ}_{\text{ONOO}^-/\text{NO}_2} = 1.6 \text{ V}$ y $E^{\circ}_{\text{ONOO}^-/\text{NO}_2^-} = 1.3 \text{ V}$, respectivamente (71, 72).

Tiene una química intrincada, la cual depende del pH y puede seguir vías radicalares, o participar en reacciones directas.

La reactividad del $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ se divide en:

- i) Reactividad directa: donde el ONOO^- actúa como nucleófilo fuerte, o puede participar en oxidaciones por un e^- con metales de transición; mientras que el ONOOH puede dar oxidaciones por dos e^- con diferentes sustratos (RH) a los que oxida (ROH) (53).
- ii) Reactividad indirecta o mediada por los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ derivados de la homólisis del enlace peroxílico del ácido peroxinitroso: en este caso la velocidad de descomposición del ONOOH dependen del pH con una k de velocidad de 0.9 s^{-1} a pH 7.4 y 37°C que aumenta con la disminución del pH (53).

El peroxinitrito puede ser sintetizado químicamente al hacer reaccionar H_2O_2 con NaNO_2 , o alternatively mediante irradiación UV de NO_3^- , y ha sido utilizado en química orgánica para la hidroxilación y nitración de compuestos aromáticos desde los años 20s (73). En estos primeros reportes se describe que al hacer reaccionar benceno con una solución de H_2O_2 y HNO_2 , y posterior alcalinización, se obtiene *o*-nitrofenol de color rojo, técnica que era utilizada para detectar benceno en mezclas de hidrocarburos (74).

En los años 50s, Halfpenny y Robinson reportan que el ácido peroxinitroso se puede utilizar para hidroxilar y nitrar compuestos aromáticos, y describen que las especies responsables de estas modificaciones son efectivamente derivadas de la descomposición del ácido peroxinitroso. Sugiriendo que la homólisis de dicho ácido genera radicales $\cdot\text{OH}$ responsable de hidroxilar al benceno, mientras que la nitración se daría primeramente por formación de un radical arílico por ataque del $\cdot\text{OH}$, y posteriormente nitración por el radical $\cdot\text{NO}_2$, otro radical derivado de la descomposición del ácido peroxinitroso. En estas reacciones también observan la aparición de un producto minoritario difenílico (74).

Más tarde en 1982 Blough y colaboradores, demuestran que el $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con el $\cdot\text{NO}$ para generar peroxinitrito aniónico en soluciones acuosas desgasadas y básicas (pH 12-13) (75).

Debido a su corta vida media en células y tejidos ($t_{1/2} < 10$ ms) (76), como se discutirá más adelante, el peroxinitrito no se puede aislar y detectar en muestras biológicas a través de técnicas espectroscópicas directas. Sin embargo, la absorbancia UV de ONOO^- ($\epsilon_{302\text{ nm}} = 1670\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (77)) es muy útil en el laboratorio para la cuantificación de soluciones stock concentradas a pH alcalino ya que la forma aniónica es relativamente estable en este medio (pH > 10).

Primeros reportes en el campo de la biología

Si bien el peroxinitrito era utilizado en química orgánica desde principios del siglo XX, las primeras evidencias de su formación en organismos vivos aparecen a fines de la década de los 80s cuando se estudiaba el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF). Antes de conocerse efectivamente la identidad química del EDRF, se observaba que la SOD aumentaba su vida media, por lo que se proponía que el $\text{O}_2^{\cdot-}$ era un *scavenger* o atrapador del EDRF. Esto ayudó a la identificación del $\cdot\text{NO}$ como la molécula responsable de la vasorrelajación *in vivo* (78, 79). Una vez demostrado que EDRF era $\cdot\text{NO}$, el mecanismo tras la inactivación observada fue rápidamente entendido ya que la reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ para dar peroxinitrito ya estaba descrita en la literatura química por Blough y colaboradores (75).

El descubrimiento del peroxinitrito como oxidante biológico, aparece una vez integrados los datos obtenidos por fisiólogos en relación al $\cdot\text{NO}$, con la literatura química en cuanto a su formación y reactividad.

La formación de peroxinitrito en sistemas biológicos y su posible rol como agente citotóxico fue originalmente propuesto por Beckman y colaboradores en 1990 (80). Posteriormente en 1991, Radi y colaboradores demostraron que el peroxinitrito era capaz de oxidar tioles e iniciar la peroxidación lipídica (67, 81). En esos primeros trabajos, que proponen la formación de peroxinitrito en sistemas biológicos se establecieron las bases para la exploración de este importante agente oxidante y nitrante *in vivo*.

Generación endógena

Como se explicaba más arriba, el peroxinitrito es producto de la reacción radicalaria entre $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ en una reacción favorecida cinética y termodinámicamente ($k \sim 10^{10}$

$M^{-1}s^{-1}$). Sin embargo, si bien ambos precursores se forman fisiológicamente en varios tejidos, las concentraciones en estado estacionario de ambos radicales permanecen bajas en condiciones basales, principalmente debido a la presencia de otros blancos celulares y procesos competitivos que limitan su difusión y vida media.

Además, debido a que el peroxinitrito y sus radicales derivados ($\bullet OH$ y $\bullet NO_2$) pueden iniciar diferentes vías capaces de causar oxidaciones biológicas perjudiciales, las células están equipadas con eficientes sistemas detoxificantes para prevenir tanto su formación (por ejemplo, superóxido dismutasas, SOD), como para detoxificarlo una vez formado (peroxirredoxinas y glutatión peroxidasas) (76).

Las SODs catalizan la dismutación de $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 y O_2 con una constante de velocidad extremadamente rápida ($k \sim 10^9 M^{-1}s^{-1}$), siendo este el principal destino del $O_2^{\bullet -}$ en sistemas biológicos, debido a que las SODs son ubicuas y abundantes.

Sin embargo, el $\bullet NO$ es una de las pocas biomoléculas capaces de reaccionar lo suficientemente rápido con $O_2^{\bullet -}$ y es producido en cantidades suficientes como para competirle a la dismutación por la SOD.

Efectivamente, está bien establecido que el peroxinitrito se forma en ciertos escenarios patológicos, como inflamación u homeostasis celular alterada, cuando la concentración en estado estacionario de sus radicales precursores aumenta varios ordenes de magnitud (53, 66).

Por lo tanto, el $\bullet NO$ y $O_2^{\bullet -}$ se tienen que encontrar en tiempo y espacio en el medio celular para que la reacción tenga lugar. El radical $O_2^{\bullet -}$ tiene una corta vida media y está cargado negativamente a pH fisiológico ($pK_a = 4.8$), lo que limita su difusión a través de membranas. Por otro lado, el $\bullet NO$ es una molécula pequeña, sin carga e hidrofóbica capaz de difundir a través de las bicapas lipídicas pudiendo difundir varios diámetros celulares. Entonces, dadas estas diferencias es de esperar que el peroxinitrito se forme principalmente en el sitio de producción de $O_2^{\bullet -}$ (por ejemplo en fagosomas de macrófagos, matriz mitocondrial y citosol) (19).

Reactividad en sistemas biológicos

El peroxinitrito es tanto un agente oxidante fuerte, como un nucleófilo fuerte, y estas características dictan gran parte de su destino en los sistemas biológicos (53). Los tipos de reacciones en los que participa en medios biológicos, podrían clasificarse en:

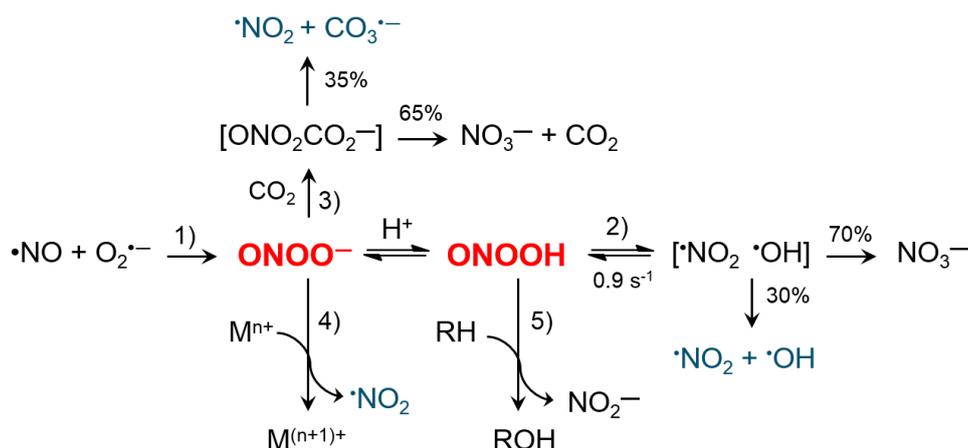
i) Reactividad directa, donde el $ONOO^-$ actúa como nucleófilo fuerte. Una reacción clave es la adición nucleofílica del anión a dióxido de carbono (CO_2) (Reacción 3, Esquema 3) debido a que el CO_2 está presente en alta concentración en medios biológicos (1.2 mM) y tiene una constante de velocidad moderadamente rápida ($k = \sim 10^4 M^{-1}s^{-1}$) (82) para dar el aducto nitroso-peroxocarbonato ($ONO_2CO_2^-$), el cual rápidamente homoliza para dar los radicales dióxido de nitrógeno ($\bullet NO_2$) y carbonato ($CO_3^{\bullet -}$) o isomeriza a nitrato (NO_3^-) (83, 84). El radical $CO_3^{\bullet -}$ es un oxidante relativamente fuerte y el $\bullet NO_2$ es un oxidante más moderado y también un buen agente nitrante; por lo tanto, las especies radicalares derivadas de $ONOCO_2^-$ promueven eventos oxidativos secundarios.

También el peroxinitrito puede participar en oxidaciones por un e^- con metales de transición (Fe, Cu, Mn) ($k \sim 10^6 M^{-1}s^{-1}$) (Reacción 4, Esquema 3), oxida clusters Fe-S de las proteínas (66) y reacciona con tioles ($k \sim 10^3 M^{-1}s^{-1}$) (67); mientras que el $ONOOH$

puede dar oxidaciones por dos e⁻ con diferentes sustratos (RH) a los que oxida (ROH) (Reacción 5, Esquema 3) (53). Un excelente ejemplo de oxidaciones por dos electrones corresponde a la reacción mostrada en la Ecuación 10, donde el tiolato ataca al ácido peroxinitroso por un mecanismo vía S_N2, dando el derivado de ácido sulfénico (RSOH) y nitrito.



ii) Reactividad indirecta o mediada por los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ derivados de la homólisis de ácido peroxinitroso. El ONOOH puede sufrir ruptura homolítica del enlace peroxilo (Reacción 2, Esquema 3) a $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ (30%) o sufrir isomerización dando NO_3^- (70%) (53).



Esquema 3. Vías de reacción de peroxinitrito. 1) la forma aniónica del peroxinitrito (ONOO^-) se forma por la reacción controlada por difusión entre los radicales $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), el cual está en equilibrio con su ácido conjugado, ácido peroxinitroso (ONOOH) con un $\text{p}K_a = 6.8$. 2) El ONOOH puede sufrir homólisis a los radicales $\cdot\text{NO}_2$ y $\cdot\text{OH}$ con un 30% de rendimiento ($k = 0.9 \text{ s}^{-1}$, a $\text{pH} 7.4$ y 37°C), o reorganizar a NO_3^- con un 70% de rendimiento. 3) El CO_2 es un blanco preferencial del ONOO^- dando el aducto intermedio nitrosoperoxocarboxilato ($\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$), que descompone a los radicales $\cdot\text{NO}_2$ y $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en un 35% de rendimiento, o isomeriza a NO_3^- . 4) El ONOO^- promueve reacción directa de oxidación por un electrón con metales de transición (Fe, Mn, Cu), y 5) reacción de oxidación por dos electrones con sustratos RH. Adaptado de (53).

En condiciones fisiológicas la mayoría del peroxinitrito será consumido directamente en lugar de sufrir homólisis. En los sistemas biológicos hay múltiples blancos para peroxinitrito, y la ruta de ruptura homolítica dando $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ es lenta en comparación con reacciones bimoleculares directas, de hecho *in vivo* más del 95% de todo el peroxinitrito formado será consumido por reacciones directas y menos del 5% derivará en $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ (53, 86). Por lo tanto, el destino de peroxinitrito en los sistemas celulares dependerá de la cinética de reacción, difusión y concentración de los diferentes blancos que pueden estar presentes en diversos escenarios.

Nitración de proteínas

El peroxinitrito es capaz de nitrar ciertos aminoácidos en proteínas, donde la nitración de tirosinas ha sido la más estudiada y considerada clásicamente a esta modificación postraduccional como una huella de peroxinitrito.

El mecanismo de formación de 3-nitrotirosina (3-NO₂-Tyr) *in vivo* implica un mecanismo radicalar, no hay una reacción directa bimolecular entre el peroxinitrito y la tirosina. En cambio, el mecanismo radicalar implica una primera oxidación por un oxidante fuerte de un electrón para dar el radical tirosilo (Tyr•), que luego se combina con •NO₂ en una reacción controlada por difusión rindiendo 3-NO₂-Tyr. Como oxidantes en la primer etapa de oxidación pueden participar los radicales derivados de peroxinitrito como •OH, •NO₂ y CO₃•⁻, además de complejos radicalares oxo-metálicos (compuesto I y II de hemoperoxidasas), peroxilos lipídicos (LOO•), entre otros (53, 60).

La incorporación de un grupo nitro en el C3 del anillo fenólico, genera cambios en las propiedades con respecto al aminoácido original, por ejemplo, se observa una gran disminución en el pK_a del grupo -OH de aproximadamente 10.0 – 10.3 a 7.2 – 7.5 para tirosina libre y 3-nitrotirosina, respectivamente (64).

Además, el grupo nitro es un sustituyente voluminoso e hidrofóbico que puede generar restricciones estéricas locales, desencadenando cambios conformacionales en la proteína.

Además de 3-nitrotirosina, las reacciones con oxidantes derivados de peroxinitrito, también producen 3,3'-ditirosina.

La nitración de residuos de Tyr es un proceso de bajo rendimiento, no todas las proteínas se nitrán y, dentro de una proteína, no todos los residuos de tirosina van a ser nitrados (solo 1 – 5 de 10.000 residuos de tirosina).

Existen varios ejemplos de proteínas nitradas *in vivo* bajo condiciones de estrés nitrooxidativo, y en muchos casos esta modificación provoca una pérdida de la función.

Por ejemplo, la Mn-SOD mitocondrial es uno de los primeros ejemplos de proteínas nitradas que se encuentran *in vivo* en varias afecciones patológicas, como diabetes, inflamación y envejecimiento (87). Se ha demostrado que la nitración dependiente de peroxinitrito de tirosinas específicas en proteínas mitocondriales conduce a la inactivación de éstas y eventualmente a la interrupción del equilibrio redox dentro de las mitocondrias (88).

Sin embargo, a veces la nitración puede resultar en una ganancia de función para la proteína. Un blanco importante de peroxinitrito en la mitocondria es el citocromo *c* (cyt *c*). La nitración de tirosina del cyt *c*, da como resultado un aumento de la actividad peroxidática, amplificando el daño oxidativo a las mitocondrias a través de la generación de oxidantes más potentes (89).

La nitración de proteínas ha sido propuesta, además, como un mecanismo de señalización celular. En este sentido, se ha demostrado que la nitración selectiva de tirosina de Hsp-90 juega un papel clave en la inducción de la muerte celular (90).

Otras modificaciones oxidativas

El peroxinitrito es capaz de causar daños y roturas en las cadenas ADN, reaccionando tanto con los azúcares como con las bases nitrogenadas. De las cuatro bases del ADN, la guanina es la más reactiva y su reacción con peroxinitrito genera productos oxidados y nitrados, como 8-oxoguanina y 8-nitroguanina (91).

También ácidos grasos presentes en membranas o lipoproteínas son susceptibles a la oxidación y nitración por peroxinitrito. Son de particular interés en lipoproteínas de baja densidad (LDL) y placas ateroscleróticas, donde el peroxinitrito puede jugar un papel crítico como especie pro-oxidante (92, 93).

4. Estrés Oxidativo y Nitroxidativo

La vida aerobia conlleva el riesgo de oxidación excesiva de componentes celulares y tisulares que pueden comprometer la función y la viabilidad celular. La formación y acumulación de productos oxidados en biomoléculas como proteínas y lípidos se observa en varias patologías, e incluso durante el proceso de envejecimiento normal.

En los años 80s, se empieza a acumular considerable evidencia experimental que relaciona a la vida aerobia con procesos de oxidación potencialmente peligrosos, y que éstos constituyen la base de un número de fenómenos fisiológicos y fisiopatológicos, participando en procesos tan diversos como inflamación, envejecimiento, carcinogénesis, acción farmacológica y toxicidad de fármacos, defensa contra protozoos y muchos otros.

Por lo tanto, en 1985 se llega a un consenso en el campo de la biología y de la biomedicina donde se define por primera vez el concepto de “*estrés oxidativo*” como una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor del primero (94).

Desde entonces ha habido un gran desarrollo en el área de la biología redox. El campo se centró en la caracterización de especies oxidantes y tanto enzimas antioxidantes como compuestos de bajo peso molecular con propiedades antioxidantes. En las décadas posteriores hubo descubrimientos fundamentales en la comprensión de la regulación, señalización y detección redox. Posteriormente en 2007, se actualiza la definición de *estrés oxidativo*: un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, lo que lleva a una interrupción de la señalización y control redox y/o daño molecular (95, 96).

En los últimos años se extiende esta definición considerando las modificaciones estructurales de biomoléculas, como la nitración de proteínas y lípidos. Estas modificaciones han ganado gran relevancia y dependen en gran medida del óxido nítrico y sus especies derivadas como peroxinitrito, dióxido de nitrógeno, nitrito. El término “*estrés nitroxidativo*” se ha comenzado a utilizar para reforzar el concepto de la nitración como una modificación oxidativa (97).

5. Detección de peroxinitrito

Las reacciones de peroxinitrito con diferentes biomoléculas pueden conducir a eventos citotóxicos, pudiendo provocar la muerte celular. Los efectos citotóxicos provocados por las reacciones de oxidación y nitración generalmente implican la participación de una variedad de moléculas y procesos efectores.

Aunque la formación excesiva de peroxinitrito en tejidos es perjudicial, por ejemplo, en los procesos inflamatorios y degenerativos, también está claro que nuestro sistema inmune puede utilizar peroxinitrito para combatir la invasión microbiana.

De hecho, mientras que el cambio en las propiedades de señalización del $\bullet\text{NO}$ hacia vías oxidativas luego de reaccionar con $\text{O}_2^{\bullet-}$ está asociado con patologías en los sistemas vascular y nervioso, la actividad antimicrobiana del $\bullet\text{NO}$ liberado por los macrófagos depende en gran medida de la formación de peroxinitrito.

En la pared vascular, afecciones como la hiperglicemia, la aterosclerosis y la hipertensión, llevan a un aumento en la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, acortando la vida media del $\bullet\text{NO}$ y causando disfunción endotelial (66). La formación de peroxinitrito da como resultado la oxidación y nitración de biomoléculas que pueden contribuir aún más a la

degeneración vascular. Su relevancia como mediador en varios estados patológicos incluidas la neurodegeneración, inflamación, enfermedades cardiovasculares y proceso de envejecimiento, ha motivado el desarrollo de una variedad de técnicas para su detección y estimación de su flujo de formación en sistemas biológicos. Su detección celular precisa representa un paso fundamental para comprender cómo los oxidantes derivados del óxido nítrico afectan los procesos biológicos y es sumamente relevante para posibles intervenciones farmacológicas.

Desafíos en la detección de peroxinitrito

Una vez formado el peroxinitrito, principalmente en el sitio de producción de $O_2^{\bullet-}$, su destino en los sistemas celulares dependerá de los diferentes blancos que pueden estar presentes en diversos escenarios celulares. La reactividad de peroxinitrito hacia un blanco celular dependerá de dos parámetros centrales: constante de velocidad de la reacción (k , a temperatura fisiológica de $37^\circ C$) y concentración de los blancos celulares ($[T]$, T del inglés, Targets).

Por lo tanto, el término $k[T]$ se utiliza para parametrizar la reactividad de peroxinitrito hacia un blanco específico (19, 76).

Teniendo esto en cuenta, y sabiendo $[T]$ en determinada condición celular específica, solo unos pocos blancos biológicos son relevantes para peroxinitrito incluyendo CO_2 , peroxiredoxinas, glutatión peroxidasa, grupos hemo y algunos tioles proteicos. Siendo las peroxiredoxinas las enzimas detoxificantes de peroxinitrito más eficientes con una constante de velocidad $k \sim 1-10 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y además se encuentran bastante concentradas en diferentes compartimentos celulares. Así, la mayor parte del peroxinitrito producido endógenamente puede ser detoxificado por la acción de las peroxiredoxinas. Sin embargo, el contenido de sistemas antioxidantes en cada tipo celular es diferente. Además, la capacidad antioxidante no es estática, ya que está regulada a nivel de la expresión génica por diferentes estímulos prooxidantes y proinflamatorios, lo que hace que la concentración de blancos sea específica para cada tipo celular y en cada estado celular.

Debido a su corta vida media en células y tejidos ($t_{1/2} < 10 \text{ ms}$) (76), no se puede aislar y detectar en muestras biológicas a través de técnicas espectroscópicas directas.

Por lo tanto, la determinación precisa de la generación de peroxinitrito en sistemas celulares es sumamente desafiante, debido a la variedad blancos celulares y en diferentes concentraciones en las diferentes condiciones celulares y, por consiguiente, los diferentes $k[T]$. Todo esto se reflejará en una detección de esta especie menor de la real y así una subestimación de la producción de peroxinitrito. Es así como lo que se detecta es una fracción de lo que realmente se forma. Sin embargo, teniendo en cuenta las reacciones globales de peroxinitrito con los diferentes blancos celulares se puede estimar el término $k[T]$, y así estimar un flujo real de formación de esta especie.

Por lo tanto, existe una gran dificultad intrínseca en identificar y medir con especificidad esta especie transitoria formada *in vivo*.

Métodos de detección de peroxinitrito

Han pasado más de 30 años desde el reconocimiento de la formación de peroxinitrito en organismos vivos y su relevancia como mediador de procesos patológicos. Desde

entonces, se han realizado grandes avances en la comprensión de su química y rol en varios procesos fisiológicos y patológicos.

La formación de peroxinitrito en medios biológicos ha sido evidenciada clásicamente mediante la detección de modificaciones estructurales estables que este oxidante y sus radicales derivados generan en blancos moleculares (huella). Principalmente se ha utilizado para la detección una de sus huellas características, la 3-nitrotirosina proteica por técnicas inmunoquímicas y bioanalíticas. Sin embargo, existen otros mecanismos de nitración en medios biológicos además del peroxinitrito, que involucran especies altamente nitrantes como el $\cdot\text{NO}_2$. La principal fuente enzimática de este radical es la oxidación de nitrito dependiente de H_2O_2 por mieloperoxidasa (MPO) y eosinófilo-peroxidasa (EPO) (64).

Se han desarrollado muchas estrategias de medición, basadas en diferentes principios, para la detección de peroxinitrito, como el immuno-spin trapping, sondas quimioluminiscentes y fluorescentes, sensores electroquímicos e incluso sondas genéticamente codificadas.

Entre estas estrategias, las sondas² que reaccionan directamente con peroxinitrito son las herramientas más prometedoras para la detección precisa de oxidantes que pueden permitir a los investigadores comprender sus efectos biológicos *in vivo*.

Un método clásico para la detección de peroxinitrito han sido las sondas quimioluminiscentes, como el luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) (98). La quimioluminiscencia es la emisión de luz (luminiscencia) como resultado de una reacción química (por ejemplo, oxidación), a diferencia de la fluorescencia que se basa en la absorción de fotones con la concomitante emisión de luz. El mecanismo de reacción general de la quimioexcitación del luminol, implica dos pasos de oxidaciones secuenciales por agentes oxidantes apropiados ($\cdot\text{OH}$ o $\text{CO}_3^{\cdot-}$). Si bien las técnicas quimioluminiscentes son altamente sensibles, tienen poca capacidad para discriminar entre especies oxidantes individuales en sistemas biológicos, existen numerosas interacciones radicales que pueden influir en la quimioluminiscencia y por lo tanto la caracterización de peroxinitrito requiere muchas condiciones experimentales controladas y controles adecuados.

En el marco de esta Tesis nos vamos a centrar exclusivamente en el desarrollo de sondas fluorescentes para la detección de peroxinitrito.

Sondas fluorescentes para la detección de peroxinitrito

En los últimos años, los avances en la detección de peroxinitrito en sistemas biológicos han sido impulsados por el desarrollo de técnicas de fluorescencia y quimioluminiscencia que son capaces de revelar la formación de peroxinitrito en tiempo real con alta sensibilidad. Los esfuerzos se han centrado en lograr una detección selectiva, de alta precisión y así determinar datos cuantitativos sobre las tasas de formación de este oxidante.

² Se entiende por sonda molecular a una molécula orgánica, capaz de reaccionar con determinado analito para estudiar las propiedades de éste último. Si alguna propiedad medible de la sonda molecular utilizada cambia cuando interactúa con el analito (como un cambio en la absorbancia o fluorescencia), se pueden estudiar las interacciones entre la sonda y el analito. Esto hace posible estudiar indirectamente las propiedades de compuestos y estructuras que pueden ser difíciles de estudiar directamente.

Se han diseñado una gran variedad de moléculas orgánicas para la detección de peroxinitrito, que tienen diferente selectividad y sensibilidad. En general, estas moléculas tienen baja o nula fluorescencia, y se vuelven fluorescentes después de reaccionar con el oxidante.

La mayoría de las sondas fluorescentes reportadas para la medición de peroxinitrito dependen de la reacción con sus radicales secundarios derivados ($\text{CO}_3^{\bullet-}$, $\bullet\text{NO}_2$, $\bullet\text{OH}$). Sin embargo, en estos últimos 10 años se ha desarrollado un nuevo conjunto de moléculas que reaccionan directamente con peroxinitrito, haciendo que el proceso de detección sea más directo, altamente selectivo, lo que posibilita su cuantificación.

El principio de fluorescencia se basa en la emisión de luz (de mayor longitud de onda) por una molécula, posterior a la absorción de energía electromagnética ($h\nu$).

Las técnicas fluorescentes como métodos de detección para oxidantes intracelulares, incluido el peroxinitrito, se han convertido en ensayos de rutina en los laboratorios. La intensidad de fluorescencia se puede determinar fácilmente proporcionando un método analítico simple y sensible para detectar y en varias ocasiones cuantificar, oxidantes intracelulares en tiempo real.

En la literatura existe un gran número de moléculas orgánicas diseñadas y sintetizadas para detectar peroxinitrito, donde la característica común es tener una fluorescencia basal nula o muy baja, la que aumenta en gran medida con la oxidación.

Las sondas fluorescentes para la detección de peroxinitrito se pueden clasificar en dos grupos principales según su mecanismo de reacción: i) sondas redox que producen un producto final fluorescente por un mecanismo radicalar, y ii) sondas electrofílicas en las que un ataque nucleofílico por peroxinitrito (ONOO^-) a determinado grupo funcional soportado en la molécula, rinde el producto altamente fluorescente. Las sondas que reaccionan directamente con ONOO^- deben reaccionar de manera muy rápida (10^5 – $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para competir con otras rutas de descomposición de este oxidante.

i) Sondas redox: sondas que reaccionan con los radicales derivados de peroxinitrito

Dos sondas ampliamente utilizadas para la detección de especies oxidantes en sistemas biológicos son la 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH_2) y la dihidrorodamina (DHR-123), que comparten el mismo mecanismo de reacción. Aunque ampliamente encontradas en la literatura, presentan una serie de limitaciones en cuanto a su utilidad en la detección de peroxinitrito (60, 99).

Estas sondas no reaccionan directamente con peroxinitrito. El mecanismo de reacción general es una oxidación por oxidantes fuertes de un electrón como los radicales derivados del peroxinitrito ($\bullet\text{NO}_2$, $\text{CO}_3^{\bullet-}$, $\bullet\text{OH}$), produciendo un intermedio radicalar aniónico ($\text{DCF}^{\bullet-}$), que luego se oxida para dar estructuras resonantes responsables del aumento de la emisión de fluorescencia (DCF) (100) (Figura 4).

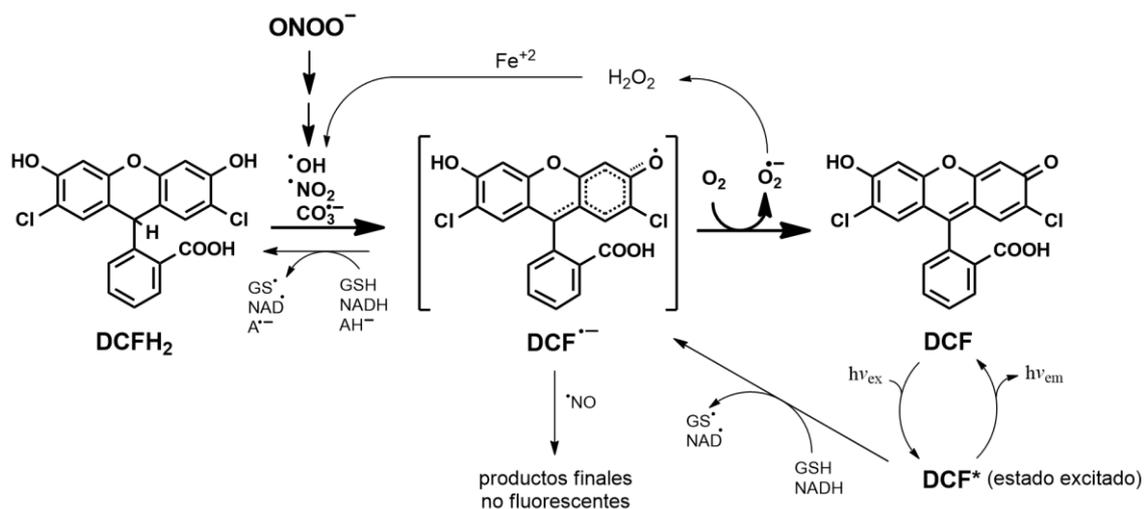


Figura 4. Mecanismo de oxidación de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂). La sonda reducida (DCFH₂) se oxida por los radicales derivados de peroxinitrito y otros oxidantes de un electrón, produciendo un radical aniónico intermedio (DCF^{•-}) que se oxida por oxígeno molecular, rindiendo el producto altamente fluorescente DCF. Las flechas finas muestran reacciones alternativas y ciclos redox. AH⁻ representa ascorbato. (42).

Además de los radicales derivados de peroxinitrito, otros oxidantes fuertes de un electrón presentes en medios biológicos pueden generar el producto fluorescente DCF, como los producidos a partir de hemo-peroxidasas, u otras metaloproteínas en presencia de H₂O₂. Los radicales tiilo derivados de la oxidación de GSH también pueden oxidar DCFH₂ a una alta velocidad ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.4) (101).

La falta de especificidad de estas sondas es la mayor limitación ya que se oxidan por numerosos radicales y especies oxidantes.

Estas sondas pueden ser útiles para detectar un aumento global de especies oxidantes en sistemas celulares, pero no permiten identificar las especies particulares involucradas. Su uso en la detección de peroxinitrito, o cualquier otro oxidante particular, genera resultados ambiguos e inconclusos y deben evitarse este tipo de sondas a menos que se complemente con otros métodos más específicos. Por lo tanto, DCFH₂ y DHR-123 no son específicos para peroxinitrito y no pueden usarse como únicas herramientas para su detección (60, 99).

ii) Sondas electrofílicas: sondas que reaccionan directamente con ONOO⁻

Un segundo tipo de mecanismo de reacción en la detección de peroxinitrito y otros nucleófilos biológicos (ROO⁻, HOO⁻, ClO⁻), implica un ataque nucleofílico por el oxidante a un grupo funcional electrofílico soportado en la estructura de la sonda, que al reaccionar genera el compuesto fluorescente.

El principio básico es que el grupo electrofílico disminuye o hace casi nula la intensidad de emisión de fluorescencia (quenching) del fluoróforo, de manera que al hacerla reaccionar con el nucleófilo se libera este grupo protector, liberando al fluoróforo y recuperando la emisión de fluorescencia.

Se han explorado diferentes grupos electrofílicos como cetonas activadas (para aumentar su capacidad electrofílica), o boronatos (ácidos o ésteres borónicos), siendo

éstos últimos los que se han destacado ampliamente, por lo que en el desarrollo de esta Tesis nos centraremos en este grupo funcional.

Un grupo de sondas llamadas HKGreen- (HK: Hong Kong) numeradas 1 a 4, fueron desarrolladas para la detección de peroxinitrito, donde la trifluoroacetona como centro electrofílico está unido a diferentes fluoróforos (diclorofluoresceína, BODIPY, rodamina) (102-105), Figura 5. Sin embargo, sus rendimientos de reacción con el oxidante son muy bajos en todos los casos, haciendo que no sean óptimas para detectar bajos niveles de peroxinitrito en sistemas biológicos. Además la generación de peroxinitrito endógeno en células no fue evaluada, sino que fue generado por estimulación no fisiológica (60, 99). Respecto a HKGreen-4, si bien los autores indican que el mecanismo de reacción directo con peroxinitrito está en estudio (105), su estructura química sugiere que, es más probable que la reacción proceda a través de un mecanismo radicalar con los radicales secundarios derivados ($\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$) como los responsables de la oxidación de la sonda, siendo una reacción indirecta con peroxinitrito (60, 99).

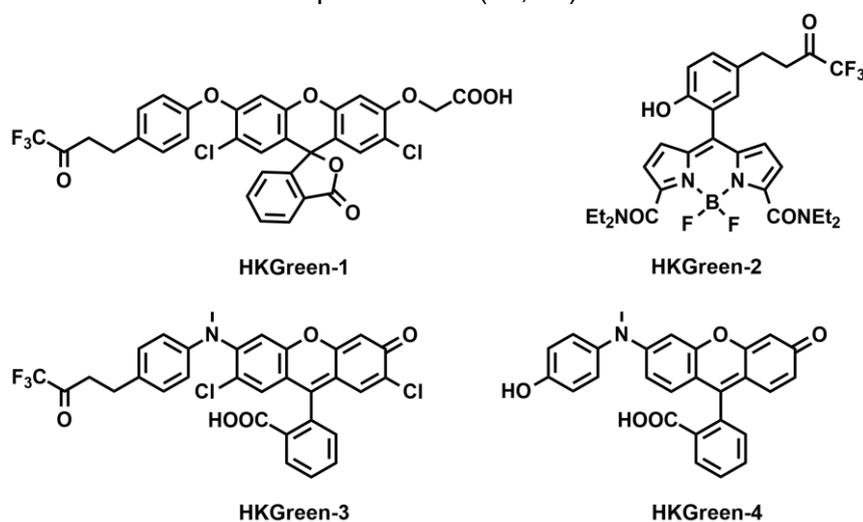


Figura 5. Estructuras químicas de las sondas HKGreen. HKGreen-1, HKGreen-2 y HKGreen-3 son derivados de trifluoroacetona unida a diclorofluoresceína a través de un enlace éter arílico, a BODIPY a través de un fenol y a un derivado de rodamina, respectivamente. HKGreen-4 es un derivado de *N*-fenol-*N*-metilrodamina (99).

Boronatos: ácidos y ésteres borónicos

La introducción de los organoboranos en biología redox ha sido muy importante para el área generando grandes avances.

Los ácidos y ésteres borónicos (boronatos) son grupos funcionales electrofílicos, debido a que el átomo de boro posee 6 electrones de valencia, con la consiguiente carencia de dos electrones confiriéndole esta característica (106), Figura 6.

Estos grupos son de origen sintético, no se encuentran en la naturaleza. Los ácidos borónicos son compuestos orgánicos trivalentes que contienen boro, con un sustituyente alquilo o arilo y dos hidroxilos para llenar las valencias restantes ($-\text{B}(\text{OH})_2$). El reemplazo de los hidroxilos del ácido borónico por grupos alcoxi da ésteres borónicos ($-\text{B}(\text{OR})_2$). El átomo de boro con hibridación sp^2 posee un orbital p vacante, haciendo que los ácidos y ésteres borónicos sean centros electrofílicos y ácidos Lewis moderados, Figura 6.

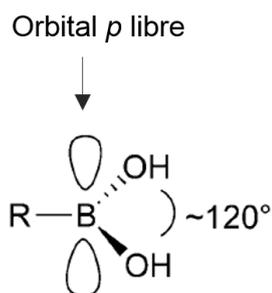
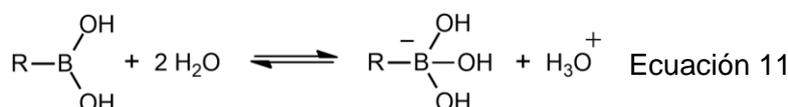


Figura 6. Estructura de un ácido borónico, donde el átomo de B con 6 e^- de valencia tiene hibridación sp^2 y geometría trigonal plana, dejando un orbital p perpendicular libre, confiriéndole la característica de ácido de Lewis (106, 107).

En solución acuosa a pH fisiológico, no se comportan como ácidos de Brønsted típicos debido a que tienen un $pK_a \sim 9$, pero por su característica de ácido de Lewis pueden adicionar H_2O , generando un B tetraédrico, Ecuación 11. Sin embargo, a pH fisiológico el equilibrio está ampliamente desplazado hacia la forma neutra del ácido borónico, mientras que a pH básicos se favorece la forma aniónica cuaternaria.



A finales de los años 60s Keith y Powell sugieren por primera vez una posible reacción entre los boronatos y peroxinitrito, donde observaron que al trabajar con buffers de borato se producía una rápida descomposición de peroxinitrito proporcional a la concentración de borato (108).

En estos últimos años se ha visto un número creciente de sondas fluorescentes derivadas de sistemas boronados para la detección de peroxinitrito, desde moléculas orgánicas pequeñas, e incluso sondas genéticamente codificados derivadas de GFP (del inglés, *boronate-based green fluorescent protein*) para la detección directa de peroxinitrito en sistemas celulares.

Los boronatos como centros electrofílicos, son susceptibles al ataque de varios nucleófilos presentes en medios biológicos como los peróxidos (HOO^- , ROO^-) o ClO^- , pero la reacción con ONOO^- es cinéticamente más favorable, como ha sido demostrado por nosotros y otros autores (109-111). El peroxinitrito reacciona con la mayoría de arilboronatos casi un millón de veces más rápido que el H_2O_2 ($k_{\text{ONOO}^-} \sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{H}_2\text{O}_2} \sim 1 - 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a pH fisiológico (27, 110, 111).

Desde los años 50s se conoce la reacción entre ácidos arilborónicos y H_2O_2 , donde Kuivila y colaboradores estudiaron diferentes formas de catalizar esta reacción debido a su cinética lenta, y comienzan a esbozar un posible mecanismo de reacción (112) (113).

El mecanismo de reacción de boronatos (tanto ácidos como ésteres borónicos) con oxidantes nucleofílicos más aceptado hasta el momento implica, un primer paso de adición nucleofílica del oxidante desprotonado al átomo de boro electrofílico, generando un aducto aniónico cuaternario que sufre una posterior escisión heterolítica en el enlace peroxilo $\text{O}-\text{O}$ dando fenoxiboronato, e hidrólisis para dar el fenol correspondiente con ~85-90% de rendimiento (27, 109, 113), Figura 7. Las sondas derivadas de boronatos no rinden el correspondiente producto hidroxilado con oxidantes de un electrón, como los derivados de peroxinitrito $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$.

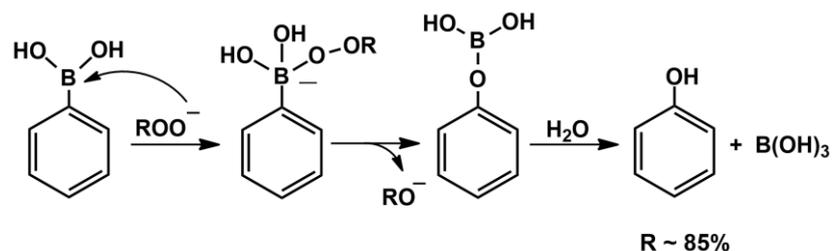


Figura 7. Mecanismo de oxidación propuesto de arilboronatos con oxidantes nucleofílicos (ONOO^- , HOO^- , ClO^-). El mecanismo es análogo para ésteres borónicos (27, 113).

En el desarrollo de esta Tesis estudiamos el mecanismo de oxidación de ácidos y ésteres borónicos con cuatro oxidantes de relevancia biológica, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito ($\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$), peroximonocarbonato (HCO_4^-) y ácido hipocloroso (HOCl). Analizamos el origen de los átomos de oxígeno en los productos de oxidación de una sonda derivada de ácido borónico, como se describe en el Capítulo 2, y así completar la elucidación del mecanismo de reacción.

Aunque las primeras sondas derivadas de boronatos fueron reportadas para la detección de H_2O_2 (114, 115), su aplicación en la detección de peroxinitrito ha sido sumamente exitosa.

Si bien en la literatura ha sido tema de discusión que el peroxinitrito se genera a concentraciones mucho más bajas y tiene una menor vida media en comparación con H_2O_2 , lo que podría compensar las diferencias en las constantes de velocidad, datos actuales muestran que en sistemas celulares donde coexisten H_2O_2 y peroxinitrito, los boronatos reaccionarán preferentemente con peroxinitrito. Por otro lado, el H_2O_2 puede difundir fácilmente en los sistemas celulares donde existe una batería de enzimas para su desintoxicación (peroxirredoxinas, peroxidases, catalasas); pero además a pH fisiológico solo $\sim 0.005\%$ de H_2O_2 está en forma aniónica (HOO^-) ($\text{p}K_{\text{aH}_2\text{O}_2} = 11.7$) mientras que $\sim 80\%$ del peroxinitrito está en forma aniónica ($\text{p}K_{\text{aONOO}^-} = 6.8$), haciendo al H_2O_2 menos reactivo que el peroxinitrito hacia los boronatos.

Los compuestos derivados de boronatos han sido particularmente alentadores debido a la reacción directa y sencillez en su mecanismo de reacción con oxidantes nucleofílicos como peroxinitrito. Se han reportado en la literatura derivados de boronatos unidos a diferentes fluoróforos, como derivados de cumarinas (110), fluoresceínas modificadas (116), derivados de benzotiazoles (117), pirenos (118), entre otros.

En el desarrollo de esta Tesis nos centramos en fluoróforos derivados de cumarinas (Capítulo 1, Parte 1) y de fluoresceína (Capítulo 1, Parte 2), Figura 8.

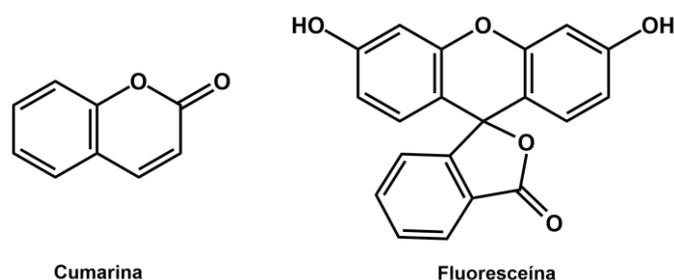


Figura 8. Estructura química de cumarinas y fluoresceína.

Exploramos estas dos familias de fluoróforos acoplados a ácidos o ésteres borónicos, y analizamos sus diferentes propiedades fisicoquímicas. Evaluamos cómo modificaciones estructurales alteran sus propiedades espectroscópicas, además de generar la posibilidad de dirigirlos a sitios celulares específicos.

7. Sistemas detoxificantes no enzimáticos de peroxinitrito

Además de los sistemas enzimáticos endógenos que hacen frente a los efectos tóxicos del peroxinitrito, mencionados arriba como glutatión peroxidasa, o peroxirredoxinas (constituyendo estas últimas el mecanismo antioxidante endógeno principal para la detoxificación catalítica de peroxinitrito, debido a su alta concentración, su constante de velocidad extremadamente rápida y su abundante distribución en varios compartimentos celulares), se han evaluado una gran cantidad de compuestos sintéticos como estrategias farmacológicas para evitar o disminuir los efectos tóxicos de peroxinitrito y/o de sus radicales derivados (119).

Por ejemplo, el ácido úrico ha sido ampliamente estudiado como modulador de los efectos del peroxinitrito, siendo capaz de reaccionar con sus radicales derivados pero su reacción directa es muy lenta, Figura 9. Para ser eficaces en sistemas biológicos los compuestos deben superar la velocidad de las reacciones de peroxinitrito con otros blancos biológicos. Compuestos conteniendo tioles como mercaptoalquilguanidinas y *N*-acetilcisteína, se ha visto que disminuyen la formación de 3-nitrotirosina, sin embargo estos compuestos tienen efectos adicionales que pueden complicar la interpretación de resultados. El ebselen y otros compuestos conteniendo selenio, también mostraron mejorías en varios modelos de inflamación neutralizando efectos del peroxinitrito, Figura 9. (66, 76, 119)

Aunque la lista de compuestos con potenciales efectos detoxificantes de peroxinitrito *in vitro* es larga, para la mayoría de ellos las constantes de velocidad de sus reacciones son bajas y su acción puede atribuirse a la reacción con los radicales secundarios ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}_2$, $\text{CO}_3^{\cdot-}$). Es poco probable que la mayoría reaccionen efectivamente como eliminadores de peroxinitrito *in vivo* y, por lo tanto, su potencial terapéutico como agentes neutralizantes de peroxinitrito es bajo.

Las porfirinas metálicas son una clase de compuestos de coordinación ampliamente estudiadas, Figura 9. El peroxinitrito puede dar reacciones bimoleculares rápidas con centros de metales de transición, que se comportan como el ácido de Lewis de la forma aniónica en procesos redox de uno o dos electrones. Las metaloporfirinas pueden atenuar los efectos tóxicos del peroxinitrito *in vitro* e *in vivo* (66).

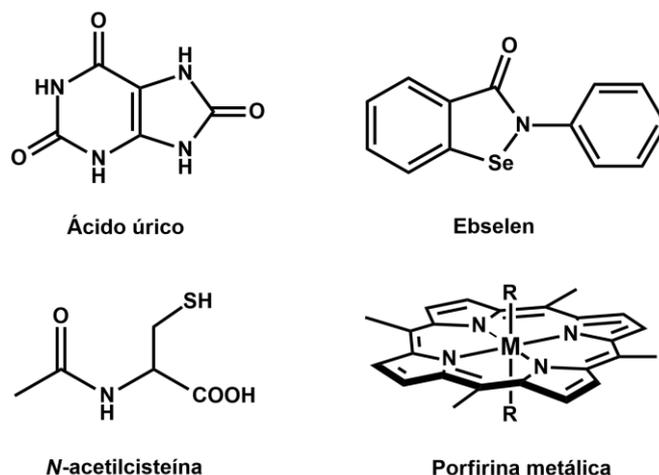


Figura 9. Estructuras químicas de compuestos orgánicos reportados con potenciales efectos detoxificantes de peroxinitrito. M, metal: Fe, Mn.

Otro grupo de especial interés para nuestro trabajo y cuyo rol en la protección de la oxidación de lípidos mediada por peroxinitrito ha sido ampliamente estudiada (120, 121), son γ -tocoferol, la forma principal de vitamina E en la dieta, y α -tocoferol, la forma principal de los suplementos vitamínicos (Figura 10). En el próximo punto discutiremos con más detalle la relevancia de estos antioxidantes lipofílicos y su implicancia en la presente tesis.

8. Antioxidantes lipofílicos: Tocoferoles

La vitamina E es una mezcla de ocho estructuras diferentes α , β , γ , y δ -tocoferol y α , β , γ , y δ -tocotrienol relacionadas entre sí, Figura 10. Todos incluyen un anillo cromano soportando un hidroxilo y una cadena lateral hidrofóbica isoprenoide de 13 átomos de carbono. Es el antioxidante lipofílico más importante en seres vivos.

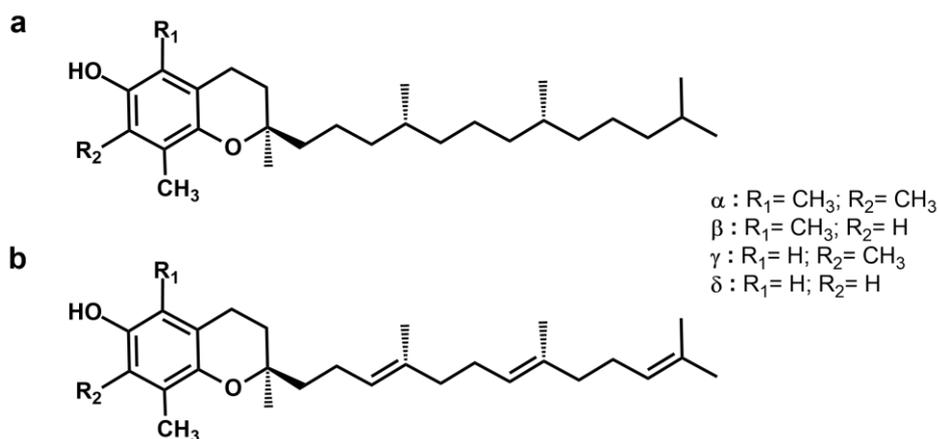
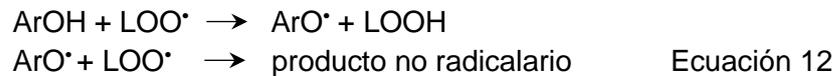


Figura 10. Compuestos fenólicos relacionados estructuralmente que componen la vitamina E, a) tocoferoles y b) tocotrienoles.

Entre ellas el α -tocoferol es la especie que se encuentra en mayor concentración en plasma tras la ingesta de vitamina E. A pesar de que todas las formas son igualmente absorbidas en el intestino, la proteína transferidora de α -tocoferol (α -TTP), selecciona específicamente al α -tocoferol sobre las otras formas de vitamina E para ser incorporada en la VLDL, por lo que clásicamente se ha considerado al α -tocoferol como la especie que produce la mayor actividad biológica *in vivo* (122).

La función antioxidante de la vitamina E se atribuye a su capacidad de protección del organismo contra el ataque de radicales peroxilo, derivados de los ácidos grasos (productos principales de la peroxidación lipídica) terminando las reacciones radicalarias en cadena que se producen, reaccionando rápidamente con dichos radicales, y formando así productos no radicalarios (123), Ecuación 12.



Se ha visto que la capacidad de atrapar radicales peroxilo es máxima en α -tocoferol respecto a los otros tocoferoles.

En los últimos 30 años se han realizado varios ensayos clínicos, donde se han examinado los posibles efectos preventivos de la suplementación con vitamina E en el contexto de varias morbilidades. Los resultados de estos estudios han sido decepcionantes, incluso con algunos sugiriendo la generación de efectos adversos (124). Todos estos ensayos se han centrado exclusivamente en el rol preventivo del α -tocoferol, por ejemplo:

i) En ensayos clínicos preventivos como *The Finnish Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study* (ATBC), se estudió la suplementación a bajas dosis de α -tocoferol (50 mg/día) en la incidencia de diferentes tipos de cáncer. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas con la suplementación de α -tocoferol respecto al grupo control. Adjudicando los resultados a la baja dosis administrada (125).

ii) El ensayo clínico preventivo *Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial* (SELECT) midió los efectos de la administración de altas dosis de α -tocoferol (400 mg/día) en el riesgo de contraer cáncer en un gran número de hombres. En este ensayo, contrario a las expectativas, se observó un aumento significativo en la incidencia de cáncer de próstata en hombres que consumían 400 mg/día de α -tocoferol (126). Esto podría reflejar la carcinogenicidad de altas dosis de α -tocoferol, pero también se podría asociar el aumento en la incidencia de cáncer de próstata con la disminución de los niveles de γ -tocoferol en sangre causados por la suplementación con α -tocoferol (124, 127).

iii) El estudio *Heart Outcomes Prevention Evaluation* (HOPE), un gran ensayo clínico aleatorio, doble ciego evaluando eventos cardíacos, no solo no encontró asociación entre la suplementación con α -tocoferol y eventos cardiovasculares, sino que análisis de subgrupos mostraron un aumento estadísticamente significativo del riesgo de eventos de insuficiencia cardíaca, siguiéndose hasta 7 años después del período del estudio inicial (128). Nuevamente, mientras que la suplementación con α -tocoferol puede no estar directamente relacionado a eventos cardíacos, estudios experimentales sugieren que la supresión del γ -tocoferol puede conducir a un riesgo cardiovascular.

Varios autores especialistas en el tema sugieren que debido a que la suplementación de α -tocoferol en altas dosis disminuye las concentraciones plasmáticas de γ -tocoferol, la suplementación de altas dosis de α -tocoferol debería reconsiderarse. Suplementos de α -tocoferol a dosis típicas (400 UI) utilizadas en ensayos clínicos disminuye el γ -tocoferol sérico, por lo que los ensayos clínicos que estudian la suplementación con α -tocoferol podrían reflejar los efectos de la disminución del γ -tocoferol sérico (127, 129). De hecho, un estudio que involucra la suplementación conjunta de α -tocoferol (800 mg/día) + γ -tocoferol (800 mg/día) en pacientes con Síndrome Metabólico, demuestran mejoras en los biomarcadores de estrés nitroxidativo, e inflamación (130). En otro estudio en voluntarios sanos con suplementación diaria de γ -tocoferol (100 mg/día o 200 mg/día, según el grupo), se observa una mejoría del perfil lipídico y reducción de la agregación plaquetaria, lo que llevaría a una disminución del riesgo de eventos trombóticos (131).

La estructura del γ -tocoferol le da propiedades químicas exclusivas, a diferencia del α -tocoferol. El γ -tocoferol es capaz de atrapar radicales $\cdot\text{NO}_2$ derivados de peroxinitrito, generando 5-nitro- γ -tocoferol, debido a que esta posición está libre a diferencia del α -tocoferol donde está ocupada por un grupo metilo (132), Figura 11.

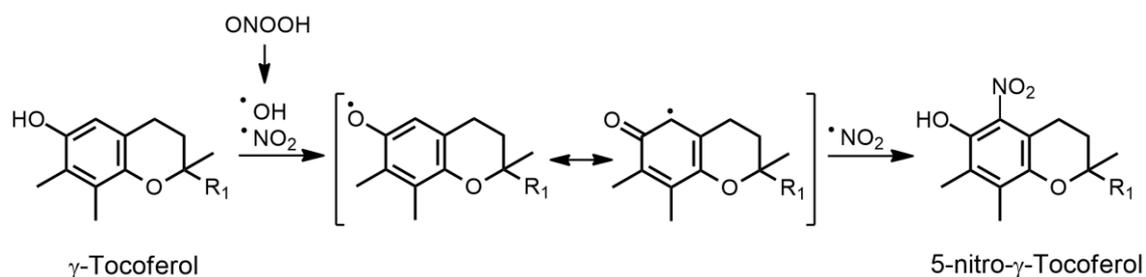


Figura 11. Atrapamiento de radicales derivados del peroxinitrito por γ -tocoferol, mediante nitración dando el producto 5-nitro- γ -tocoferol. $\text{R}_1 = (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_3)_3\text{CH}_3$. Adaptado de (132).

Además, se ha reportado que el γ -tocoferol reacciona en la fase lipídica con $\cdot\text{NO}_2$ para producir $\cdot\text{NO}$, lo que sugeriría una importante función del γ -tocoferol *in vivo*, previniendo el daño por $\cdot\text{NO}_2$ y liberando $\cdot\text{NO}$ al medio, Figura 12 (133). Mientras que el α -tocoferol requiere luz ($h\nu$) para generar $\cdot\text{NO}$ a partir de $\cdot\text{NO}_2$, por lo que *in vivo* sería poco probable.

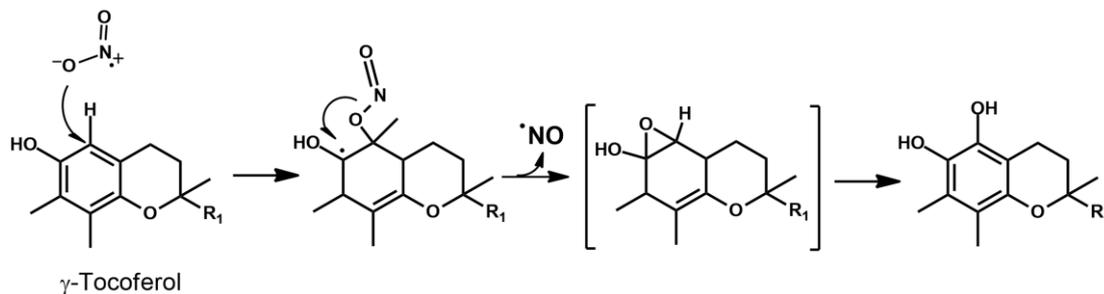


Figura 12. Mecanismo propuesto para la formación de $\cdot\text{NO}$ a partir de γ -tocoferol y $\cdot\text{NO}_2$, $\text{R}_1 = (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_3)_3\text{CH}_3$. Adaptado de (133).

Por lo tanto, uno de los objetivos de esta Tesis que se describe en el Capítulo 3, es el desarrollo de una nueva clase de compuestos derivados de tocoferoles acoplados a ésteres borónicos, con una mejor capacidad antioxidante que actúen previniendo el daño nitroxidativo, permitiendo el estudio y tratamiento de disfunciones redox. Nos centraremos en el éster borónico del derivado de cadena corta del γ -tocoferol, y lo compararemos con el éster borónico del α -tocoferol.

Objetivos

Objetivo general

En este trabajo nos centraremos en la investigación y desarrollo de sondas moleculares derivadas de boronatos diseñadas como herramientas para la detección y cuantificación de peroxinitrito tanto *in vitro* como en sistemas celulares.

Además, estudiaremos el mecanismo de oxidación de ácidos y/o ésteres borónicos con oxidantes de relevancia biológica.

Por último, se trabajará en el desarrollo de una nueva clase de compuestos boronados para modular el daño nitrooxidativo.

Objetivos específicos:

1. Diseño y síntesis de derivados boronados de cumarinas y fluoresceína. Caracterización fisicoquímica y biológica de los compuestos generados. Validación como sondas en la detección y cuantificación de peroxinitrito. (Capítulo 1).
2. Estudio del mecanismo de oxidación de sondas derivadas de boronatos con oxidantes de relevancia biológica. Identificación del origen del átomo de oxígeno que se incorpora en los productos oxidados. (Capítulo 2).
3. Diseño y síntesis de nuevos compuestos boronados de tocoferoles y análogos con mejorada capacidad antioxidante, y estudio de la modulación del daño nitrooxidativo. (Capítulo 3).

Capítulo 1

Desarrollo de Sondas fluorescentes para la detección de peroxinitrito

Parte 1. Derivados de cumarina

1.1 CBA, CBE y modificaciones estructurales

1.2 Derivados de CBE dirigidos a la mitocondria con mejoras en las propiedades espectroscópicas: MitoCT

Parte 2. Derivados de fluoresceína

2.1 Fluoresceína-boronato (FI-B)

2.2 Otras aplicaciones de FI-B: detección de hidropéroxidos proteicos

2.3 Validación de la sonda comercial MitoPY1 para la detección de peroxinitrito

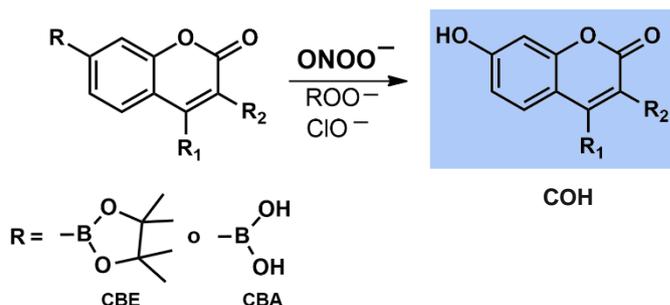
Capítulo 1. Parte 1.1

1.1. Síntesis, caracterización fisicoquímica de CBA y CBE, y modificaciones estructurales

Introducción y estrategia experimental

El ácido cumarin-7-borónico (**CBA**) fue descrito como una sonda fluorescente para la detección de especies oxidantes nucleofílicas (Esquema 4), inicialmente reportado por Du y colaboradores para la detección de H_2O_2 (134), y más tarde por el grupo de Kalyanaraman en la detección de peroxinitrito (110). En esta sección se describirán los estudios que muestran que su éster precursor, el éster pinacolínico del ácido cumarin-7-borónico (**CBE**) (Esquema 4) obtenido en dos pasos de reacción con alto rendimiento global ($R_{\text{Global}} = 77\%$), reacciona extremadamente rápido con peroxinitrito, reaccionando un millón de veces más rápido que con H_2O_2 . La constante cinética obtenida para la reacción de CBE con peroxinitrito es del mismo orden de la reportada para CBA, $k_{\text{CBE}} = 1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabla 1) y presentan idéntico comportamiento. Por lo que se centró el trabajo en el éster borónico como agrupamiento electrofílico capaz de reaccionar con oxidantes nucleofílicos, en especial peroxinitrito.

Luego, se trabajó en modificaciones estructurales para mejorar las propiedades de CBE, como dirigirla a un sitio subcelular específico, en particular la matriz mitocondrial uno de los principales sitios de producción de peroxinitrito. El diseño de la ruta sintética involucra la generación de la cumarina haloalquil sustituida, y posterior precipitación de la sal de fosfonio. Los cationes lipofílicos como trifenilfosfonio tienen la capacidad de concentrarse en la matriz mitocondrial (135). Para esto se exploraron tres estrategias sintéticas diferentes: monohalogenación radicalar, clorometilación de Blanc y condensación de Pechmann. Además, se trabajó en la modulación de sus propiedades espectroscópicas dado que las longitudes de onda de excitación y emisión de CBE están en el rango UV ($\lambda_{\text{exc}} = 332 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$), y así poder ampliar su utilización a equipamientos comúnmente utilizados para ensayos celulares como microscopía de epifluorescencia o citometría de flujo. Se realizaron estudios *in silico* simulando espectros de excitación de una serie de derivados de cumarina y aquellos compuestos con una longitud de onda de excitación teórica máxima cercana a 470 nm fueron sintetizados mediante condensación de Pechmann.



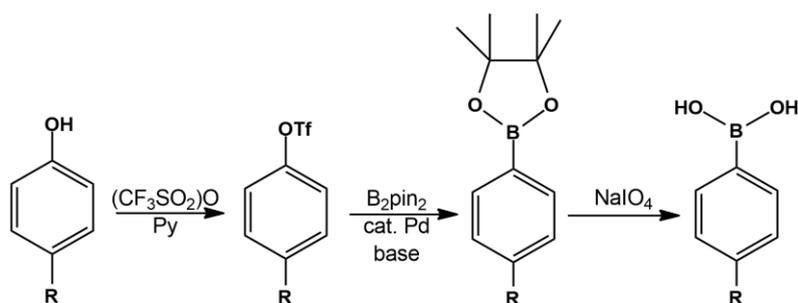
Esquema 4. Oxidación de CBE o CBA para dar el producto oxidado fluorescente 7-hidroxycumarina (COH).

1. CBA y CBE

Resultados y Discusión

1.1. Síntesis y caracterización espectroscópica de CBA y CBE

Para la preparación de los derivados arilboronatos se generó inicialmente el derivado correspondiente trifluorometanosulfonato. Posteriormente, este derivado se trató con *bis*(pinacolato)diboro en presencia de catalizador de Pd y base, en un disolvente adecuado (reacción de borilación de Suzuki-Miyaura, (136)) para formar el correspondiente éster de ácido borónico, el cual se transformó en el respectivo ácido borónico mediante ruptura oxidativa con NaIO_4 , Esquema 5.



Esquema 5. Ruta sintética general para la obtención de arilboronatos.

Siguiendo la ruta sintética general mostrada, se parte del reactivo comercial 7-hidroxycumarina (umbeliferona) y se sigue los pasos anteriormente mencionados (Esquema 6).

Para la primera etapa que involucró la obtención del grupo funcional trifluorometansulfonato en posición 7 de la 7-hidroxycumarina se ensayaron dos condiciones. En la primera condición se utilizó 4-dimetilaminopiridina (DMPA) como base y se dejó agitando a temperatura ambiente, sin embargo no se da la reacción en un tiempo apreciable (134). Esto pudo deberse a que el agregado del anhídrido trifluorometansulfónico al balón de reacción se realizó a temperatura ambiente generándose una reacción exotérmica, con la concomitante descomposición del reactivo altamente sensible. Posteriormente, se ensayó la reacción a 0°C y utilizando piridina como base (una base menos fuerte que DMPA), obteniéndose el producto de interés **1** de manera casi cuantitativa y de tal pureza que no es necesaria una purificación posterior. (137)

A continuación se realizó la borilación del compuesto **1** con *bis*(pinacolato)diboro, catalizador de Pd y base según la reacción de borilación de Suzuki-Miyaura (136), donde se exploraron diferentes tipos de calentamiento:

En primera instancia se realizó la reacción de borilación con calentamiento convencional en un baño de aceite a 80°C , y luego de 6 horas y 30 min de reacción se evidenció por TLC desaparición total del reactivo de partida y se detuvo la reacción. De esta manera, se obtuvo el éster borónico de la cumarina (**CBE**), con muy buen rendimiento.

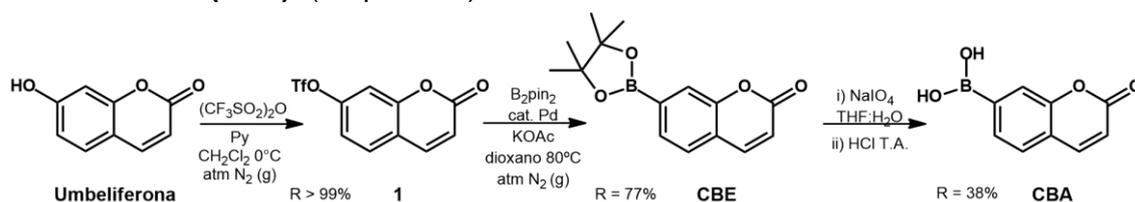
Posteriormente, en un intento por disminuir el tiempo de calentamiento se ensayó la reacción de borilación utilizando como forma de calentamiento la radiación de microondas, utilizando un reactor de microondas multimodo (400W 2h y 30min, 80°C)

(134). Sin embargo, mediante monitorización por TLC se evidenció que la reacción alcanza determinado punto, que a pesar de continuar irradiando e incluso aumentar la potencia y temperatura (500W, 1h y 30 min, 100°C), ésta no avanzó.

Por lo tanto, al comparar las diferentes formas de calentamiento en la reacción de borilación, donde se obtuvo un R = 77 % para calentamiento convencional, a diferencia de un grado de avance < 50 % evidenciado por TLC para el calentamiento por irradiación de microondas, hizo que el método de calentamiento convencional sea el de elección para este tipo de borilaciones.

Si bien el calentamiento por irradiación de microondas es ampliamente utilizado debido a que disminuye los tiempos de reacción, en este caso el poco avance de la reacción pudo ser debido a que no se alcanzó la atmósfera inerte en el reactor del microondas necesaria para la borilación.

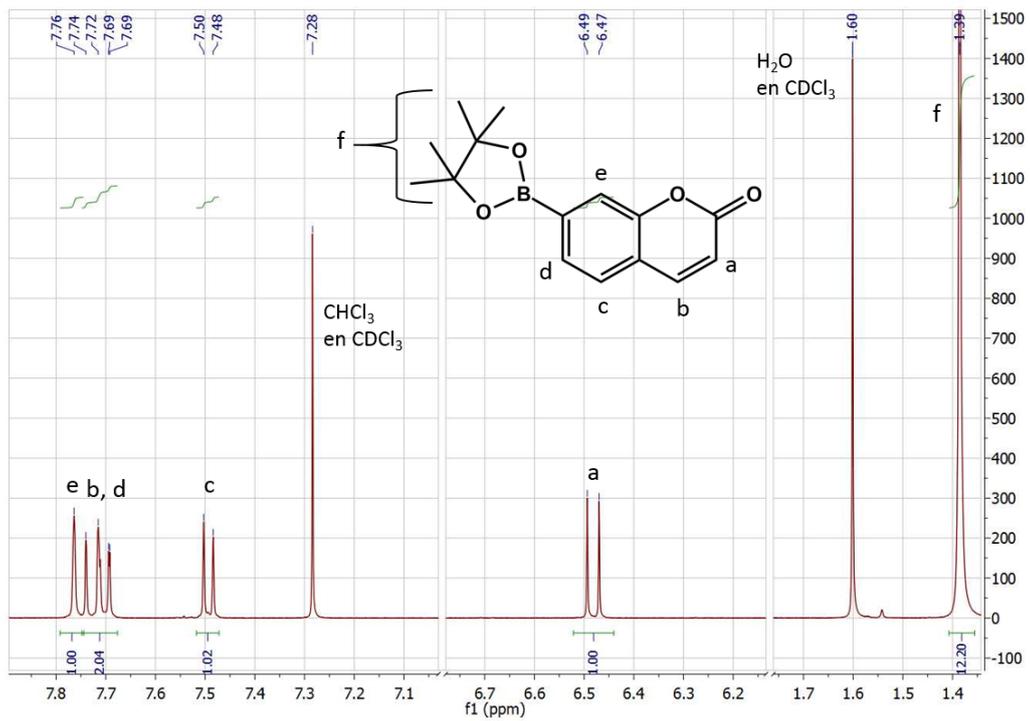
Una vez obtenido el éster borónico de la cumarina, mediante ruptura oxidativa con periodato de sodio e hidrólisis ácida en una segunda etapa se obtuvo el ácido borónico de la cumarina (**CBA**). (Esquema 6).



Esquema 6. Ruta sintética optimizada para la obtención de CBA y CBE.

Los productos CBE y CBA fueron completamente caracterizados y están de acuerdo con los datos reportados en literatura (27, 134). La espectroscopía de RMN y MS confirman la estructura química de ambos productos, y en la Figura 13 se muestran los espectros de ^1H -RMN para CBE (panel a) y CBA (panel b) obtenidos con alta pureza (> 99 %).

a



b

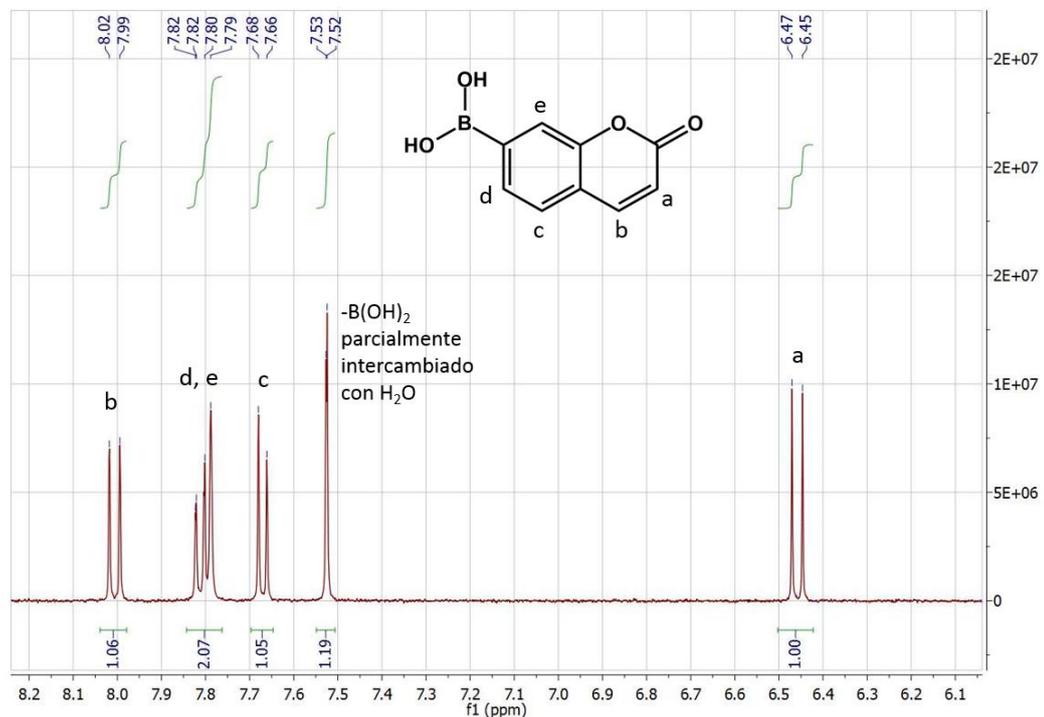
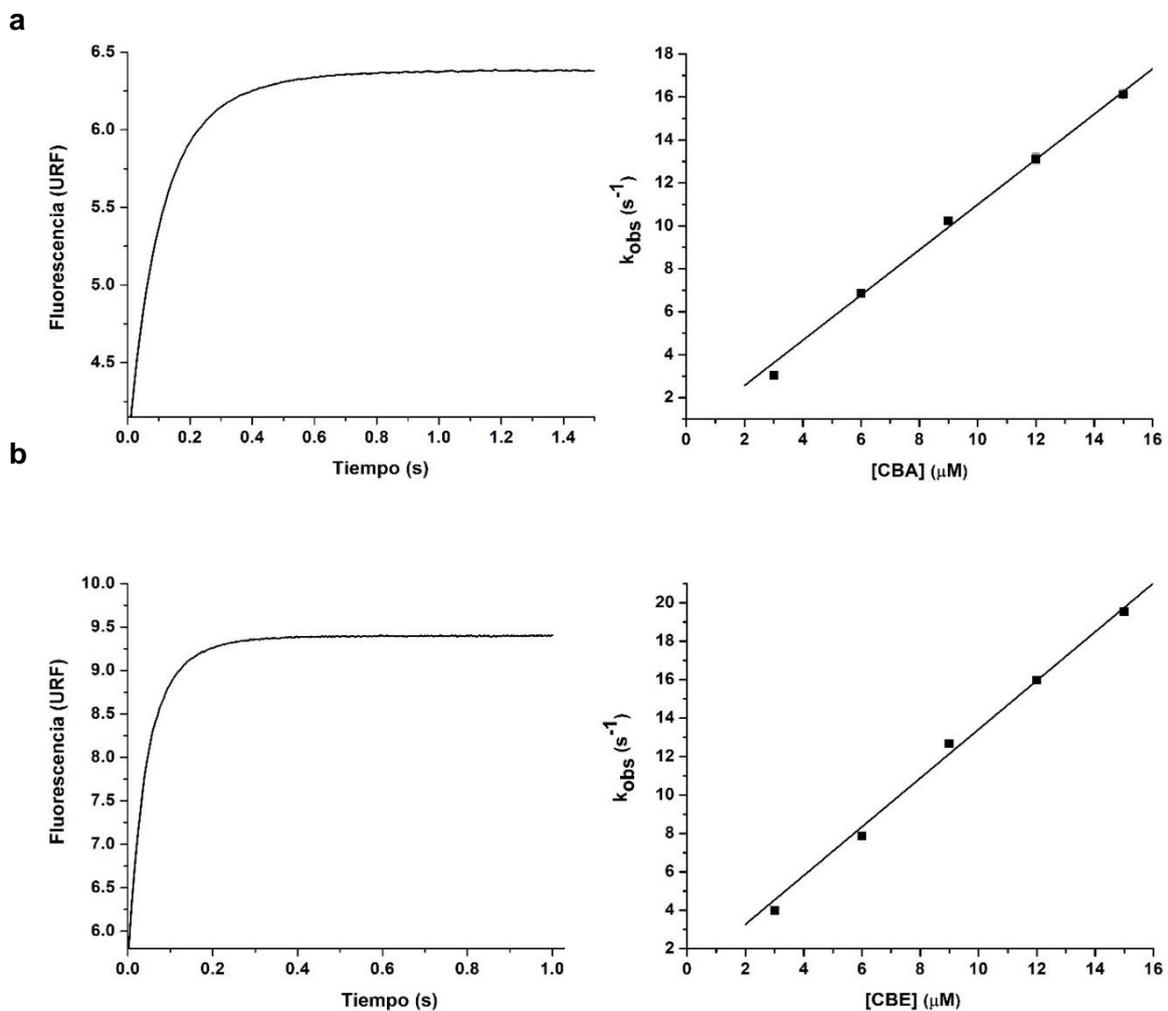


Figura 13. Espectro de ¹H-NMR de CBE (panel a) y CBA (panel b), registrados en un equipo Bruker DPX-400 (400 MHz) utilizando CDCl₃ y (CD₃)₂CO como disolventes, respectivamente. Se muestran las señales asignadas para cada grupo de protones. No se observan señales en la región entre 7.10 a 6.70 ppm y 6.20 a 1.70 ppm para el CBE, ni por debajo de 6.10 ppm para CBA.

1.2. Oxidación de CBA y CBE por oxidantes de relevancia biológica

Análisis cinético

Una vez obtenidos los compuestos de interés ya que ambos poseen tanto un agrupamiento éster borónico (CBE) como ácido borónico (CBA), determinamos las constantes cinéticas de la reacción de CBA y CBE con peroxinitrito y H_2O_2 a 25°C y pH 7.4 bajo condiciones de *pseudo*-primer orden (Figura 14 y Tabla 1). Ambos oxidantes fueron capaces de oxidar tanto a CBA, como ya se había reportado previamente (110), como a CBE determinado en este trabajo. Sin embargo, la velocidad de reacción de ambas sondas hacia peroxinitrito es 10^6 veces más rápida que para H_2O_2 . La constante cinética obtenida para la reacción de CBE con peroxinitrito es del mismo orden de la obtenida para el CBA, $k \sim 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabla 1) y presenta idéntico comportamiento (Figura 14, paneles a y b).



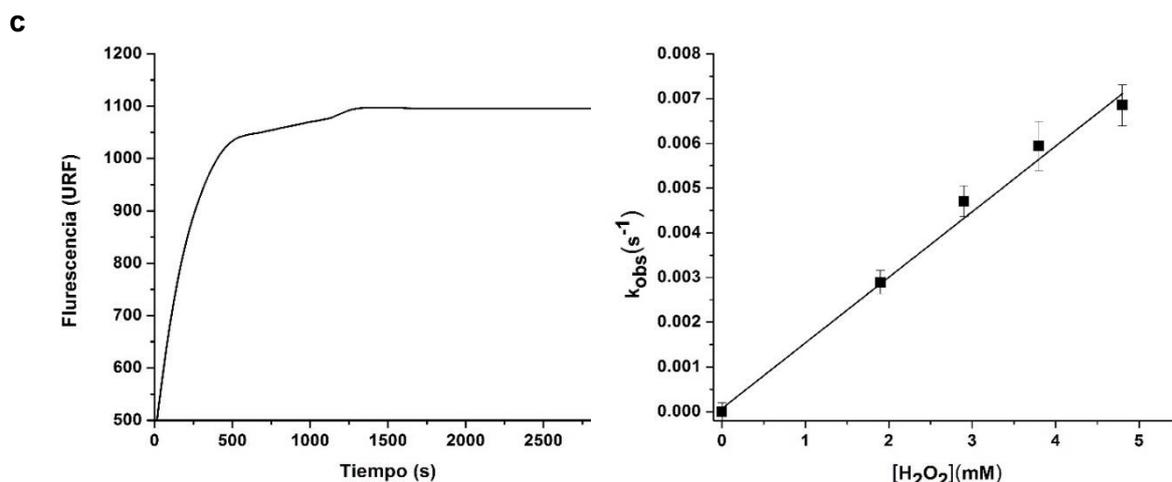


Figura 14. Cinética de la reacción de CBA y CBE con peroxinitrito y H₂O₂, determinaciones realizadas a 25°C y pH 7.4 (a) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de CBA (15 μM) por peroxinitrito (0.3 μM), registrada en un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped-flow). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de CBA en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). (b) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de CBE (15 μM) por peroxinitrito (0.3 μM), registrada en un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped-flow). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de CBE en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). (c) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de CBE (10 μM) por H₂O₂ (3 mM), registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de H₂O₂ en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). Todas las determinaciones se realizaron en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4, conteniendo 0.1 mM de DTPA a 25°C, con $\lambda_{exc} = 332$ nm; $\lambda_{em} = 470$ nm, excepto para las determinaciones realizadas en stopped-flow donde mediciones de fluorescencia se realizaron con $\lambda_{ex} = 332$ nm y se recoge emisión total).

Cabe destacar, que al realizar las determinaciones con peroxinitrito este oxidante fue utilizado en cantidades sub-estequiométricas respecto a la sonda, mientras que para las determinaciones de H₂O₂ se tuvo que utilizar este oxidante en gran exceso debido a su cinética muy lenta.

Tabla 1. Constantes cinéticas determinadas para la reacción entre CBA y CBE con diferentes oxidantes a 25°C a pH 7.4.

Oxidante	CBA k (M ⁻¹ s ⁻¹)	CBE k (M ⁻¹ s ⁻¹)
Peroxinitrito	(1.1 ± 0.4) × 10 ⁶	(1.3 ± 0.6) × 10 ⁶
H ₂ O ₂	(1.5 ± 0.2) ^(*)	(1.47 ± 0.56)

(*) Reportado en la literatura por el grupo de Kalyanaraman *et al.* (110)

Conclusiones parciales

El éster del ácido borónico de cumarina (CBE) fue generado en 2 pasos de reacción con un alto rendimiento global ($R \sim 77\%$), y el ácido borónico de cumarina (CBA) en 3 pasos de reacción con buen rendimiento global ($R \sim 29\%$). Las técnicas sintéticas reportadas por Du *et al.* donde describen por primera vez la síntesis del éster borónico de cumarina (134), carecen de suficiente reproducibilidad por lo que no fue posible obtener CBE siguiendo esa ruta. Sin embargo, logramos optimizar la síntesis tanto del éster como del ácido borónico de la cumarina (CBE y CBA), acortando tiempo de reacción y mejorando condiciones en cuanto a manipulación y utilización de disolventes más amigables con el medio ambiente. Si bien no obtuvimos mejores resultados con una forma más eficiente de calentamiento como MW, si fue posible optimizar la reacción, aislamiento y purificación de los productos utilizando disolventes menos tóxicos y más amigables para el ambiente que los que estaban reportados.

Determinamos la constante de la reacción de ambos compuestos con peroxinitrito, obteniendo el mismo valor de $k_{\text{CBA}/\text{ONOO}^-} = 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ que se reporta en literatura (110) y un valor de $k_{\text{CBE}/\text{ONOO}^-} = 1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ del mismo orden que el obtenido para CBA e idéntico comportamiento, demostrando que los boronatos reaccionan frente a peroxinitrito de manera extremadamente rápida. También determinamos la $k_{\text{CBE}/\text{H}_2\text{O}_2} = 1.47 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, obteniendo un valor de constante de velocidad equivalente al reportado previamente para la reacción de CBA con H_2O_2 (110).

Es interesante destacar, que si bien el CBA (obtenido con 29% de rendimiento global) reacciona extremadamente rápido con peroxinitrito, su éster CBE reacciona de la misma manera, siendo éste obtenido en el paso previo de reacción (77% de rendimiento global), esto implica menor tiempo, menores costos y menor generación de desechos orgánicos. Además, el CBE es más lipófilico que el CBA por presentar grupos metilo en lugar de hidroxilos, lo que le puede dar una ventaja al atravesar membranas biológicas. Por lo tanto, decidimos continuar nuestro trabajo centrándonos en el éster borónico como agrupamiento electrofílico capaz de reaccionar con oxidantes nucleofílicos.

Contar con ambas sondas fluorescentes, CBE y CBA, en nuestro grupo de investigación fue un aporte importante que ayudó en el avance de diferentes líneas de trabajo referentes al estudio del estrés nitroxidativo, aportando al desarrollo de artículos originales como Demicheli *et al.* *Biochemistry* (2016), 55, 3403–3417, y Prolo *et al.* *Free Radical Biology and Medicine* 87 (2015) 346–355.

2. Modificaciones estructurales de CBE

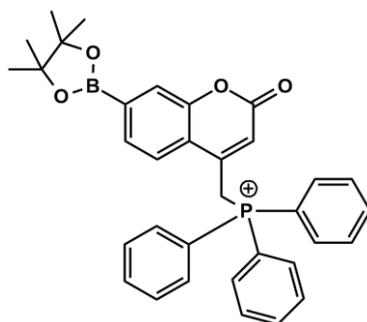
2.1. Modificaciones estructurales de CBE para dirigirlo a la matriz mitocondrial

El ácido cumarin-7-borónico (CBA) ha sido reportado como sonda fluorescente para la detección de especies nucleofílicas de relevancia biológica como H_2O_2 y peroxinitrito (110), reaccionando 10^6 veces más rápido con el último. En la sección 1.2 demostramos que su éster precursor CBE reacciona de manera idéntica al derivado de ácido borónico CBA, con ambos oxidantes. Por lo tanto, el agrupamiento éster borónico reacciona de la misma manera que su ácido borónico frente a especies oxidantes de relevancia biológica, y es obtenido en un paso previo de reacción.

En condiciones donde se generan varios oxidantes, los boronatos reaccionan preferencialmente con peroxinitrito debido a su cinética más favorable, como ha sido reportado por nosotros y otros grupos (27, 109, 111).

Dado que las mitocondrias son uno de los principales sitios de producción de especies reactivas, hemos trabajado en modificaciones estructurales de CBE para dirigirlo a la matriz mitocondrial. La estrategia se basa en la habilidad de cationes lipofílicos como el trifenilfosfonio ($-\text{P}(\text{Ph}_3)^+$) de atravesar la membrana mitocondrial conducido por su diferencia de potencial ($\Delta\psi < 0$), ingresando a la matriz mitocondrial haciendo que la sonda se concentre dentro de este organelo (~ 100 veces)(135) (138).

Por lo tanto, nos propusimos desarrollar una nueva sonda fluorescente acoplando CBE covalentemente a trifenilfosfonio para la detección de peroxinitrito dirigida a la matriz mitocondrial, llamada *MitoCBE*, Figura 15.

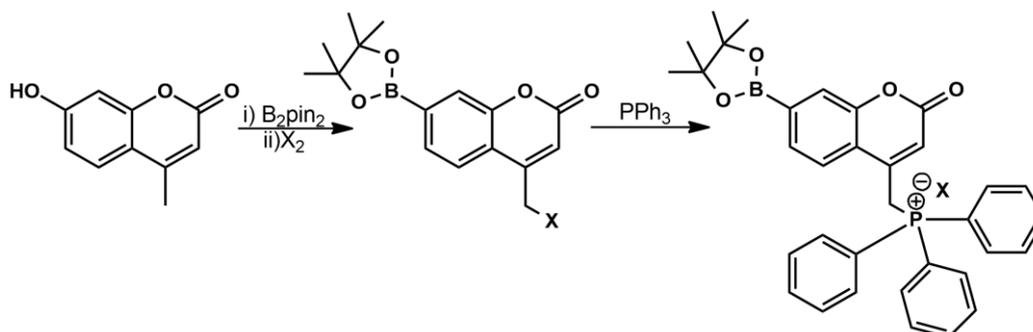


MitoCBE

Figura 15. Estructura química de MitoCBE.

Resultados y Discusión

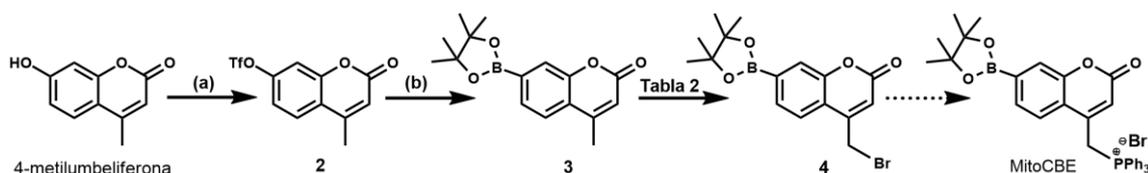
La ruta general de obtención de MitoCBE se basa en la borilación y monohalogenación de 4-metilumbeliferona y posterior transformación en la sal de fosfonio correspondiente, Esquema 7. Para ello trabajamos en tres estrategias sintéticas:



Esquema 7. Ruta general para la obtención de MitoCBE

Estrategia I: Monohalogenación radicalar del grupo metilo en posición 4.

Una primera estrategia sintética para acoplar covalentemente el catión trifenilfosfonio a CBE se muestra en el Esquema 8. A partir de 4-metilumbeliferona se generó el correspondiente triflato **2**, y éste se transformó en el compuesto boronado **3**, en una primera etapa. Posteriormente, se sometió a condiciones de monohalogenación radicalaria, para finalmente hacerlo reaccionar con trifenilfosfina precipitando la sal de fosfonio. Esquema 8.



Esquema 8. Síntesis del éster borónico **3**. (a) $(CF_3SO_2)_2O$, Py, CH_2Cl_2 $0^\circ C$, 1 h (R = 90%); (b) B_2pin_2 , dppf, $Pd(dppf)Cl_2$, KOAc, Dioxano, $80^\circ C$, 6h (R > 99%).

Una vez obtenido el éster borónico de 4-metilumbeliferona **3** en dos pasos de reacción, se ensayaron distintas condiciones mostradas en la Tabla 2 para la monohalogenación del grupo metilo en posición 4. Aunque se ensayaron diferentes condiciones de reacción, tales como diferentes iniciadores radicalares ($h\nu$, BPO), disolventes (H_2O , CCl_4), temperatura y tiempo no fue posible obtener el producto de interés por esta ruta, obteniéndose productos halogenados en el anillo aromático o dibromados sobre el metilo, evidenciado por espectroscopía de RMN (1H , ^{13}C , COSY, HSBC, HSQC) y espectrometría de masas (ESI).

Tabla 2. Condiciones ensayadas para la monohalogenación del grupo metilo del éster borónico **3** (Esquema 8).

Entrada	Reactivo/ Iniciador	Disolvente	Temp.	Tiempo (h)	Comentarios	Ref.
1	NBS/ <i>hν</i> 100W	H ₂ O	T.A.	7	No hay reacción. Problemas de solubilidad.	(139)
2	NBS/BPO, <i>hν</i> 200W	CCl ₄	T.A.	20	7% dibromado; 5% bromación del anillo	(140) ^(*)
3	NBS/BPO	CCl ₄	T.A.	20	8% dibromado; 2% bromación del anillo	(140) ^(*)
4	NBS/ <i>hν</i> 200W	CCl ₄	T.A.	24	No hay reacción.	(140) ^(*)

NBS: *N*-bromosuccinimida; BPO: peróxido de dibenzoilo; T.A.: temperatura ambiente.
(*) con modificaciones de la técnica.

Paralelamente, se repitieron las condiciones de reacción descritas en las entradas 2 a 4 de la Tabla 2, pero partiendo del correspondiente ácido borónico de **3**, sintetizado por ruptura oxidativa con NaIO₄, Esquema 9. En estas condiciones ensayadas tampoco se pudo obtener el producto de monohalogenación sobre el metilo en posición 4.

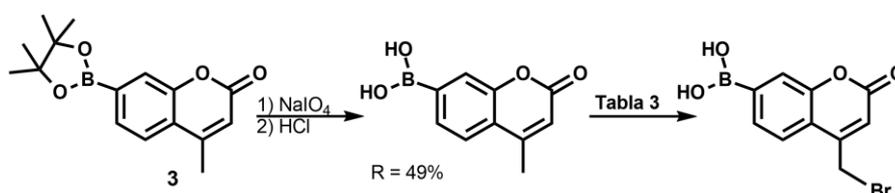


Tabla 3.

Entrada	Reactivo/ Iniciador	Disolvente /Temp.	Tiempo (h)	Comentarios	Ref.
1	NBS/BPO, <i>hν</i> 200W	CCl ₄ /T.A	20	7% dibromado; 7% bromación del anillo	(140) ^(*)
2	NBS/BPO	CCl ₄ /T.A.	23	7% dibromado; 2% bromación del anillo	(140) ^(*)
3	NBS/ <i>hν</i> 200W	CCl ₄ /T.A	24	R < 1%	(140) ^(*)

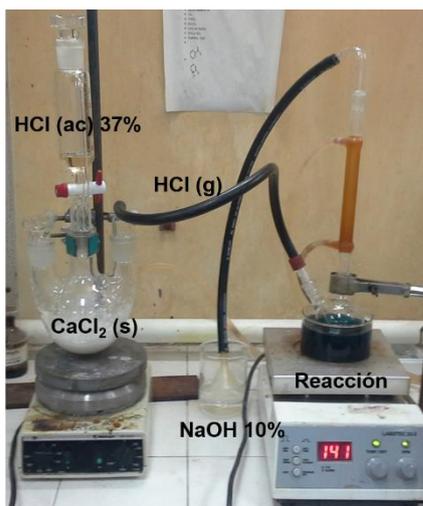
NBS: *N*-bromosuccinimida; BPO: peróxido de dibenzoilo; T.A.: temperatura ambiente.
(*) con modificaciones de la técnica.

Si bien obtuvimos el éster borónico de la 4-metilcumarina **3** con excelente rendimiento global ($R_{\text{global}} = 89\%$), en las condiciones ensayadas no fue posible obtener el compuesto de interés **4**.

Por lo tanto, se diseñó una nueva estrategia sintética.

Estrategia II: Clorometilación de Blanc en posición 3.

Debido a que pudimos obtener tanto el triflato **2**, como el éster borónico de la 4-metilcumarina **3** con excelente rendimiento (Esquema 8), nos planteamos realizar una clorometilación de Blanc, partiendo del triflato **2** o partiendo del boronato **3** (Esquema 10). La clorometilación de Blanc, llamada así en honor a Gustave Lois Blanc quien la describe por primera vez en 1923, utiliza formaldehído y HCl (g) generado *in situ*, catalizado por cloruro de zinc u otro ácido de Lewis para formar clorometilarilos o clorometilo soportado sobre un doble enlace (141).



Generación de HCl (g)(142):

El HCl (g) genera según la Ecuación 13. En un ecualizador se colocan 50 mL de HCl (ac) 37% comercial, y se conecta a un balón de dos bocas conteniendo 50 g de CaCl₂ con agitación magnética, y se deja caer el HCl (ac) gota a gota. La segunda boca con una salida para liberar el HCl (g) generado que se introduzca en el seno de la reacción de interés.



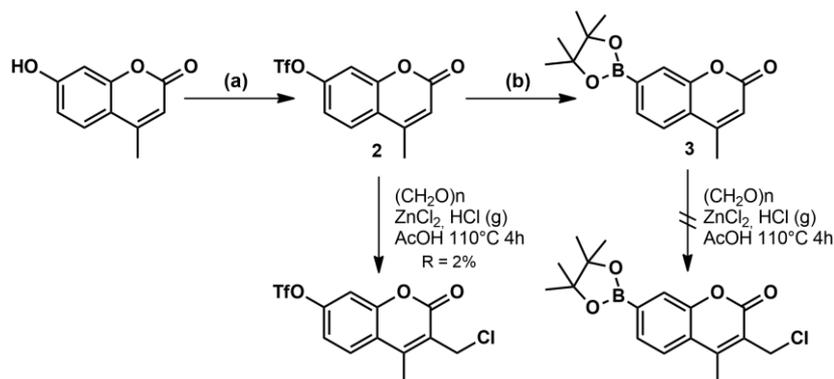
Alternativamente, se generó utilizando el mismo sistema que muestra la foto pero colocando 20 mL de H₂SO₄ cc en el ecualizador y dejando caer gota a gota sobre NaCl (50 g) colocado el balón, según la Ecuación 14:



En algunas de las condiciones ensayadas se colocó una trampa de H₂SO₄ cc entre la generación de HCl (g) y la reacción como deshidratante para secar el HCl (g).

Al realizar la reacción de clorometilación partiendo del éster borónico de 4-metilcumarina **3**, no se dió la reacción cuando se realizó a T.A. Sin embargo, al repetirla con calentamiento a reflujo se hidroliza el éster borónico al correspondiente ácido borónico en un 42 %, evidenciado por espectroscopía de ¹H-RMN.

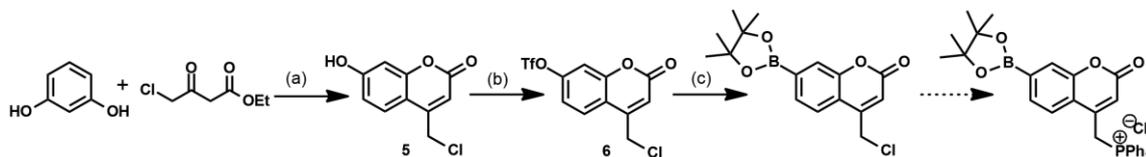
Por lo tanto, se realizó la misma reacción partiendo del triflato de 4-metilcumarina **2**, donde se obtuvo el compuesto de interés en muy bajo rendimiento (R = 2%), Esquema 10. Como la cantidad de masa obtenida fue muy poca para realizar el siguiente paso de obtención de la sal de fosfonio, se decidió explorar una tercer estrategia sintética.



Esquema 10. (a) $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{O}$, Py, CH_2Cl_2 0°C , 1 h (R = 90%); (b) B_2pin_2 , dppf, $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$, KOAc, Dioxano, 80°C , 6h (R > 99%).

Estrategia III: Condensación de Pechmann para dar 4-clorometilcumarina.

Dado que no fue posible obtener el producto monohalogenado mediante halogenación radicalar catalizada por luz del grupo metilo (Estrategia I), ni mediante clorometilación en posición 3 (Estrategia II), se cambió nuevamente la estrategia sintética según el Esquema 11. Se generó la cumarina halogenada **5** mediante reacción de condensación de Pechmann, reacción con un agente triflante para dar **6**, posterior borilación y finalmente generar la sal de fosfonio (Esquema 11).



Esquema 11. Ruta sintética para la obtención de MitoCBE. (a) H_2SO_4 cc, T.A., 2 h (R > 99%); (b) $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$, DIPEA, CH_3CN , T.A. 1 h (R = 33%); (c) B_2pin_2 , dppf, $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$, KOAc, Dioxano, 80°C , 6h (R < 5%).

La condensación de Pechmann fue descrita en 1884-1885 por Hans von Pechmann, un químico alemán, como una manera simple de sintetizar cumarinas a partir de un fenol y un ácido carboxílico o éster que contenga un grupo β -carbonilo llevada a cabo en medio ácido (143).

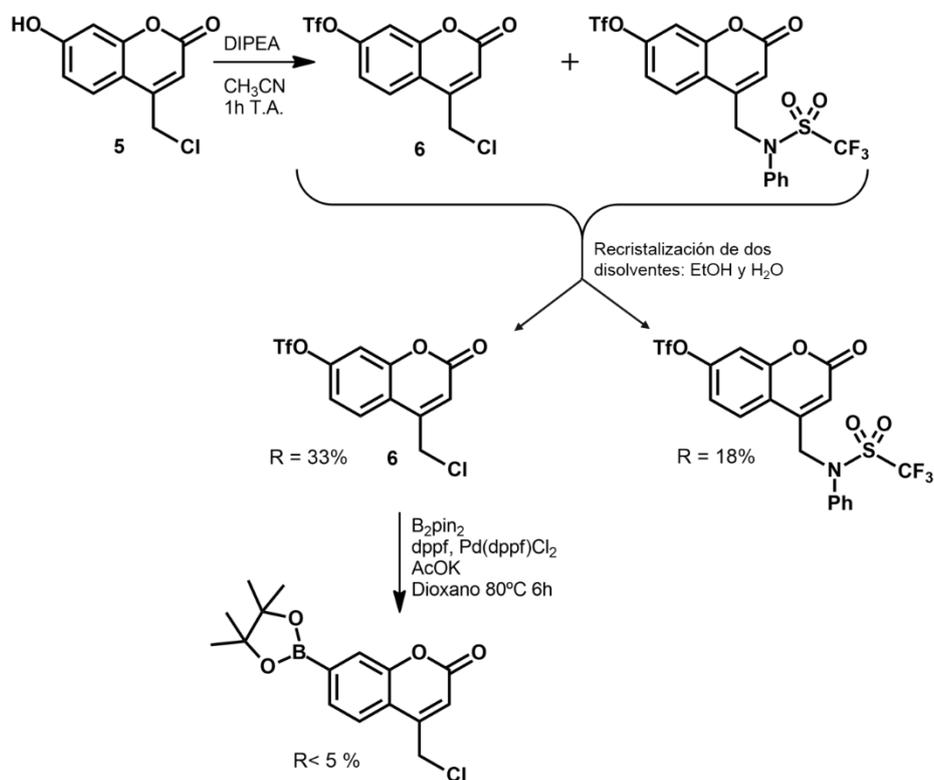
La 4-clorometil-7-hidroxicumarina **5** fue sintetizada por condensación de Pechmann entre un halo β -cetoéster y dihidroxibenceno en medio ácido de manera cuantitativa. Debido a la disponibilidad de reactivos, el halógeno incorporado fue un átomo de cloro proveniente del β -cetoéster. Luego, para generar el triflato en posición 7 de la 4-clorometil-7-hidroxicumarina **5** se exploraron dos estrategias diferentes: utilización de una base para desprotonar al H^+ fenólico, o el agregado de un ácido de Lewis para aumentar la electrofilia del anhídrido o la sulfonamida según el caso (Tabla 4). En la Tabla 4 se muestran las diferentes condiciones de reacción ensayadas.

Tabla 4. Condiciones ensayadas para la obtención de **6**, triflato de 4-clorometilcumarina.

Entrada	Ag. Triflante	Base/Ac. de Lewis	Disolvente	Tiempo/Temp.	Comentarios	Ref
1	(TfO) ₂ O	Py	CH ₂ Cl ₂ /DMF	4h T.A.	No hay reacción	(137) ^(*)
2	C ₆ H ₅ N(SO ₂ CF ₃) ₂	DIPEA	CH ₃ CN	1 h T.A.	R = 33 %	(144)
3	(TfO) ₂ O	Py	CH ₃ CN	90h T.A. 16 h Δ	R = 3 %	
4	(TfO) ₂ O	AlCl ₃	CH ₂ Cl ₂	68h T.A. 7 h Δ	No hay reacción	
5	C ₆ H ₅ N(SO ₂ CF ₃) ₂	AlCl ₃ / <i>p</i> -TsOH	CH ₂ Cl ₂	72 h 5 h Δ	No hay reacción	

(*) con modificaciones de la técnica.

Analizando las condiciones utilizadas, la mejor condición encontrada fue utilizar *N*-fenil-*bis*(trifluorometansulfonimida) como el agente triflante y DIPEA (*N,N*-diisopropiletilamina) recién destilada como base, obteniéndose el monotriflato de interés **6**, con un rendimiento de 33% (Tabla 4, Entrada 2). En estas condiciones también se generó un subproducto con un sustituyente *N*-feniltrifluorometilsulfonamida en la posición 4, el cual fue evidenciado por espectroscopía de RMN pero no fue posible su separación por técnicas cromatográficas. Posteriormente, pudo ser aislado por recristalización de dos disolventes en un 18% de rendimiento respecto al reactivo de partida, Esquema 12.


Esquema 12. Obtención y purificación del monotriflato de interés **6**.

A continuación, se realizó la borilación del compuesto **6**, bajo condiciones clásicas de acoplamiento de Suzuki-Miyaura con *bis*(pinacolato)diboro, en medio básico con catalizador de Pd, con muy bajo rendimiento (< 5 %). A pesar de purificaciones sucesivas por técnicas cromatográficas (cromatografía en columna y posterior TLC preparativa), no fue posible obtener el boronato con la pureza y masa suficiente como para seguir adelante con la obtención de la sal de fosfonio. Queda pendiente ensayar otras condiciones de borilación.

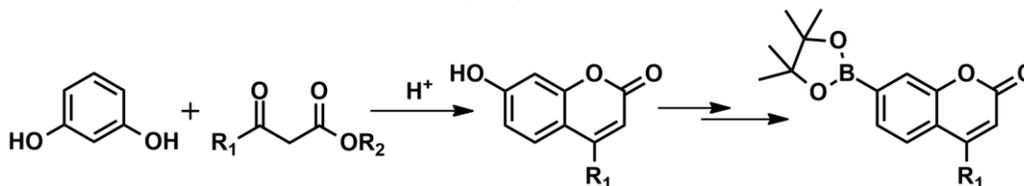
En suma, si bien se exploraron diferentes estrategias sintéticas, no fue posible la obtención del MitoCBE de interés, por lo que centramos los esfuerzos en otras modificaciones estructurales como se describe a continuación.

2.2. Modificaciones estructurales de CBE: modulación de sus propiedades espectroscópicas.

Si bien las sondas CBA y CBE han sido muy utilizadas para la detección de especies nucleofílicas, presentan ciertos inconvenientes debido a que la longitud de onda máxima de excitación y emisión de fluorescencia de la forma oxidada (7-hidroxicumarina, COH) están dentro del rango UV del espectro electromagnético (COH: $\lambda_{exc} = 332$ nm; $\lambda_{em} = 470$ nm). Estas propiedades limitan su utilización en metodologías habituales para ensayos celulares, como citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia en la mayoría de los laboratorios, donde no es posible iluminar o irradiar en el rango UV.

Sin embargo, modificando la estructura química de estas moléculas, es posible modular sus propiedades espectroscópicas de manera de que su longitud de onda de excitación y emisión sea en el rango UV-Vis del espectro electromagnético, y de esta manera ampliar su utilización a varias metodologías. Es así que nos propusimos mejorar sus propiedades espectroscópicas mediante modificaciones estructurales y así generar derivados de cumarinas, con mayores deslocalizaciones y soportando grupos dadores de electrones.

En primera instancia, realizamos estudios *in silico* simulando espectros de excitación de una serie de derivados de cumarina. Aquellos compuestos con una longitud de onda de excitación teórica máxima cercana a 470 nm fueron seleccionados para la síntesis mediante condensación de Pechmann (Esquema 13).



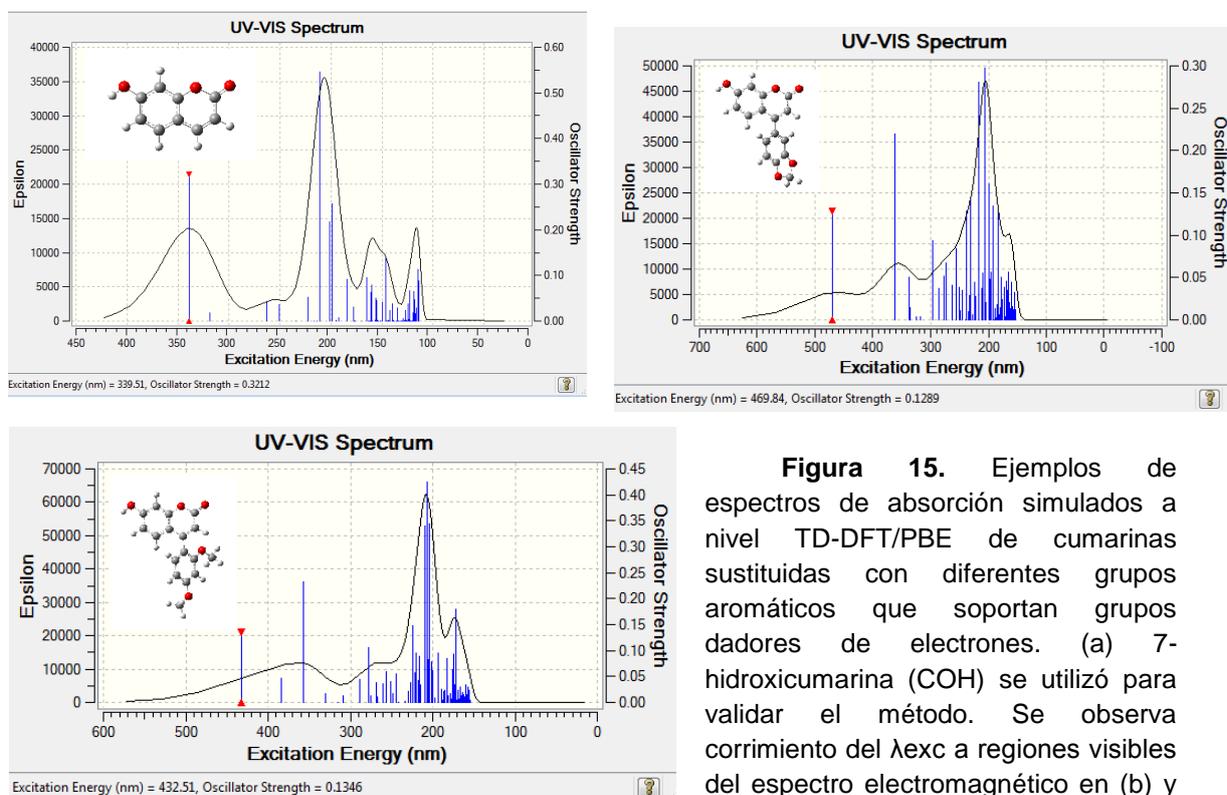
Esquema 13. Síntesis de cumarinas por condensación de Pechmann a partir de 1,3-benzenodiol y un β -cetoéster. Posterior borilación para obtener derivados de CBE.

Los estudios *in silico* se realizaron en colaboración con la Dra. Alicia Merlino del Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

2.2.1 Estudios *in silico* de las propiedades espectroscópicas

Mediante modificaciones estructurales con sistemas conjugados es posible modular las propiedades espectroscópicas. Por lo tanto, previamente se realizaron estudios *in silico* a nivel TD-DFT/PBE (Time-Dependent Density Functional Theory) con el Software Gaussian 09, para simular el espectro de absorción de una serie de derivados de cumarina, y evaluar cómo las modificaciones estructurales afectan a los espectros resultantes.

La elección de los sustituyentes se basa en la disponibilidad comercial de los derivados de β -cetoésteres, donde se incorpora el sustituyente de interés a la molécula final (posición 6 de la cumarina) mediante la condensación de Pechmann (R_1 del Esquema 13). Se realizaron varios espectros simulados a nivel TD-DFT/PBE como se detalla en la Tabla 5, y se muestran en la Figura 15.



(c).

Figura 15. Ejemplos de espectros de absorción simulados a nivel TD-DFT/PBE de cumarinas sustituidas con diferentes grupos aromáticos que soportan grupos dadores de electrones. (a) 7-hidroxycumarina (COH) se utilizó para validar el método. Se observa corrimiento del λ_{exc} a regiones visibles del espectro electromagnético en (b) y

Tabla 5.

Sustituyente (R ₁)	λ exc máx (nm) TD-DFT	λ exc máx (nm) Experimental	Fuerza del Oscilador
H ^(*)	339	332	0.3212
1,3-dimetoxibenceno	432	N.D.	0.1346
1,3-benzodioxol	470	N.D.	0.1289
benceno	364	N.D.	0.2114
bifenilo	396	N.D.	0.3057
4-metoxibenceno	402	N.D.	0.227
3,4,5-trimetoxibenceno	436	N.D.	0.0915
naftaleno	422	N.D.	0.0701

(*) COH se utilizó para validar el método; N.D.: No determinado.

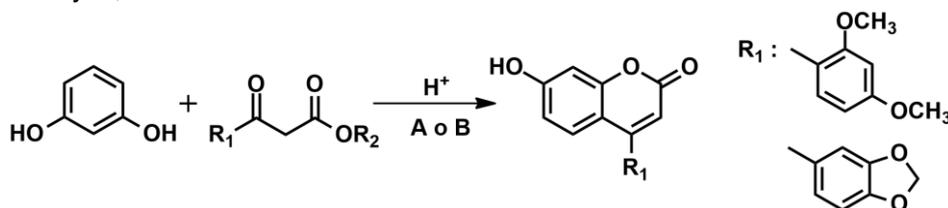
Como muestra la Tabla 5, en cumarinas sustituidas con grupos aromáticos que soportan grupos dadores de electrones se observa corrimiento a mayores longitudes de onda del λ_{exc} máximo, a regiones visibles del espectro electromagnético. Las cumarinas que soportan los sustituyentes en posición 6 (R₁) 1,3-dimetoxibenceno y 1,3-benzodioxol (Figura 15), resultaron los mejores grupos con un máximo de excitación teórico cerca de 430-470 nm respectivamente.

Estos derivados fueron seleccionados para su síntesis por condensación de Pechmann a partir de resorcinol y el β-cetoéster correspondiente en medio ácido.

2.2.2 Síntesis de los derivados de cumarinas seleccionados

La estrategia de síntesis mediante condensación de Pechmann entre 1,3-bencenodiol con el β-cetoéster correspondiente en medio ácido para dar las cumarinas seleccionadas se muestra en el Esquema 14. Una vez obtenida la cumarina modificada de interés y posterior borilación se espera obtener derivados de CBE con mejoradas propiedades espectroscópicas.

Para la condensación en medio ácido se realizaron dos metodologías: A, asistida por microondas y B, convencional.



Esquema 14. Ruta sintética de cumarinas modificadas. Método A: TFA MW 100°C 200W; Método B: H₂SO₄ 70% T.A. R₂ = CH₃.

Se ensayaron varias condiciones para la condensación, utilizando tanto métodos convencionales (145), como métodos asistidos por microondas (146) (Tabla 6).

Tabla 6.

Entrada	R ₂	R ₁	Método ^(*)	Tiempo	Rend. (%)	Ref
1	CH ₂ CH ₃	CH ₃	A	30 min	>99	(146)
2	CH ₂ CH ₃	CH ₃	B	5 h	92	(145)
3	CH ₃	1,3-dimetoxi-benceno	A	45 min	No hay reacción	(146)
4	CH ₃	1,3-dimetoxi-benceno	B	72 h	Reacción incompleta	(145)
5	CH ₃	benzo[d][1,3]dioxol	A	45 min	No hay reacción	(146)
6	CH ₃	benzo[d][1,3]dioxol	B	72 h	Reacción incompleta	(145)

(*)Método A: TFA MW 100°C 200W; Método B: H₂SO₄ 70% T.A.

Al optimizar las condensaciones tanto por métodos convencionales, como asistida por MW, cuando el sustituyente R₁ es un grupo pequeño como el metilo los rendimientos fueron excelentes (R = 92 % y 99% respectivamente). Sin embargo, al repetir las técnicas con sustituyentes voluminosos como 1,3-dimetoxibenceno y 1,3-benzodioxol, no se da la reacción en ningún caso. Este resultado puede ser debido a que ambos sustituyentes son aromáticos soportando grupos dadores de electrones generando un sistema con alta densidad electrónica, afectando la carga parcial positiva $\delta(+)$ de los carbonos carbonílicos y por tanto, disminuye la reactividad en la condensación.

Conclusiones parciales

En esta sección se describe el diseño de modificaciones estructurales de CBE para mejorar y ampliar sus propiedades. En primera instancia (sección 2.1), trabajamos en la posibilidad de dirigir a CBE a organelos celulares específicos, en particular la mitocondria dado que es uno de los principales sitios de producción de peroxinitrito. La estrategia se basó en acoplarle un catión lipofílico como el trifenilfosfonio ($-P(Ph_3)^+$), el que tiene la capacidad de atravesar la membrana mitocondrial conducido por su diferencia de potencial ($\Delta\psi < 0$), ingresando a la matriz mitocondrial haciendo que la sonda se concentre dentro de este organelo. Para ello exploramos tres estrategias sintéticas de manera de generar primeramente la cumarina haloalquil sustituida y posterior precipitación de la sal de fosfonio. En primera instancia (Estrategia I), exploramos la monohalogenación radicalar sobre el grupo metilo de la 4-metilcumarina, sin embargo, se obtuvieron productos dihalogenados o halogenaciones sobre el anillo aromático. Posteriormente, (Estrategia II) trabajamos en la clorometilación de Blanc con generación de HCl (g) *in situ*, sobre el doble enlace de la cumarina, obteniéndose el producto de interés en muy bajo rendimiento y poca cantidad de masa como para seguir adelante (R = 2%). Por lo que, por último (Estrategia III), se obtuvo la 4-clorometil-7-hidroxicumarina **5** por condensación de Pechmann entre un halo β -cetoéster y di-

hidroxibenceno en medio ácido de manera cuantitativa ($R > 99\%$). Tras explorar diferentes condiciones de generación del triflato correspondiente, obtuvimos el 4-(clorometil)-7-trifluorometanesulfonato de cumarina **6** ($R = 33\%$). Sin embargo, la reacción de borilación en condiciones clásicas no procedió, por lo que se continuará explorando otras condiciones.

Posteriormente en la sección 2.2, se estudiaron otras modificaciones estructurales. Los diferentes sustituyentes aromáticos al aumentar la deslocalización electrónica causan una disminución en las energías de transición $\pi \rightarrow \pi^*$, lo que lleva a desplazar las λ_{exc} a mayores longitudes de onda, con la concomitante emisión a longitudes de onda aún mayores. Los grupos dadores de electrones soportados en el sustituyente aromático mejoran esta propiedad. En colaboración con la Dra. Alicia Merlino del Laboratorio de Química Teórica y Computacional (Facultad de Ciencias, Udelar), utilizamos la teoría funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT/PBE) para simular los espectros de excitación de una serie de derivados de cumarina. Las cumarinas que soportan los sustituyentes en posición 6 (R_1) 1,3-dimetoxibenceno y 1,3-benzodioxol (Figura 12), resultaron los mejores grupos con un máximo de excitación teórico cerca de 430-470 nm respectivamente, procediendo a su síntesis. Se ensayaron diferentes condiciones de reacción basados en la condensación de Pechmann sin éxito. Dado que al realizar la reacción con un sustituyente pequeño en el β -cetoéster como metilo la condensación se dio con rendimientos excelentes, tanto por métodos convencionales como asistido por MW, podría ser que los sustituyentes voluminosos y con alta densidad electrónica pudieron haber afectado el carácter electrofílico de los carbonilos impidiendo la reacción de condensación.

En resumen, no fue posible la obtención de un derivado de CBE dirigido a la matriz mitocondrial (sección 2.1), ni un derivado de CBE con mejoras en sus propiedades espectroscópicas (sección 2.2). Sin embargo, el aprendizaje de técnicas para generar modificaciones estructurales que permiten modular diferentes propiedades, ya sean espectroscópicas o la posibilidad de dirigirlas a sitios celulares específicos, fue sumamente enriquecedor.

Por otra parte, entendiendo las necesidades del área redox nos llevó al diseño de una nueva estructura que combine ambas características. Esta herramienta podrá ser de gran utilidad tanto para las líneas de investigación de nuestro laboratorio, así como para grupos internacionales que estudian las bases moleculares de procesos de óxido-reducción y estrés nitrooxidativo.

Por lo tanto, centramos nuestros esfuerzos en el diseño y síntesis de una nueva sonda derivada de cumarina para la detección de especies oxidantes nucleofílicas, en especial peroxinitrito, que permitirá profundizar en el conocimiento de los procesos moleculares subyacentes a diversas patologías relacionadas al estrés nitrooxidativo. Esta nueva estructura contará con un agrupamiento éster borónico como centro electrofílico, trifenilfosfonio como catión lipofílico capaz de dirigirla a un organelo celular específico como la mitocondria, y además la estructura base de la cumarina está modificada para ser más grande y con mayores deslocalizaciones electrónicas, que permitan optimizar las longitudes de onda de excitación y emisión para ampliar su utilización a varias metodologías. En la siguiente sección se describe el desarrollo de **MitoCT**.

Materiales y Métodos

Reactivos

Todos los productos químicos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y utilizados sin purificación posterior. Todas las reacciones que involucran reactivos sensibles a la humedad o al oxígeno atmosférico se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno o atmósfera de argón, y se usaron disolventes secos. El grado de avance de las reacciones se monitorea por cromatografía en capa fina (TLC) en placas sílica gel TLC-PET (Fluka). Visualización con luz UV ($\lambda = 254$ nm). La cromatografía de columna (CC) se realizó en sílica flash (60 Å, 230–400 mesh, 40–63 μm , Fluka) como fase estacionaria.

Los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los compuestos se realizan en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz). Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de partes por millón (ppm) en relación con el TMS y las multiplicidades según s: singulete, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete, br: señal ancha (del inglés *broad signal*). La completa caracterización es realizada con la combinación de experimentos bidimensionales COSY, HMQC o HSQC y HMBC.

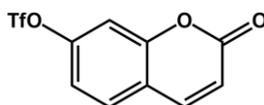
Los espectros de masa por impacto electrónico se realizan en un equipo Shimadzu GC/MS QP 1100 EX a un potencial de ionización de 70 eV por inyección directa (ID).

Los puntos de fusión se determinan en un equipo Gallenkamp Melting Point Apparatus y en un equipo Electrothermal Digital Melting Point Apparatus.

El peroxinitrito se preparó haciendo reaccionar NaNO_2 con H_2O_2 en medio ácido (147) y la concentración se determinó midiendo absorbancia a 302 nm de la solución alcalina ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (77)). Las soluciones stock se almacenan a -80 °C con agregado de MnO_2 para eliminar trazas de H_2O_2 , y se diluyen en NaOH 0.1 M inmediatamente antes de usar.

1. Síntesis y caracterización espectroscópica de CBA y CBE

7-trifluorometansulfoniloxicumarina (1): (137)



En un balón de dos bocas bajo atmósfera de N_2 (g) se disuelve 7-hidroxycumarina (200 mg, 1.2 mmol) en 5 mL de CH_2Cl_2 seco, y se agrega piridina (0.2 mL, 2.4 mmol). Se coloca el sistema en un baño agua-hielo a 0 °C y se agrega gota a gota anhídrido trifluorometansulfónico (0.3 mL, 1.5 mmol). Se monitorea por TLC: fase estacionaria sílica gel, fase móvil Hexano:AcOEt (1:1). Visualización por UV a 254 nm. A los 30 minutos de comenzada la reacción se observa desaparición total del reactivo de partida y aparición de un único producto, por lo que se detiene la reacción. Se agrega 20 mL de Et_2O y se extrae con HCl 1M (3 x 10mL). La fase orgánica se lava con solución saturada

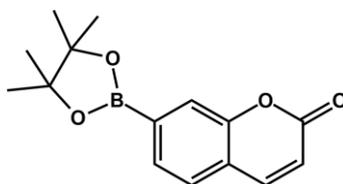
de NaHCO_3 (ac) (1 x 10 mL) y solución saturada de NaCl (ac) (1 x 15 mL). La capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , filtra y el disolvente se destila a presión reducida.

El producto obtenido con alta pureza y se usa en el paso siguiente sin mas purificación. Sólido amarillo, R >99% (352 mg). P.F: 74.5 – 76.5 °C.

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 6.55 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 7.47 (1H, dd, $J = 8.6$ y 2.4 Hz), 7.55 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.94 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 8.09 (1H, d, $J = 9.6$ Hz). ^{13}C RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 158.8, 154.7, 150.8, 142.7, 130.3, 120.3, 119.5, 117.6, 117.5, 110.3.

MS (EI): m/z (%) = 294 (M^+ , 39), 202 (37), 161 (37), 133 (100)

7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)cumarina (CBE): (137)

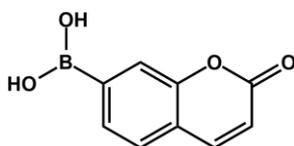


En un balón de dos bocas bajo atmósfera de N_2 (g) se agrega *bis*(pinacolato)diboro (1.16 g, 4.6 mmol), *bis*(difenilfosfino)ferroceno (138 mg, 0.25 mmol), 1,1'-*bis*(difenilfosfino)ferroceno-dicloropaladio(II) (182 mg, 0.25 mmol) y acetato de potasio (1.22 g, 12.5 mmol) en 20 mL de dioxano. Luego se agrega el compuesto **1** (1.23 g, 4.2 mmol) y se calienta a 80 °C en baño de aceite bajo atmósfera de N_2 (g). La reacción se monitorea por TLC, fase estacionaria sílica gel, fase móvil Hexano:AcOEt (1:1). Visualización por UV a 254 nm y revelador anisaldehído. Luego de 6 horas y 30 minutos de calentamiento a 80°C se observa desaparición total del reactivo de partida y se detiene la reacción. Una vez a T.A. se agrega Et_2O y se hace un reparto con solución saturada de NaCl . La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , filtra y el disolvente se destila a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad Hexano: Et_2O (9:1) hasta (6:4). Sólido blanco. R = 77% (1.12g) P.F.: 174.0 – 176.0 °C.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 1.39 (12H, s), 6.48 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.49 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.69-7.74 (2H, m), 7.76 (1H, s). ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 160.8, 153.5, 143.2, 130.2, 127.1, 122.9, 120.8, 117.8, 84.5 (2C), 24.9(4C) (No se observa C–B).

MS (EI): m/z (%) = 272 (M^+ , 45), 257 (31), 186 (100), 173 (47)

Ácido cumarin-7-borónico (CBA): (148)



En un balón se suspende **CBE**, (200 mg, 0.73 mmol) en 10 mL de una mezcla THF: H_2O (4:1) y luego se agrega NaIO_4 (470 mg, 2.20 mmol). Se deja agitando a temperatura ambiente por 1 hora y 20 minutos. Luego de ese tiempo se agrega a la mezcla de reacción 2 mL de HCl 1M y se deja agitando a T.A. toda la noche. La reacción se

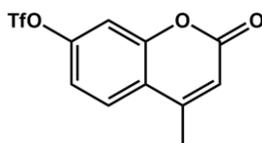
monitorea por TLC, fase estacionaria sílica gel, fase móvil Hexano:AcOEt (3:7). A las 21 horas se detiene la reacción debido a la desaparición del reactivo de partida evidenciado por TLC. Se agrega agua y se hacen extracciones con AcOEt. La fase orgánica se lava con solución saturada de NaCl, se seca con Na₂SO₄, filtra y destila a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad Hexano:AcOEt (1:1) hasta (1:9). Sólido blanco, R = 38 % (51 mg). Descompone a 353 °C.

¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 6.46 (1H, d, *J* = 8 Hz), 7.52 (2H, s, -B(OH)₂) parcialmente intercambiado con H₂O, 7.67 (1H, d, *J* = 8 Hz), 7.79-7.82 (2H, m), 8.01 (1H, d, *J* = 8 Hz). ¹³C RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 154.0, 143.5, 129.7, 127.3, 121.5, 120.4, 117.1 (No se observa C-B).

MS (EI): *m/z* (%) = 190 (M⁺, 89), 172 (31), 162 (89), 73 (100)

2. Modificaciones estructurales de CBE

4-metil-7-trifluorometansulfoniloxicumarina (2): (137)

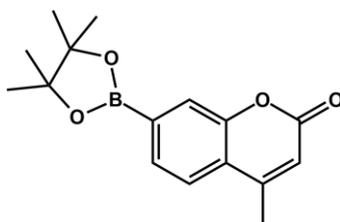


Se sintetiza análogamente al triflato de cumarina **1**, partiendo de 4-metilumbeliferona (2.00 g, 11.3 mmol), piridina (1.82 mL, 22.7 mmol), anhídrido trifluorometansulfónico (2.3 mL, 13.6 mmol) en 20 mL CH₂Cl₂ seco, agregados sobre un baño de agua-hielo a 0°C, y se deja agitando a T.A. por 1 h. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad EP:AcOEt (7:3) hasta (6:4). Sólido crema brillante, R = 90% (3.14 g).

¹H RMN (400 MHz, (CDCl₃) δ 2.49 (3H, s) 6.38 (1H, s), 7.26 – 7.31 (2H, m), 7.71 (1H, d, *J* = 8.0 Hz). ¹³C RMN (400 MHz, (CDCl₃) δ 159.50, 154.14, 151.20, 151.78, 126.35, 120.07, 117.44, 116.01, 110.58, 18.79.

MS (EI): *m/z* (%) = 308 (M⁺, 79), 216 (20), 175 (53), 147 (100)

4-metil-7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)cumarina (3): (137)



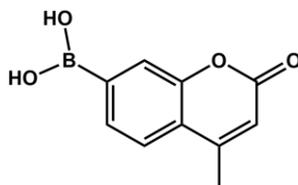
Se sintetiza análogamente a **CBE** partiendo de *bis*(pinacolato)diboro (2.81 g, 10 mmol), *bis*(difenilfosfino)ferroceno (33 mg, 0.6 mmol), 1,1'-*bis*(difenilfosfino)ferroceno-

dicloropaladio(II) (44 mg, 0.6 mmol) y acetato de potasio (2.96 g, 30.2 mmol) en 30 mL de dioxano. Luego se agrega el triflato de 4-metilcumarina **2** (3.1 g, 10 mmol) y se calienta a 80 °C por 6 h. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: Hexano:AcOEt (85:15). Sólido blanco, R > 99% (2.90 g).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 1.39 (12H, s), 2.47 (3H, s), 6.35 (1H, s), 7.62 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.69 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.76 (1H, s). ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 160.84, 152.08, 130.01, 123.73, 123.09, 122.0, 116.12, 84.43 (2C), 24.88 (2C), 22.67 (2C), 18.65. (No se observa C–B)

MS (EI): m/z (%) = 286 (M^+ , 58), 271 (30), 200 (100), 187 (50)

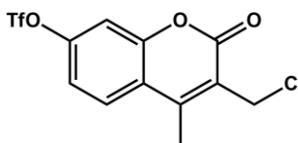
Ácido 4-metil-cumarina-7-borónico: (148)



Se sintetiza análogamente a **CBA** partiendo de **3** (1.0 g, 3.45 mmol) en 50 mL de una mezcla THF:H₂O (4:1) y luego se agrega NaIO_4 (2.2 g, 10.00 mmol). Se deja agitando a temperatura ambiente por 1 hora y 30 minutos. Luego de ese tiempo se agrega a la mezcla de reacción 10 mL de HCl 1M y se deja agitando a T.A. toda la noche, 21 h. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad Hexano:AcOEt (1:1) hasta AcOEt. Sólido marrón, R = 49 % (345 mg).

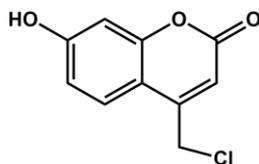
^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 2.52 (3H, s), 6.36 (1H, s), 7.54 (1H, s, -B(OH)₂) parcialmente intercambiado con H₂O, 7.76 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7.78 (1H, d, $J = 8$ Hz).

Triflato de 3-clorometil-4-metilcumarina (**2**) (149):



En un balón de dos bocas se coloca el triflato de 4-metilcumarina **2** (500 mg, 1.62 mmol), ZnCl_2 (220 mg, 1.62 mmol), paraformaldehído (97 mg, 3.24 mmol) y se disuelve en ácido acético glacial (15 mL). Se barbotea el HCl (g) en el seno de la solución y se lleva el sistema a reflujo. Se monitorea por TLC. A las 4 h o 9 h según el caso de calentamiento a reflujo se detiene la reacción, se vuelca sobre agua-hielo donde precipita un sólido blanco. Se filtra a vacío por butchner con lavados de Et₂O frío. Se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad partiendo de Hexano:AcOEt (8:2) hasta (7:3). Aceite claro, R = 2% (9 mg).

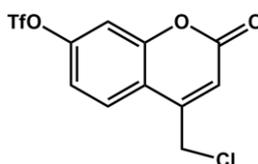
^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 2.69 (3H, s), 4.80 (2H, s), 7.52 (1H, dd, $J = 4$ Hz y $J = 8$ Hz), 7.59 (1H, d, $J = 4$ Hz), 8.15 (1H, d, $J = 8$ Hz).

4-(clorometil)-7-hidroxicumarina (5): (144)

En un balón colocado en un baño de agua-hielo a 0°C se agrega 4-cloroetilacetoacetato (1.1 mL, 8.5 mmol) y H₂SO₄ cc (3 mL). Luego se agrega resorcinol (940 mg, 8.5 mmol) en pequeñas porciones. Se retira el baño y se deja llegar a temperatura ambiente con agitación magnética. Se monitorea la reacción por TLC. Luego de 2 h de reacción se evidencia desaparición total del reactivo de partida por lo que se detiene la reacción. Se vuelca la mezcla sobre agua-hielo y el sólido precipitado se filtra a vacío. El producto obtenido es de tal pureza que no es necesaria su purificación posterior. Sólido tostado. R>99% (2.01 g).

¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 4.93 (s, 2H), 6.42 (s, 1H), 6.80 (d, *J* = 4 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8 Hz, 1H). ¹³C RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 161.2, 159.9, 155.9, 150.6, 126.4, 112.8, 111.7, 110.1, 102.7, 41.3

MS (ESI +MS): *m/z* = 211 [M + H]⁺, 213. +MS2 (211): *m/z* = 176, 148, 147, 132, 131, 119, 103, 91

4-(clorometil)-7-trifluorometansulfoniloxicumarina (6):

En un balón se disuelve la 4-clorometil-7-hidroxicumarina **5** (1.2 g, 5.6 mmol) en CH₃CN seco (12 mL), y luego se agrega la *N*-fenil-*bis*(trifluorometansulfonimida) (2.4 g, 6.8 mmol) y DIPEA (1.2 mL, 6.8 mmol) recién destilada. La mezcla se deja agitando a T.A. por 1h. Se monitorea por TLC. Se concentra el crudo para eliminar el disolvente y se realiza una cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad partiendo de Hexano:AcOEt (85:15) hasta (7:3). La espectroscopía de RMN evidencia dos compuestos, por lo que se realiza una recristalización de dos disolventes EtOH y H₂O. El sólido filtrado corresponde a la cumarina con un sustituyente *N*-feniltrifluorometilsulfonamida en la posición 4. Sólido blanco esponjoso, R = 18% (540 mg).

¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 5.58 (s, 2H), 6.59 (s, 1H), 7.45 – 7.62 (m, 7H), 8.16 (d, *J* = 8 Hz, 1H). ¹³C RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 136.2, 129.7, 128.8, 126.7, 117.6, 117.2, 110.6, 52.4.

MS (ESI +MS): *m/z* = 549 [M⁺ + H₂O], 531 [M⁺], 384, 359, 331, 274.

Las aguas madres se destilan a presión reducida para eliminar el EtOH, se extraen con AcOEt con agregado de solución saturada de NaCl para ayudar a separar las fases. Se juntan las fases orgánicas, se seca con Na₂SO₄, se filtra y se destila a presión reducida. Se obtiene el producto de interés como aceite anaranjado, R = 33% (638 mg).

¹H RMN (400 MHz, (CDCl₃) δ 5.07 (2H, s) 6.77 (1H, s), 7.55 (2H, dd, *J* = 4 Hz y *J* = 8 Hz), 7.62 (1H, d, *J* = 4 Hz), 8.13 (1H, d, *J* = 8 Hz).

MS (EI): *m/z* (%) = 341 (M⁺, 100), 343 (38), 215 (92), 209 (77), 181 (43)

3. Análisis cinético de CBA y CBE

Las determinaciones de las constantes cinéticas de CBA o CBE con los diferentes oxidantes se llevaron a cabo bajo condiciones de *pseudo*-primer orden (exceso de 10 veces sonda sobre peroxinitrito). En el caso de H₂O₂, el oxidante se utilizó en un exceso de 300 veces. Se realizó la técnica cinética de flujo detenido utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido Applied Photophysics 18MX equipado con fotomultiplicadores para mediciones de fluorescencia (λ_{ex} = 332 nm; emisión total). Para las determinaciones cinéticas con H₂O₂ se utilizó un lector de placas de fluorescencia (Varioskan, Thermo, λ_{ex} = 332 nm y λ_{em} = 470 nm). Todas las determinaciones se realizaron en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4, conteniendo 0.1 mM de DTPA a 25°C.

Los cursos temporales de aumento de fluorescencia debido a la formación de 7-hidroxicumarina (COH) partir de CBA o CBE, para cada concentración de oxidante se ajustan a curvas exponenciales simples, obteniendo una constante cinética observada

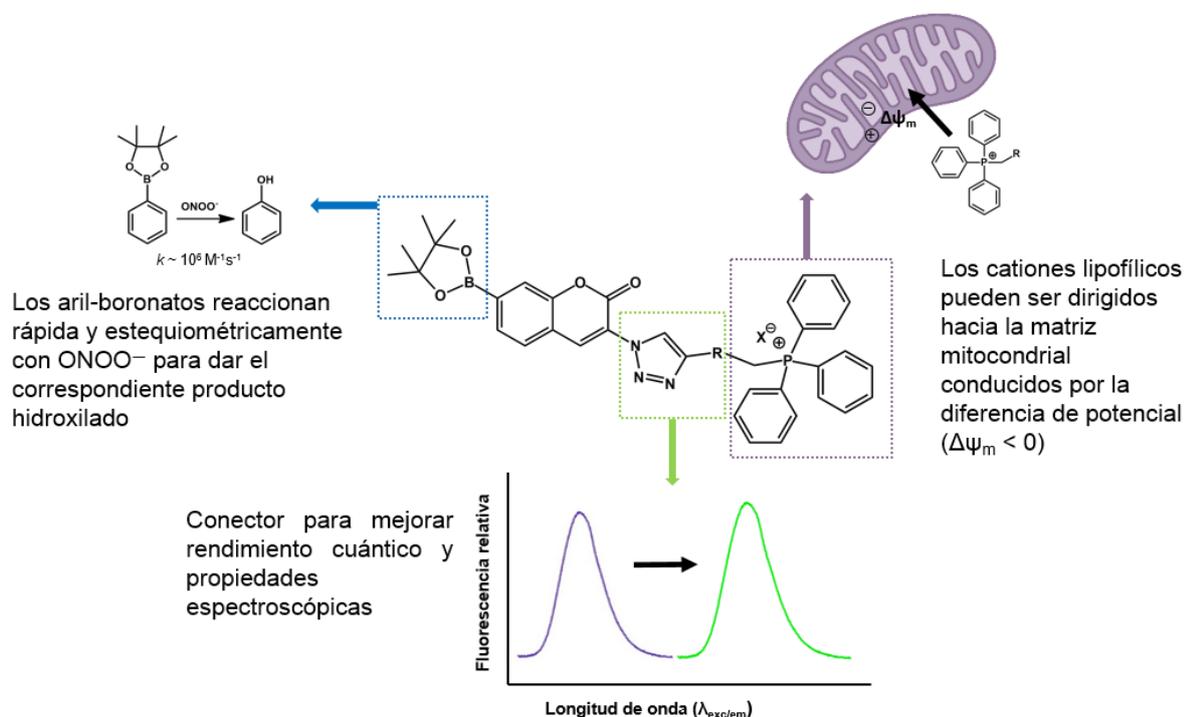
k_{obs} . Las k_{obs} obtenidas de esta manera, se graficaron en función de la concentración de sonda ajustándose a una recta cuya pendiente es la k cinética de la reacción.

Capítulo 1. Parte 1.2

1.2. Derivados de CBE dirigidos a la mitocondria con mejoras en las propiedades espectroscópicas: MitoCT

Introducción y estrategia experimental

El trabajo descrito en las secciones anteriores, permitió comenzar con modificaciones estructurales de los derivados fenilborónicos, con el objetivo de poder dirigirlos a sitios subcelulares específicos y así identificar y estimar tasas de generación de peroxinitrito en la mitocondria, un organelo central para la formación y acciones de peroxinitrito. En esta sección se describe el diseño, síntesis y evaluación de la sonda **MitoCT** (mito cumarin-triazol). Dicha sonda la hemos diseñado conteniendo un éster borónico capaz de reaccionar rápidamente con peroxinitrito dando el correspondiente producto hidroxilado (27), unido a una cumarina fluorescente acoplada a un anillo de triazol como un grupo dador de electrones de manera de modular sus propiedades espectroscópicas llevando su λ_{exc} máx en el rango Vis del espectro electromagnético (114), y por ultimo soportando un agrupamiento trifenilfosfonio (Esquema 15). Los cationes lipofílicos como este último son capaces de ingresar a la matriz mitocondrial haciendo que la sonda se concentre dentro de este organelo (~ 100 veces)(135, 138).



Esquema 15. Diseño de MitoCT.

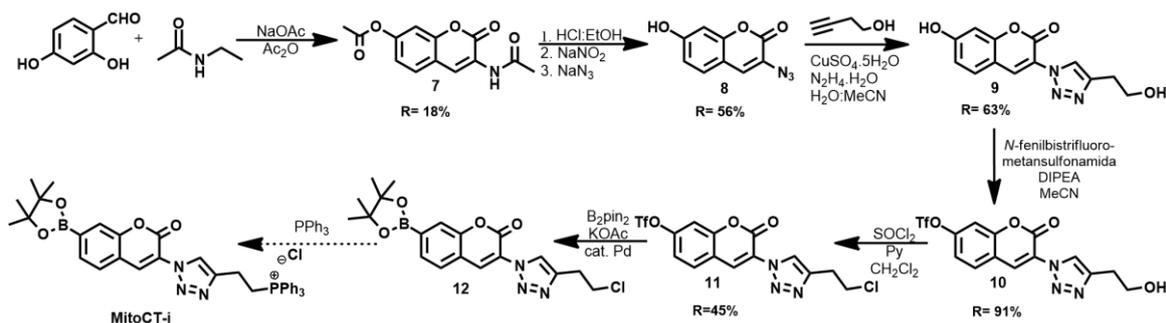
Resultados y Discusión

Para su obtención se exploraron dos estrategias, una ruta sintética lineal y una ruta sintética convergente.

1. Síntesis de MitoCT-i

i) Ruta Sintética Lineal

Para la preparación de **MitoCT**, inicialmente comenzamos trabajando en una ruta sintética lineal de 7 pasos de reacción como se muestra en el Esquema 16.



Esquema 16. Ruta sintética lineal para la obtención de MitoCT en la que se detallan las mejores condiciones de reacción obtenidas, luego de la puesta a punto de cada etapa de reacción.

En primer lugar, se obtuvo la cumarina **7** a partir de la condensación entre 2,4-dihidroxibenzaldehído y *N*-acetilglicina. Esta reacción se reporta en la literatura como una reacción secuencial con hidrólisis en medio ácido y reacción con NaNO_2 y NaN_3 para dar la azidocumarina **8** (150), pero la realizamos en dos etapas para identificar en cuál de ambas etapas había mayor pérdida de masa, debido que al seguir la técnica original obtuvimos la azidocumarina **8** con muy bajo rendimiento ($R = 3\%$). De esta manera obtuvimos la cumarina **7** con 18 % de rendimiento y la azidocumarina **8** en un 56 %. Posteriormente, la azidocumarina **8** se sometió a una cicloadición 1,3 con 3-butin-1-ol mediante una reacción de *Click Chemistry*³ para dar el compuesto **9** con buen rendimiento ($R = 63\%$). Esta reacción involucra la utilización de un agente reductor para la reducción *in situ* de una sal de Cu^{+2} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a Cu^{+1} , siendo esta última la especie catalizadora de la reacción (151). Se ensayó la reacción en presencia de ascorbato de sodio, un agente reductor comúnmente utilizado, sin embargo, obtuvimos el compuesto de interés **9** con 25% de rendimiento en 46 h de reacción. Al sustituirlo por el monohidrato de hidrazina ($\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) como agente reductor, obtuvimos el compuesto **9** con buen rendimiento ($R = 63\%$) en 24 h de reacción, siendo por tanto el agente

³ El término *Química Click*, introducido por primera vez por Karl Barry Sharpless en 2001, se refiere a una serie de características deseables que deben reunir las reacciones, en este trabajo nos centramos en la cicloadición 1,3 entre alquinos y azidas orgánicas catalizada por Cu^{+1} , para dar triazoles 1,4-disustituídos, una de las reacciones más estudiadas. 151. Himo F, *et al.* (2005) Copper (I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society* 127(1):210-216.

reductor de elección. El compuesto **9** se hizo reaccionar con *N*-fenil-*bis*(trifluorometansulfonimida), usando DIPEA como base, rindiendo el derivado **10** con excelente rendimiento (R = 91%). Una vez obtenido el compuesto **10**, realizamos una borilación con *bis*(pinacolato)diboro catalizada por Pd bajo las condiciones clásicas de Suzuki-Miyaura (no mostrado en el Esquema 16). Se trabajó cambiando las condiciones de reacción como combinaciones de catalizadores, tiempo y temperatura, pero no fue posible obtener el producto borilado de interés con un rendimiento apreciable. Considerando que una posible interacción entre el alcohol alifático y los catalizadores de Pd impidió que la reacción de borilación tuviera lugar, decidimos realizar una cloración a nivel del alcohol alifático de **10** con cloruro de tionilo (SOCl₂), dando el haloalcano correspondiente **11**. Para la cloración del alcohol alifático de **10** con SOCl₂, se estudiaron diferentes disolventes de la reacción como Et₂O y THF secos sin éxito. Sin embargo, al realizar la cloración utilizando CH₂Cl₂ seco como disolvente de la reacción se obtuvo el compuesto de interés **11** con 45 % de rendimiento. Éste derivado **11** es tratado con *bis*(pinacolato)diboro en presencia de catalizador de Pd para dar el éster borónico **12**, Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de borilación del compuesto **11**, utilizando B₂pin₂ como agente borilante.

Entrada	Cat. Pd	Condiciones	t (h)	Comentarios
1	Pd(dppf)Cl ₂ <i>bis</i> (difenilfosfino)ferroceno	KOAc, Dioxano, 80°C	10 h	Se obtiene el producto fenólico ^(*)
2	Pd(dppf)Cl ₂ •CH ₂ Cl ₂	KOAc, Dioxano, Δ	11 h	Se obtiene el producto 12 contaminado en bajo rend. ^(**)
3	Pd(dppf)Cl ₂ <i>bis</i> (difenilfosfino)ferroceno	KOAc, Dioxano, 80°C MW	1.5 h	No hay reacción. ^(**)

(*) probable hidrólisis en el work-up de la reacción.

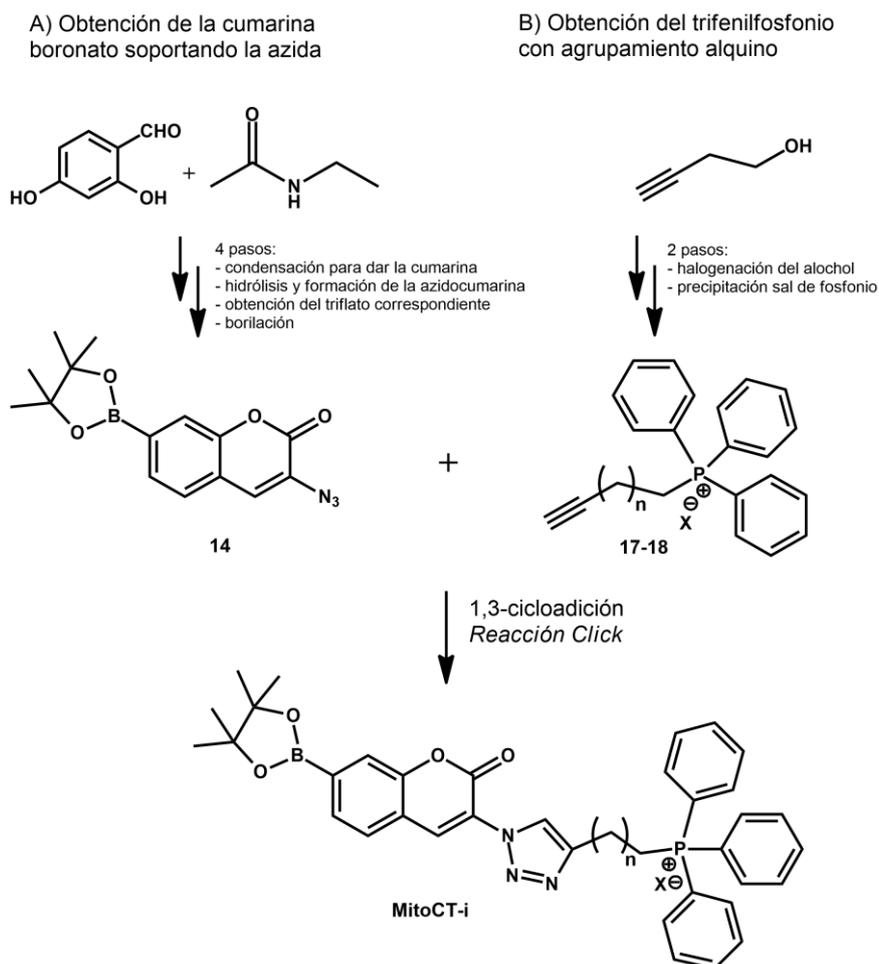
(**) no se realiza work-up, se concentra el crudo para eliminar el dioxano y se pasa a purificación por cromatografía en columna.

Si bien se ensayaron diferentes condiciones de borilación se dificultó la obtención del compuesto de interés **MitoCT-i**. Por lo tanto, se rediseña la estrategia sintética a una ruta convergente, como se describe a continuación.

ii) Ruta Sintética Convergente

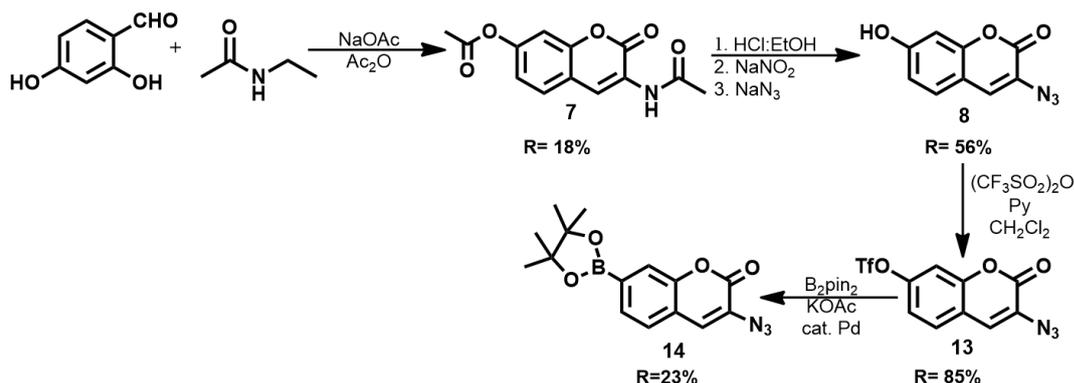
Para la obtención del compuesto de interés **MitoCT**, se explora otra estrategia sintética, en donde se genera la azidocumarina soportando el éster borónico **14** (Esquema 17, A)), y paralelamente la sal de fosfonio con un agrupamiento alquino **17** a partir del 3-butin-1-ol comercial, iodación y obtención de la sal de fosfonio (Esquema 17, B)). Para finalmente terminar en un paso de cicloadición 1,3 entre la azida del derivado **14** y el

alquino de **17** mediante una reacción de *Química Click*, obteniéndose así el compuesto de interés MitoCT.



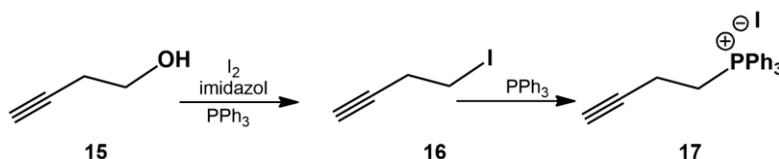
Esquema 17. Diseño de ruta sintética convergente para la obtención de **MitoCT-i**, $n = 1$ o 2 .

En la parte anterior i) se obtuvo la azidocumarina **8** a partir de la condensación entre 2,4-dihidroxibenzaldehído y *N*-acetilglicina, hidrólisis en medio ácido y reacción con NaNO_2 y NaN_3 (150). Posteriormente, la reacción con un agente triflante como *N*-fenil-*bis*(trifluorometansulfonimida) y DIPEA no rinde el compuesto **13**. Sin embargo, mediante reacción con otro agente triflante como anhídrido trifluorometansulfónico y Py en CH_2Cl_2 , se obtiene el compuesto **13** con muy buen rendimiento ($R = 85\%$) (Esquema 18). Luego se realiza la borilación de **13** en condiciones clásicas, donde se obtuvo el éster borónico de la 3-azidocumarina **14** con un rendimiento del 23%. Alternativamente se ensayó la misma reacción con otra combinación de catalizadores de Pd ($\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ y *bis*(difenilfosfino)ferroceno) obteniéndose un rendimiento aún menor de 14%.



Esquema 18. Obtención del éster borónico de cumarina soportando el agrupamiento azida.

Por otro lado, y paralelamente, se trabajó en la obtención del compuesto **17**, Esquema 19. Inicialmente se realizó una reacción secuencial de iodación de 3-butin-1-ol comercial **15** con I_2 , imidazol y PPh_3 en CH_2Cl_2 a T.A., filtración por Celite para eliminar el óxido de trifenilfosfina formado y evaporación de las aguas madres. Posteriormente, el crudo se trató con PPh_3 a reflujo de CH_3CN sin éxito (**152**). Alternativamente se realizó la misma reacción sin la etapa de filtración, evaporando el CH_2Cl_2 para concentrar el crudo, el que se tritura con pentano, se filtra y se realiza cromatografía en columna obteniéndose trazas del compuesto **16** (< 1%) (**153**). En los ensayos anteriores se observó desprendimiento de vapores de olor muy fuerte, probablemente 4-iodobutino **16**. Por lo que realizamos la reacción en tándem: iodación del alcohol alifático **15** sin aislar el crudo de la reacción; y posteriormente en el mismo balón se agrega PPh_3 (3 equiv.) para la obtención de la sal de fosfonio **17**, y finalmente se filtra el sólido obtenido y se tritura exhaustivamente con Et_2O para eliminar la posible formación de óxido de trifenilfosfina o restos de material de partida. Si bien se obtuvo el compuesto de interés **17** evidenciado por espectroscopía de RMN (1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HMQC), se observa contaminación con el reactivo de partida PPh_3 .

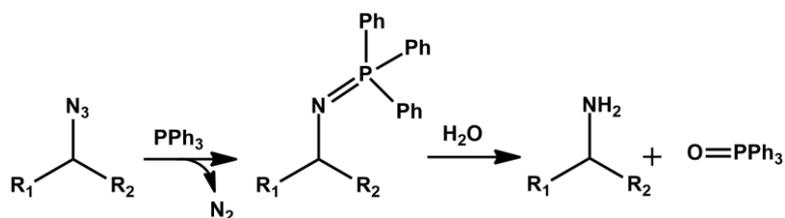


Esquema 19. Ruta de iodación y precipitación de la sal de fosfonio a partir de 3-butin-1-ol.

En un intento por realizar la cicloadición 1,3 entre el éster borónico de la azidocumarina **14** y la sal de fosfonio soportando el agrupamiento alquino **17** para obtener el compuesto de interés **MitoCT**, mediante una reacción de Química Click, catalizada por $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ con hidrazina como agente reductor del Cu^{+2} , la reacción no procede. Principalmente se observa formación de óxido de trifenilfosfina, y restos minoritarios de los reactivos de partida sin reaccionar **14** y **17**.

Esto probablemente haya sido causado por los restos de PPh_3 que no fue posible separar del alquino **17**, si bien esperábamos que únicamente reaccionara el alquino en la reacción Click, esto no fue así. Posiblemente la PPh_3 presente en el medio de reacción haya reaccionado con el agrupamiento azida de **14**, mediante la reacción de Staudinger,

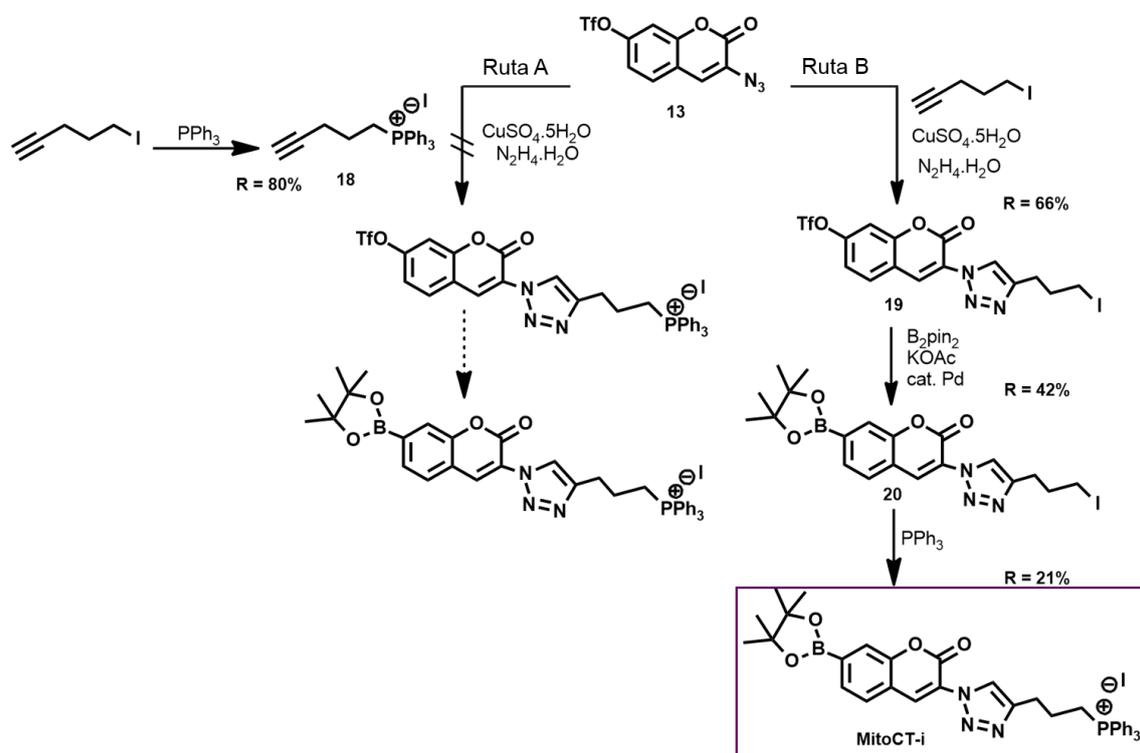
Esquema 20. Esta reacción describe la reducción de azidas orgánicas para dar la correspondiente amina mediante PPh_3 y generando óxido de trifenilfosfina como subproducto. (154)



Esquema 20. Reacción de Staudinger, reducción de azidas por PPh_3 (154).

Ya que no fue posible la purificación del alquino **17** por técnicas cromatográficas, ni por diferencias de solubilidades entre la sal de fosfonio y PPh_3 , y a fin de evitar la reducción de la azida por la reacción mostrada en el Esquema 20, es que cambiamos la ruta sintética, Esquema 21.

Además, debido a la difícil manipulación con un alquino de 4C por su volatilidad, adquirimos comercialmente 5-iodo-1-pentino, para generar la correspondiente sal de fosfonio **18**, (Esquema 21, Ruta A) o utilizarlo en la cicloadición 1,3 (Esquema 21, Ruta B).



Esquema 21.

Partimos del triflato de la azidocumarina **13**, debido a que contamos con mucha más cantidad de masa de este compuesto como para explorar diferentes Rutas A y B del Esquema 21. En primer lugar, se realiza la obtención de la sal de fosfonio **18**, a partir

del 5-iodo-1-pentino comercial con alto rendimiento ($R = 80\%$). Debido a que no se observa por TLC, ni por espectroscopía de RMN presencia del reactivo de partida PPh_3 , se procede a la cicloadición 1,3 con el triflato de la azidocumarina **13**, con resultados negativos, Esquema 21, Ruta A.

Por lo que se diseña la Ruta B mostrada en el Esquema 21, donde primeramente se realiza la cicloadición 1,3 del triflato de la azidocumarina **13** con el alquino comercial 5-iodo-1-pentino rindiendo **19** con buen rendimiento ($R = 66\%$). Posteriormente, se realiza la borilación en condiciones clásicas dando el correspondiente éster borónico **20** en un 42 % de rendimiento, para finalmente obtener la sal de fosfonio dando el compuesto de interés **MitoCT-i** ($R = 21\%$).

2. Evaluación de las propiedades espectroscópicas de MitoCT-i

Una vez obtenido el compuesto de interés **MitoCT-i** evaluamos las propiedades espectroscópicas como longitudes de onda máxima de excitación y emisión (λ_{exc} y λ_{em} , respectivamente). También evaluamos las propiedades de su análogo sin el agrupamiento trifenilfosfonio **20**. Debido a que el fluoróforo es el correspondiente producto hidroxilado, primeramente, oxidamos ambos compuestos con exceso de H_2O_2 hasta oxidación total, Figura 16.

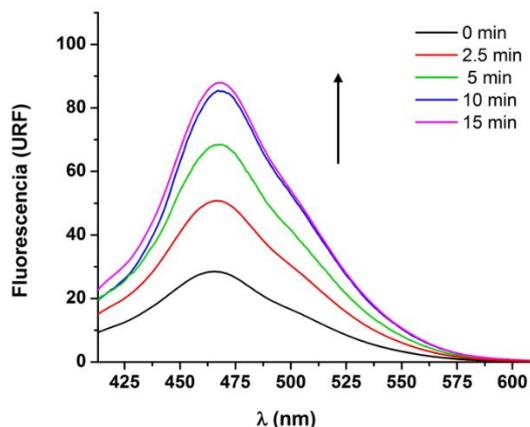


Figura 16. Respuesta fluorescente tras la oxidación de **MitoCT-i** por H_2O_2 . Espectro de emisión de fluorescencia obtenido al hacer reaccionar **MitoCT-i** ($100 \mu\text{M}$) con H_2O_2 (2 mM) a diferentes tiempos, en buffer fosfato (100 mM , $\text{pH } 7.4$) a 25°C . Excitación a $\lambda = 380 \text{ nm}$; emisión recogida desde 400 a 600 nm .

Posteriormente se determinan las longitudes de onda max de excitación y emisión de ambos compuestos, **MitoCT-i** (Figura 17, panel a) y **20** (Figura 17, panel b).

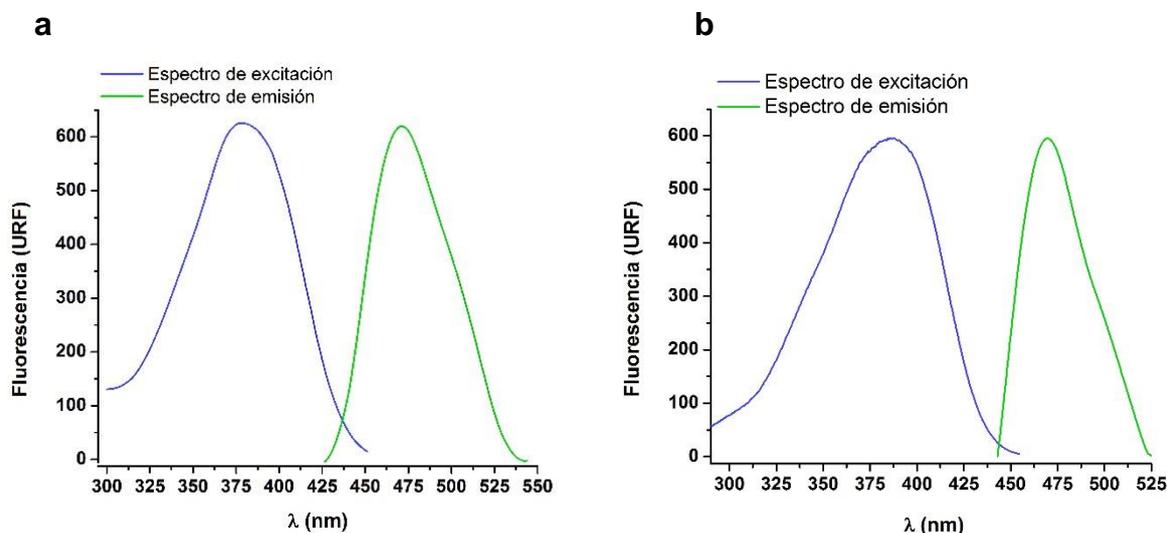


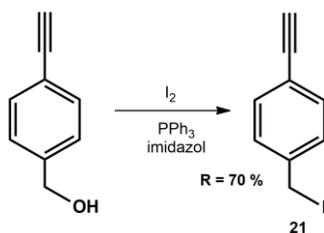
Figura 17. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de los productos oxidados de **MitoCT-i** (panel a) y el producto de oxidación de su análogo sin el agrupamiento trifenilfosfonio **20** (panel b). Los espectros se obtuvieron al hacer reaccionar 20 μ M de **MitoCT-i** o **20** con H_2O_2 (2 mM) hasta oxidación total (10 min) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) a 25°C.

Como se muestra en la Figura 17 panel a), la λ_{exc} máxima de **MitoCT-i** es de 380 nm, con emisión a 470 nm, y su análogo **20** tiene idénticas propiedades debido a que la localización del catión trifenilfosfonio a 3C de distancia no estaría afectando estas propiedades por la pérdida de conjugación. Si bien el anillo incorporado de triazol aumentó en ~ 50 nm la longitud de onda máxima de excitación respecto a la 7-hidroxicumarina (COH, $\lambda_{\text{exc}} = 332$ nm), el λ_{exc} de MitoCT-i sigue estando en el rango UV del espectro electromagnético.

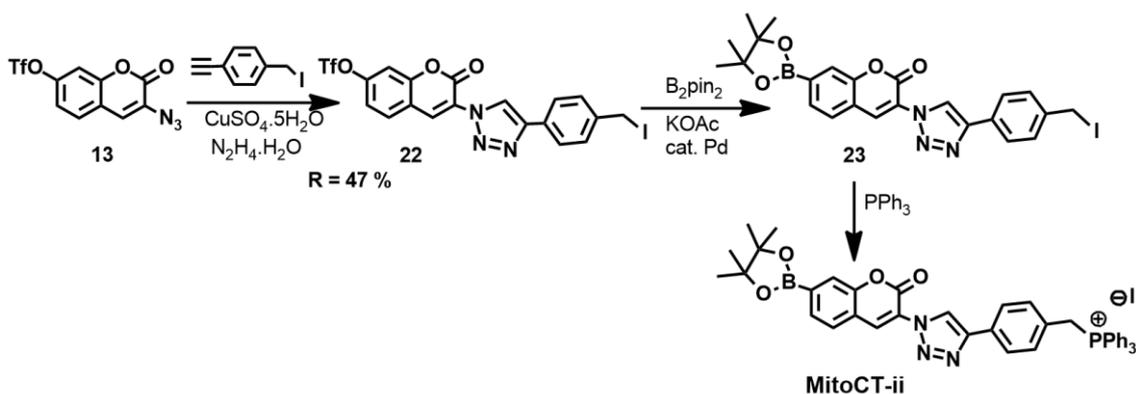
Por lo tanto, incorporaremos una nueva modificación estructural para aumentar el tamaño de la molécula y sus conjugaciones, generando una nueva estructura: **MitoCT-ii**, con el objetivo de que sus λ_{exc} y λ_{em} estén en el rango Vis del espectro electromagnético.

3. Síntesis de MitoCT-ii y evaluación de sus propiedades espectroscópicas

Debido a que las propiedades espectroscópicas de **MitoCT-i** no fueron las deseadas, se necesita una nueva estructura con más conjugaciones, cargada de densidad electrónica y de mayor tamaño, diseñándose una segunda generación **MitoCT-ii**, con mayores conjugaciones. Para ello vamos a trabajar con el un nuevo alquino 1-etinil-4-(iodometil)benceno **21**, el cual fue sintetizado a partir del alcohol correspondiente mediante iodación con alto rendimiento ($R = 70\%$), Esquema 22.

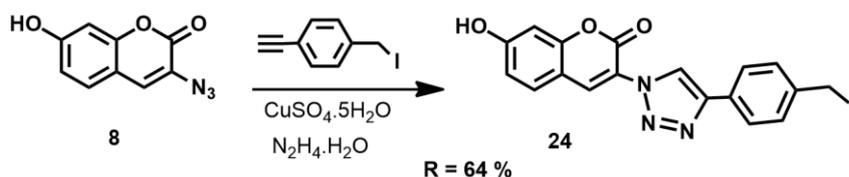

Esquema 22.

De esta manera, el nuevo alquino formará el triazol con la azidocumarina con el anillo aromático aumentando la conjugación y soportando el conector iodo metilo donde se formará la sal de fosfonio, dando **MitoCT-ii**, Esquema 23.


Esquema 23. Ruta de síntesis de MitoCT-ii.

Se parte del triflato de la azidocumarina **13**, el que se hace reaccionar mediante una cicloadición 1,3 con el alquino 1-etinil-4-(iodometil)benceno **21** recién sintetizado, obteniéndose **22** con rendimiento aceptable ($R = 47\%$). Posteriormente, el compuesto **22** es tratado con B_2pin_2 , $KOAc$ y se exploraron diferentes combinaciones de catalizador de Pd , obteniéndose el éster borónico de interés en todos los casos, pero en una mezcla con el correspondiente producto hidroxilado evidenciado por espectroscopía de RMN y MS. Esto puede ser debido a la alta higroscopicidad del $KOAc$ generando una posible hidrólisis del agrupamiento éster borónico. Se están explorando otras bases como trietilamina (136).

Paralelamente, se sintetiza el análogo oxidado **24** mediante una cicloadición 1,3 entre la azidocumarina **8** y el arilalquino **21**, Esquema 24 con buen rendimiento de 64%. Debido a que el agrupamiento trifenilfosfonio tampoco influiría en la longitud de onda de excitación y emisión, el compuesto **24** es el fluoróforo correspondiente de MitoCT-ii una vez oxidado.


Esquema 24. Síntesis del fluoróforo **24**.

Una vez obtenido el correspondiente fluoróforo de MitoCT-ii **24**, se estudian sus propiedades espectroscópicas, como se muestra en la Figura 18, con un $\lambda_{exc\ máx}$ = 395 nm y $\lambda_{em\ máx}$ = 470 nm.

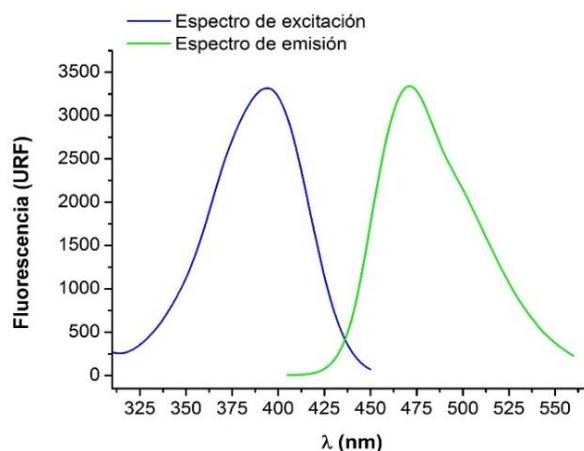


Figura 18. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia del fluoróforo **24**. Los espectros se obtuvieron con 20 μ M del fluoróforo **24** en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) a 25°C.

Si bien se observó un corrimiento de la longitud de onda de excitación en más de 60 nm con las modificaciones estructurales generada respecto a la COH, la excitación con láseres en el rango visible podría ser poco eficiente.

Conclusiones parciales

En esta sección se describe el intenso trabajo que se realizó en el diseño y síntesis de una nueva sonda fluorescente para la detección de especies nucleofílicas oxidantes dirigida a la matriz mitocondrial, llamada **MitoCT-i** o **MitoCT-ii**, según la primer o segunda generación de sonda sintetizada.

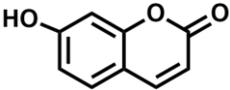
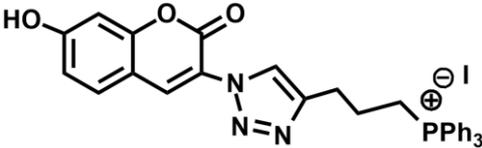
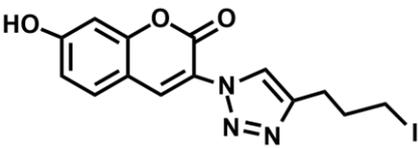
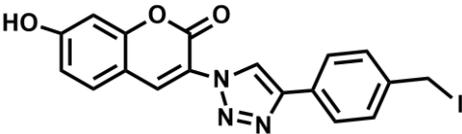
Se diseñan diferentes estrategias sintéticas para la obtención del compuesto de interés, comenzando a trabajar en una ruta sintética lineal y posteriormente se exploró una ruta sintética convergente con mayor éxito en cuanto a manipulación y rendimientos, obteniéndose **MitoCT-i** en seis pasos de reacción.

Se estudiaron las propiedades espectroscópicas de su correspondiente producto oxidado luego de hacerlo reaccionar con un oxidante como H_2O_2 . Si bien el agregado del anillo de triazol corre la $\lambda_{exc\ máx}$ respecto a la 7-hidroxicumarina en ~50 nm, (Tabla 8) el valor obtenido de 380 nm de excitación está en el rango UV, donde la mayoría de láseres en equipamientos comunes para ensayos celulares no alcanza éstas longitudes de onda.

Por lo tanto, se diseña una segunda generación llamada **MitoCT-ii**, donde al derivado del éster borónico se le incorpora un anillo de benceno conjugado al anillo de triazol, conectando al trifenilfosfonio. Paralelamente, se sintetizó el correspondiente fluoróforo de **MitoCT-ii**, el compuesto **24**, siendo sus $\lambda_{exc\ máx}$ de 395 nm, aumentando en 15 nm

el valor de la longitud de onda respecto al fluoróforo de **MitoCT-i**, y en más de 60 nm respecto a la 7-hidroxycumarina. Tabla 8.

Tabla 8. Comparación de λ_{exc} y λ_{em} máximas de los diferentes fluoróforos obtenidos.

Entrada	N° de compuesto	Estructura química	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
1	COH		332	470
2	20 oxidado		380	470
3	MitoCT-i oxidado		380	470
4	24		395	470

Si bien los valores de λ obtenidos son del orden de otros derivados de cumarinas soportando sustituyentes aromáticos reportados en la literatura (150), la excitación con láseres en el rango visible, en general a 488 nm, puede ser poco eficiente en los compuestos generados.

Alternativamente se podría evaluar la incorporación sobre el derivado de cumarina de anillos aromáticos condensados como naftalenos o pirenos soportando grupos haloalquilo para precipitación de la sal de fosfonio.

Otra opción podría ser el cambio de *scaffold* de cumarina a fluoresceína, un fluoróforo extensamente estudiado en el desarrollo de la presente Tesis. En la Parte 2, sección 2.3, se describen los estudios realizados sobre una sonda disponible comercialmente llamada **MitoPY1**, reportada para la detección de H_2O_2 mitocondrial. Estructuralmente **MitoPY1** es un derivado del fluoróforo fluoresceína soportando un éster borónico, con un grupo trifenilfosfonio para dirigirlo a la matriz mitocondrial, conectado por una alquilpiperazina.

Como se demuestra en esa sección 2.3, **MitoPY1** presenta grandes inconvenientes debido a la inestabilidad y autoxidación, mientras que las cumarinas no presentan estos inconvenientes. A futuro se podrían explorar otro tipo de *scaffolds* como BODIPY.

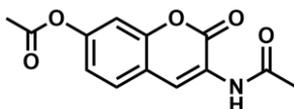
Materiales y Métodos

Reactivos

Todos los productos químicos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y utilizados sin purificación posterior. Todas las reacciones que involucran reactivos sensibles a la humedad o al oxígeno atmosférico se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno o atmósfera de argón, y se usaron disolventes secos. El grado de avance de las reacciones se monitorea por cromatografía en capa fina (TLC) en placas sílica gel TLC-PET (Fluka). Visualización con luz UV ($\lambda = 254$ nm). La cromatografía de columna (CC) se realizó en sílica flash (60 Å, 230–400 mesh, 40–63 μm , Fluka) como fase estacionaria. Los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los compuestos se realizan en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz). Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de partes por millón (ppm) en relación con el TMS y las multiplicidades según s: singulete, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete, br: señal ancha (del inglés *broad signal*). La completa caracterización es realizada con la combinación de experimentos bidimensionales COSY, HMQC o HSQC y HMBC. Los espectros de masa por impacto electrónico se realizan en un equipo Shimadzu GC/MS QP 1100 EX a un potencial de ionización de 70 eV por inyección directa (ID). Los espectros de masa por electrospray (ESI) se realizaron en un equipo ABSciex QTRAP 4500 LC/ESI/MS por inyección directa, Software Analyst 1.6.2 y para procesar se utilizó PeakView 2.1.

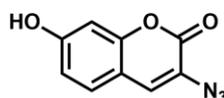
Los registros de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Jasco FP-8500.

3-acetamida-7-acetilcumarina (7): (150)



En un balón se coloca 2,4-dihidroxibenzaldehído (2.76 g, 20 mmol), *N*-acetilglicina (2.34 g, 20 mmol), y acetato de sodio (4.92 g, 60 mmol) y se disuelve en anhídrido acético (100 mL). Se lleva el sistema a reflujo por 6 h y se deja toda la noche agitando a T.A. Una vez evidenciado el consumo total del aldehído de partida evidenciado por TLC con revelador de Brady, se vuelca la mezcla sobre agua-hielo y el sólido formado se filtra a vacío por butcher con lavados de agua fría. El sólido se seca en desecador por 48 h, siendo de tal pureza que no necesita purificación posterior. Sólido amarillo, R = 18% (903 mg). Se continúa con la reacción siguiente.

3-azido-7-hidroxycumarina (8): (150)



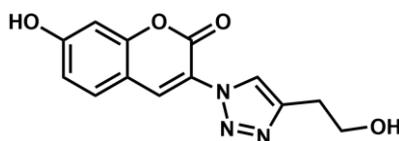
Se coloca el compuesto **7** (0.90 g, 34 mmol) obtenido en paso anterior en un balón y se agrega 30 mL de una mezcla HCl 37%:EtOH 95% (2:1). Se lleva la solución a reflujo por 1 h. Luego de ese tiempo se apaga el calentamiento y una vez enfriada se coloca el balón en un baño de agua-hielo a 0°C y se agrega exceso de NaNO₂ (2.76 g, 400 mmol) y se deja agitando a 0°C por 15 minutos. Posteriormente se agrega NaN₃ (3.80 g, 247 mmol) en pequeñas porciones y se continúa agitando por 30 min a 0°C. El sólido obtenido se filtra a vacío con lavados de agua fría. Se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: Hexano:AcOEt (7:3). Sólido anaranjado, R = 56% (393 mg).

¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 6.81 (s, 1H), 6.88 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 7.45 (s, 1H), 7.49 (d, 1H, *J* = 8 Hz). ¹³C RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 160.1, 157.3, 153.2, 129.0, 127.1, 122.1, 113.6, 112.1, 102.2.

MS (ESI +MS): *m/z* = 204 [M⁺ + H⁺], 199. +MS2 (204) 5.0 a 50.0 V: *m/z* = 176, 148, 119, 109, 92, 65.

MS (EI): *m/z* (%) = 203 (M⁺, 12), 177 (68), 147 (100), 119 (69).

3-(4-(2-hidroxietil)-1,2,3-triazol)-7-hidroxicumarina (**9**):(155)

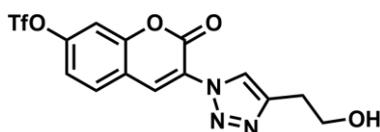


En un balón se coloca la azidocumarina **8** (100 mg, 0.5 mmol) y se disuelve en 12 mL de una mezcla H₂O:CH₃CN (2:1). Se agrega 3-butin-1-ol (56 μL, 0.74 mmol), CuSO₄•5H₂O (13 mg, 0.05 mmol) previamente molido y N₂H₄•H₂O (25 μL, 0.5 mmol) en dos veces. Se deja agitando vigorosamente a T.A. por 24 h. Luego de ese tiempo se enfría la mezcla para ayudar a sedimentar un sólido. Se filtra a vacío. El sólido es de tal pureza que no necesita purificación posterior, pero las aguas madres se extraen con AcOEt. Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, se filtra y se destila a presión reducida. Se purifica el crudo por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad desde Hexano:AcOEt (7:3) hasta (1:1). Sólido beige, R = 63 % (84 mg).

¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 2.99 (t, 2H), 3.88 (t, 2H), 6.91 (s, 1H), 6.99 (dd, 1H, *J* = 4 Hz y *J* = 8 Hz), 7.78 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 8.39 (s, 1H), 8.52 (s, 1H).

¹³C RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 162.1, 156.1, 154.9, 145.2, 134.4, 130.6, 122.8, 114.1, 111.0, 102.3, 60.8, 33.4.

MS (ESI +MS): *m/z* = 274 [M⁺ + H⁺]. +MS2 (274): *m/z* = 246, 228, 204, 188, 178, 172, 147, 144, 127, 122, 104, 68.

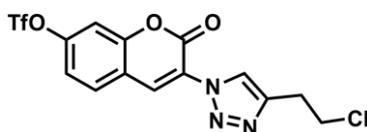
3-(4-(2-hidroxietil)-1,2,3-triazol)-7-trifluorometansulfoniloxicumarina (10):

Se sintetiza análogamente a **6**. En un balón se disuelve la cumarina **9** (245 mg, 0.89 mmol) en CH_3CN seco (19 mL), y luego se agrega la *N*-fenilbis(trifluorometansulfonamida) (353 mg, 0.99 mmol) y DIPEA (203 μL , 1.1 mmol). La mezcla se deja agitando a T.A. por 1h. Se concentra el crudo para eliminar el disolvente y se realiza una cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: Hexano:AcOEt (8:2). Sólido blanco, R = 91% (329 mg).

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 3.01 (t, 2H), 3.88 (t, 2H), 7.61 (dd, 1H, $J = 4$ Hz y $J = 8$ Hz), 7.74 (s, 1H), 8.19 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 8.50 (s, 1H), 8.73 (s, 1H).

^{13}C RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 153.1, 151.0, 145.6, 131.6, 131.2, 122.9, 119.1, 118.6, 110.2, 60.8, 29.5.

MS (ESI +MS): $m/z = 406$ [$\text{M}^+ + \text{H}^+$], 274, 98. +MS2 (406): $m/z = 405, 245, 227, 203, 189, 177, 171, 161, 143, 133, 119$.

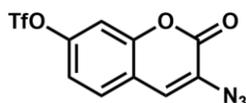
3-(4-(2-cloroetil)-1,2,3-triazol)-7-trifluorometansulfoniloxicumarina (11): (156)

En un balón se coloca el alcohol **10** (68 mg, 0.17 mmol), se disuelve en CH_2Cl_2 (7 mL), y se agrega el SOCl_2 (140 μL , 1.85 mmol) en dos partes. Se coloca el balón en una bañía de agua-hielo a 0°C y se agrega la Py (148 μL , 1.85 mmol). Se deja agitando a T.A. por 48 h. Se vuelca sobre agua-hielo y se hace un reparto. La fase orgánica se lava con NaHCO_3 (ac) (1 x 15 mL), luego con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ac) (2 x 15 mL) y un lavado final con agua. Se juntan las fases orgánicas, se seca con Na_2SO_4 , se filtra y destila a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: Hexano:AcOEt (6:4). Sólido blanco, R = 45% (32 mg).

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 3.31 (t, 2H), 3.98 (t, 2H), 7.62 (dd, 1H, $J = 4$ Hz y $J = 8$ Hz), 7.64 (s, 1H), 8.20 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 8.60 (s, 1H), 8.76 (s, 1H).

^{13}C RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 155.1, 153.2, 151.1, 144.4, 131.8, 131.2, 124.5, 123.3, 120.3, 119.1, 118.6, 117.1, 110.3, 43.1.

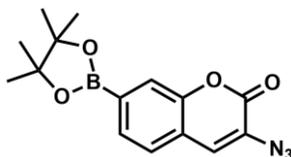
MS (ESI +MS): $m/z = 423$ (M^+ , 75%), 425 (25%), 359, 318.

3-azido-7-trifluorometansulfoniloxicumarina (13): (137)

Se sintetiza análogamente a los triflatos de cumarina **1** y **2**, partiendo de 3-azido-7-hidroxycumarina **8** (240 mg, 1.18 mmol), piridina (190 μ L, 2.36 mmol), anhídrido trifluorometansulfónico (235 μ L, 1.4 mmol) en 10 mL CH_2Cl_2 seco, agregados sobre un baño de agua-hielo a 0°C , y se deja agitando a T.A. por 1 h y 30 min. Se agrega 20 mL de Et_2O y se extrae con HCl 1M (3 x 10mL). La fase orgánica se lava con solución saturada de NaHCO_3 (ac) (1 x 10 mL) y solución saturada de NaCl (ac) (1 x 15 mL). La capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , filtra y el disolvente se destila a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: Hexano:AcOEt (6:4). Aceite amarillo anaranjado, R = 85% (339 mg).

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.47 (1H, dd, $J = 4$ Hz y $J = 8$ Hz), 7.60 (2H, s), 7.87 (1H, d, $J = 8.0$ Hz). ^{13}C RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 156.3, 156.3, 151.6, 149.5, 129.48, 127.4, 124.6, 120.3, 120.1, 118.2, 110.0.

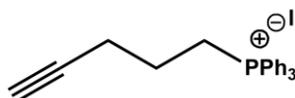
MS (EI): m/z (%) = 335 (M^+ , 5), 307 (15), 279 (21), 263 (19), 187 (29), 130 (42), 102 (41), 69 (100).

3-azido-7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)cumarina (14):

En un balón se coloca la 3-azido-7-trifluorometansulfoniloxicumarina **13** (100 mg, 0.3 mmol), *bis*(pinacolato)diboro (75 mg, 0.3 mmol), acetato de potasio (87 mg, 0.9 mmol) y $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (73 mg, 0.09 mmol), y se disuelve en 10 mL de dioxano. La mezcla se lleva a reflujo por 6 h. Una vez a temperatura ambiente, se concentra a vacío para eliminar el dioxano y el crudo se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: Hexano:AcOEt (7:3). Sólido amarillo, R = 23% (21 mg).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 1.37 (12H, s), 7.15 (1H, dd, $J = 4$ Hz y $J = 8$ Hz), 7.36 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.62 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7.71 (1H, s). ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 130.0, 125.0, 122.0, 118.0, 25.0 (4C).

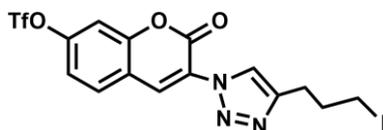
MS (ESI +MS): m/z = 287 [$\text{M}^+ - 2\text{N} + 2\text{H}^+$], 284, 279, 267.

Ioduro de 4-pentin-1-trifenilfosfonio (18): (157)

En un balón se coloca 5-iodo-1-pentino (300 μ L, 2.6 mmol), PPh₃ (2 g, 7.9 mmol), y se disuelve en 3 mL de CH₃CN, se lleva el sistema a reflujo por 15 h. Luego de ese tiempo se evapora el disolvente a presión reducida. Al crudo así obtenido se le agregan 20 mL de hexano en 3 partes y se tritura para eliminar el óxido de trifenilfosfina formado. Se retira el sobrenadante cada vez y al precipitado se le realiza una cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad: CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:MeOH (96:4). Sólido blanco, R = 80% (940 mg).

¹H RMN (400 MHz, (CDCl₃) δ 1.87 (2H, q, J = 8, 4 y 12 Hz), 2.02 (1H, t, J = 4 Hz), 2.68 – 2.69 (2H, m), 3.89 – 3.97 (2H, m), 7.71 – 7.87 (15H, m). ¹³C RMN (400 MHz, (CDCl₃) δ 135.2, 135.2, 133.8, 133.7, 130.6, 130.3, 118.3, 117.5, 82.6, 70.9, 22.2, 21.9, 21.6, 19.3, 19.1.

MS (ESI +MS): m/z = 457.07 [M⁺], 458.08 [M⁺ + H⁺], 329.13 [M⁺ - I⁻], 330.20 [M⁺ - I⁻ + H⁺], 329.46, 280.21, 279.21.

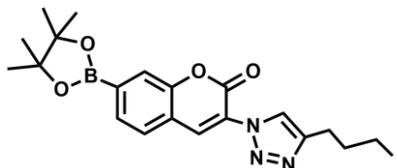
3-(4-(3-iodopropil)-1,2,3-triazol)-7-trifluorometansulfoniloxicumarina (19): (155)

Se sintetiza análogamente a **9**. En un balón se coloca **13** (100 mg, 0.3 mmol) y se disuelve en 12 mL de una mezcla H₂O:CH₃CN (2:1). Se agrega 5-iodo-1-pentino (44 μ L, 0.39 mmol), CuSO₄·5H₂O (8 mg, 0.03 mmol) previamente molido y N₂H₄·H₂O (15 μ L, 0.3 mmol) en dos veces. Se deja agitando vigorosamente a T.A. por 24 h. Luego de ese tiempo se enfría la mezcla para ayudar a sedimentar un sólido. Se filtra a vacío. El sólido es de tal pureza que no necesita purificación posterior. Sólido beige, R = 66 % (105 mg).

¹H RMN (400 MHz, (CDCl₃) δ 2.25 – 2.32 (q, 2H, J = 8, 4 y 12 Hz), 2.95 (t, 2H, J = 8 Hz), 3.27 (t, 2H, J = 8 Hz), 7.34 – 7.37 (dd, 1H, J = 8 y 4 Hz), 7.40 (d, 1H, J = 4 Hz), 7.77 (d, 1H, J = 8 Hz), 8.47 (s, 1H), 8.61 (s, 1H). ¹³C RMN (400 MHz, (CDCl₃) δ 163.1, 156.0, 151.8, 137.7, 137.0, 129.4, 121.9, 121.7, 119.1, 117.2, 110.7.

MS (ESI +MS): m/z = 529.95 [M⁺], 530.96 [M⁺ + H⁺], 531.97 [M⁺ + 2H⁺], 336.21, 330.27, 329.17.

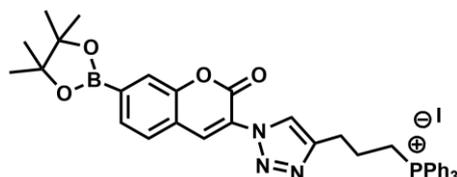
3-(4-(3-iodopropil)-1,2,3-triazol)-7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)cumarina (20):



Se sintetiza de manera análoga al éster borónico **14**. En un balón se coloca el triflato **19** (50 mg, 0.095 mmol), *bis*(pinacolato)diboro (26 mg, 0.1 mmol), acetato de potasio (28 mg, 0.3 mmol) y Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂ (23 mg, 0.03 mmol), y se disuelve en 5 mL de dioxano. La mezcla se lleva a reflujo por 7 h. Una vez a T.A., se concentra a presión reducida para eliminar el dioxano y el crudo así obtenido se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad Hexano:AcOEt (7:3) hasta (6:4). Aceite amarillo, R = 42% (20 mg).

¹H RMN (400 MHz, (CDCl₃) δ 1.38 (s, 12H), 2.25 – 2.32 (q, 2H, *J* = 8, 4 y 12 Hz), 2.93 (t, 2H, *J* = 8 Hz), 3.25 (t, 2H, *J* = 8 Hz), 7.64 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 7.78 – 7.80 (dd, 1H, *J* = 8 y 4 Hz), 7.84 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.58 (s, 1H).

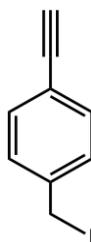
Ioduro de 3-((4-propil)-1,2,3-triazol)-7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)cumarintrifenilfosfonio (MitoCT-i):



Se sintetiza de manera análoga a **18**. En un balón se coloca el éster borónico **20** (10 mg, 0.02 mmol), PPh₃ (15 mg, 0.06 mmol), y se disuelve en 3 mL de CH₃CN, se lleva el sistema a reflujo por 13 h. Luego de ese tiempo se concentra la mezcla para eliminar el acetonitrilo, al crudo se le agregan 10 mL de Et₂O en 3 partes y se tritura retirando el sobrenadante cada vez. Sólido amarillo, R = 21% (3 mg).

¹H RMN (400 MHz, ((CD₃)₂CO) δ 2.21 – 2.23 (q, 2H, *J* = 4, 8 y 12 Hz), 3.07 – 3.17 (2H, m), 3.53 (2H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.29 - 7.34 (m, 1H), 7.39 – 7.43 (m, 2H), 7.55 – 7.58 (m, 1H), 7.69 – 7.74 (m, 1H), 7.82 – 8.05 (m, 15 H).

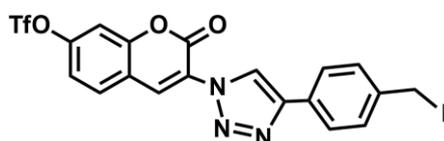
MS (ESI +MS): *m/z* = 642 [M⁺], 664 [M⁺ + Na⁺] 560, 298, 270. +MS2 (642): *m/z* = 614, 352, 324, 287, 263, 262, 252.

1-etinil-4-(iodometil)benceno (21):(158)

En un balón se agrega PPh_3 (600 mg, 2.3 mmol) e imidazol (156 mg, 2.3 mmol) en 6 mL de CH_2Cl_2 . Luego se agrega I_2 (580 mg, 2.3 mmol) y se deja agitando a T.A. hasta disolución total (10 min). Luego se agrega (4-etinilfenil)metanol (200 mg, 1.5 mmol), se deja agitando a T.A. protegido de la luz por 5 h. Se monitorea por TLC. Una vez finalizada se agrega solución saturada de NaCl y se hace un reparto con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na_2SO_4 , se filtra y destila a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: Hexano: Et_2O (96:4). Sólido blanco, R = 70% (252 mg).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3.09 (s, 1H), 4.44 (s, 1H), 7.32 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7.40 (d, 2H, $J = 8$ Hz). ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 132.2, 132.1, 132.0, 128.6, 128.5, 82.7, 80.6.

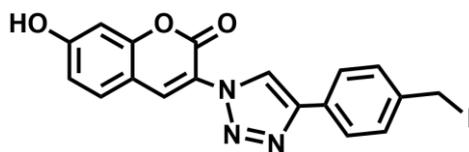
MS (ESI +MS): $m/z = 279$ [$\text{M}^+ + \text{K}^+$] 219, 217.

7-trifluorometansulfoniloxi-3-[4-(4-(iodometil)fenil)-1,2,3-triazol]cumarina (22):

En un balón se disuelve **13** (100 mg, 0.3 mmol) en 12 mL de una mezcla $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2), y luego se agrega el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (8 mg, 0.03 mmol), 1-etinil-4-(iodometil)benceno **21** (108 mg, 0.44 mmol) y $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (14 μL , 0.3 mmol) en dos partes. Se deja agitando a T.A. protegido de la luz por 24h. Se monitorea por TLC. Luego de ese tiempo se coloca el balón en la heladera para favorecer precipitación total del sólido formado. Se filtra a vacío, el sólido filtrado se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: Hexano: AcOEt (8:2). Sólido amarillo, R = 47 % (81 mg).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4.51 (s, 2H), 7.36 (dd, 1H, $J = 4$ y 8 Hz), 7.43 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 7.48 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7.81 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 7.86 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 8.70 (s, 1H), 8.93 (s, 1H). ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 140.5, 139.8, 135.2, 134.6, 133.3, 129.4, 126.4, 119.1, 5.3.

MS (EI): m/z (%) = 437 (39), 304 (100), 130 (65).

7-hidroxi-3-[4-(4-(iodometil)fenil)-1,2,3-triazol]cumarina (24):

En un balón se disuelve 1-etinil-4-(iodometil)benceno **21** (210 mg, 1.18 mmol) en 15 mL de una mezcla CH₃CN:H₂O (1:2), y luego se adiciona **8** (120 mg, 0.8 mmol), CuSO₄•5H₂O (20 mg, 0.08 mmol) y N₂H₄•H₂O (40 µL, 0.8 mmol) en dos partes. Se deja agitando a T.A. protegido de la luz por 48 h. Se monitorea por TLC. Luego de ese tiempo se coloca el balón en la heladera para favorecer la precipitación total del sólido formado. Se filtra a vacío. El sólido filtrado es de tal pureza que no necesita purificación posterior. Sólido beige, R = 64 % (223 mg).

¹H RMN (400 MHz, ((CD₃)₂CO) δ 4.71 (s, 2H), 6.94 (s, 1H), 7.02 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 7.59 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 7.82 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 7.98 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 8.61 (s, 1H). ¹³C RMN (400 MHz, ((CD₃)₂CO) δ 166.5, 157.2, 156.6, 133.0, 132.9, 132.6, 119.7, 115.1.

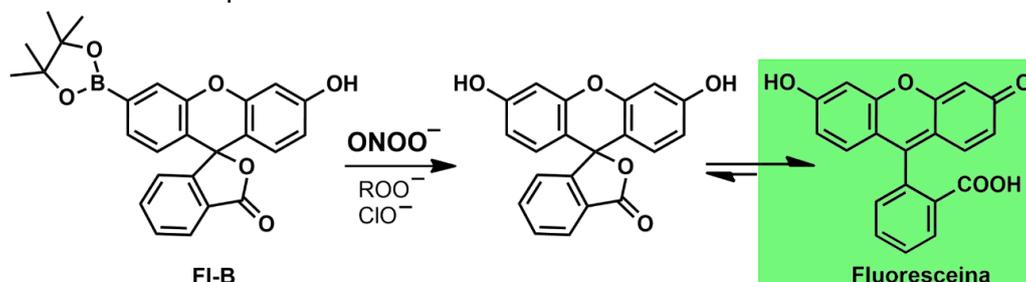
MS (ESI +MS): *m/z* = 445.99 [M⁺], 447.0 [M⁺ + H⁺], 445.26.

Capítulo 1. Parte 2.1

2.1 Fluoresceína-boronato (FI-B): Síntesis, caracterización y aplicación en sistemas biológicos

Introducción y estrategia experimental

La detección específica y sensible de peroxinitrito ($\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$) en sistemas biológicos es un gran desafío debido a su alta reactividad frente a varias biomoléculas. En esta sección describimos la síntesis, caracterización y validación de fluoresceína-boronato (FI-B) como sonda fluorescente altamente sensible para la detección directa de peroxinitrito en sistemas biológicos. FI-B fue sintetizada por una ruta sintética en dos pasos, con alta pureza (>99%) y buen rendimiento global (~42%). Evaluamos su reactividad con oxidantes biológicos relevantes, incluyendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso, (HOCl) y peroxinitrito. La constante de velocidad para la reacción de FI-B con peroxinitrito fue $1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, un millón de veces más rápida que la constante de velocidad medida para H_2O_2 ($k = 1.7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y 2.700 más rápido que HOCl ($6.2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) a 37°C y pH 7.4. Incluso en presencia de concentraciones fisiológicas de CO_2 , un importante blanco de peroxinitrito, FI-B es capaz de reaccionar con peroxinitrito de manera significativa. Estudios experimentales y análisis cinéticos simulados confirman que el proceso de oxidación principal de FI-B tiene lugar con peroxinitrito en su forma aniónica (ONOO^-) a través de una reacción bimolecular directa y no con radicales derivados de peroxinitrito. FI-B se utilizó con éxito en la detección de peroxinitrito generado endógenamente por células endoteliales y en parásitos fagocitados por macrófagos. Además, los datos obtenidos permitieron estimar el flujo intracelular real de peroxinitrito: en células endoteliales estimuladas con ionomicina produjeron un flujo de peroxinitrito de $\sim 0.1 \mu\text{M s}^{-1}$, mientras que macrófagos inmunestimulados lo hacen en el orden de $\sim 1 \mu\text{M s}^{-1}$ dentro de los fagosomas infectados con *T. cruzi*. FI-B no es tóxica en concentraciones de hasta 1 mM durante 24h. Demostramos que FI-B es más sensible que el ácido cumarin-7-borónico (CBA) debido a un mayor coeficiente de absorptividad molar y mayor rendimiento cuántico. Nuestros resultados demuestran que FI-B es una sonda cinéticamente selectiva y altamente sensible para detección directa de peroxinitrito en sistemas celulares.



Esquema 25. Oxidación de FI-B dando el fenol correspondiente. El producto de la reacción está en equilibrio tautomérico con la lactona abierta llamada fluoresceína, un producto altamente

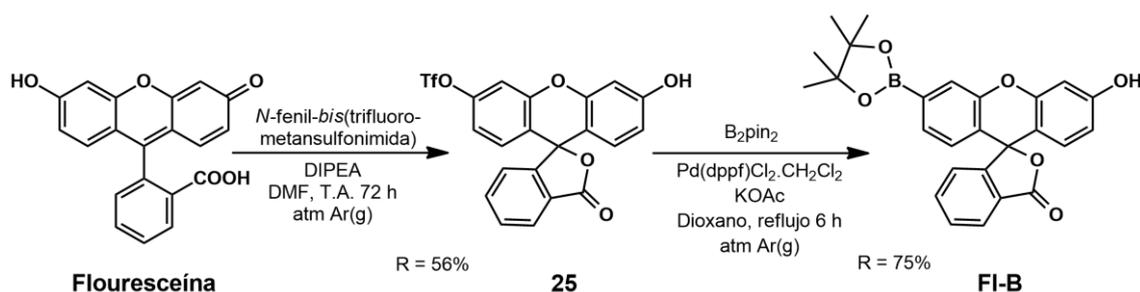
fluorescente. En solución acuosa y a pH 7.4, las formas monoaniónica (pK_a 4.3) y dianiónica (pK_a 6.4) de la fluoresceína son predominantes (159).

Resultados y Discusión

1. Síntesis y caracterización de FI-B

1.1 Síntesis y determinación de pureza

FI-B fue generada en dos pasos de reacción con alto rendimiento global (~ 42%) y alta pureza (>99%), Esquema 26. En primer lugar, a partir de fluoresceína comercial se obtiene el correspondiente monotriflato (triflato: trifluorometanosulfonato). Para esto se exploraron dos agentes triflantes, en primer lugar, anhídrido trifluorometansulfónico y Py como base, donde se obtuvo el correspondiente monotriflato de fluoresceína **25** con un rendimiento moderado de 23%. Sin embargo, en estas condiciones también se obtuvo el ditriflato con un rendimiento de 18%. Posteriormente, utilizamos *N*-fenil-bis(trifluorometansulfonimida) como el agente triflante y DIPEA (*N,N*-diisopropiletilamina) recién destilada como base, en estas condiciones se obtuvo el monotriflato de interés con un 56% de rendimiento, Esquema 26. A continuación, se procede a realizar la borilación bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki-Miyaura con *bis*(pinacolato)diboro, en medio básico con catalizador de Pd (136), obteniéndose FI-B con alto rendimiento (R= 75%).



Esquema 26. Ruta sintética optimizada para la obtención de FI-B.

La pureza de FI-B recién sintetizada fue determinada por espectroscopía de $^1\text{H-NMR}$ (Figura 19). Cada señal fue asignada al correspondiente protón de la molécula. No se observan señales adicionales además de las señales correspondientes a trazas de disolventes. Por lo tanto, la pureza del compuesto es > 99%.

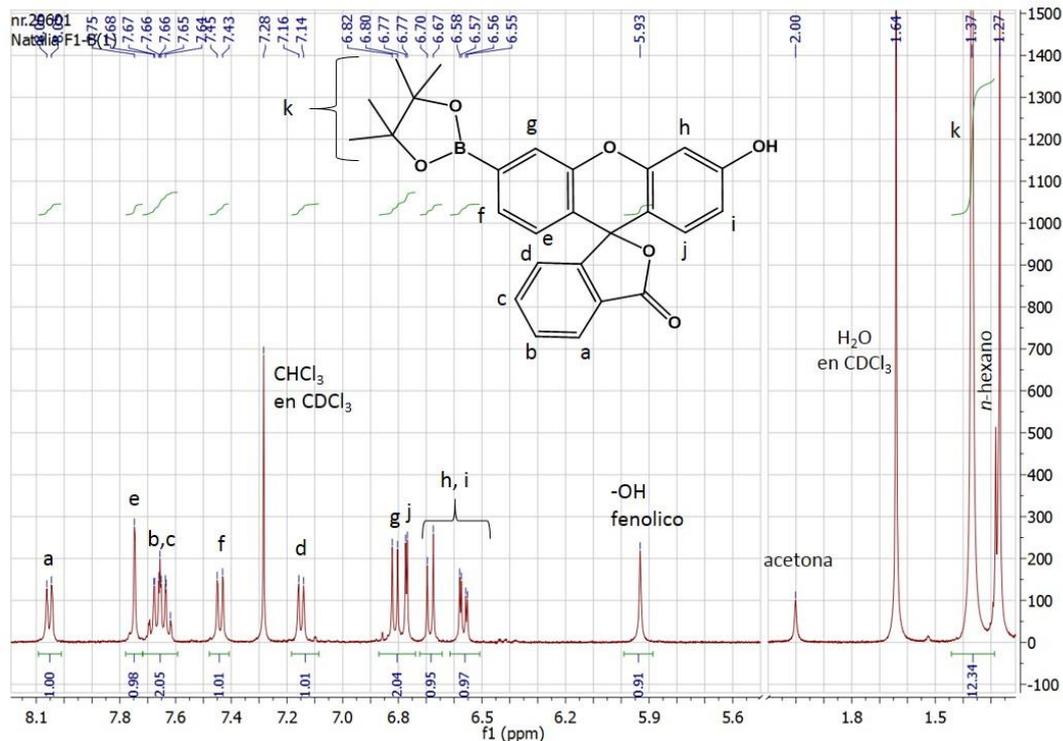


Figura 19. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de FI-B, registrado en un equipo Bruker DPX-400 (400 MHz) utilizando CDCl_3 como disolvente. Se muestran las señales asignadas para cada grupo de protones. No se observan señales en la región entre 2.00 a 5.60 ppm y por encima de 8.10 ppm.

1.2 Almacenamiento de las soluciones

Al igual que para la mayoría de los compuestos orgánicos el correcto almacenamiento es como sólido puro, y no disuelto en un medio acuoso para evitar posibles degradaciones. Si bien para fines biológicos se utilizan medios acuosos, una pequeña fracción de FI-B podría hidrolizarse (0.5-1%) a fluoresceína al almacenarla por un período prolongado en este medio (Figura 20). Por lo tanto, hay que considerar su almacenamiento como sólido puro, o también es posible en solución stock concentrada disuelta en 100% DMSO almacenadas a -20°C , y realizar cada vez una nueva dilución a la concentración de trabajo en medio acuoso al momento de utilizarla en el experimento, y posteriormente descartarla.

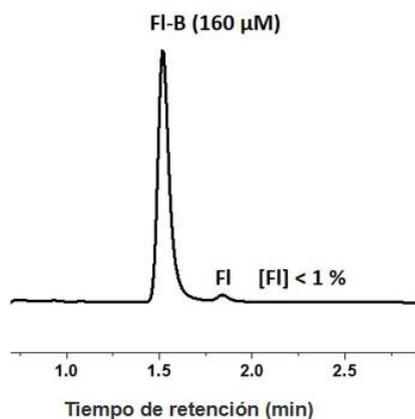


Figura 20. Cromatograma de HPLC de una alícuota de FI-B ($160\ \mu\text{M}$) disuelta en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) almacenada por ~ 90 días, donde se observa una pequeña señal correspondiente a fluoresceína con un tiempo de retención de 1.8 min y su concentración calculada $< 1\%$.

1.3 Evaluación de las propiedades espectroscópicas

Una vez obtenida FI-B evaluamos sus propiedades espectroscópicas y su reactividad frente a peroxinitrito. Para ello determinamos la emisión de fluorescencia tras la oxidación de FI-B (25 μM) por adiciones sucesivas de peroxinitrito (0 – 10 μM).

El aumento de la fluorescencia emitida sigue una respuesta lineal (Figuras 21 y 22). La fluoresceína generada es un producto altamente fluorescente, con alto rendimiento cuántico ($\Phi_{F, FI} = 0.93\text{--}0.94$ (115, 159)), a diferencia de 7-hidroxycumarina (COH) donde para las mismas concentraciones se genera menor intensidad de fluorescencia debido a su menor rendimiento cuántico ($\Phi_{F, COH} = 0.15$ (160)), Figura 22.

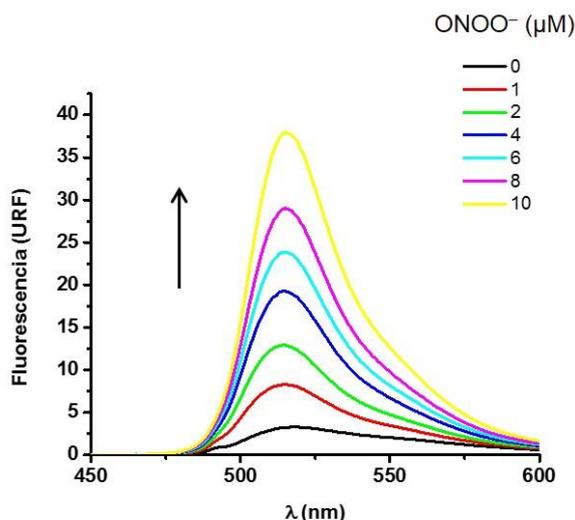


Figura 21. Respuesta fluorescente tras la oxidación de FI-B por peroxinitrito. Espectro de emisión de fluorescencia obtenido al hacer reaccionar FI-B (25 μM) con concentraciones crecientes de peroxinitrito (0 – 10 μM) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) a 25°C. Excitación a $\lambda = 492$ nm; emisión recogida desde 450 a 600 nm con un máximo en 515 nm.

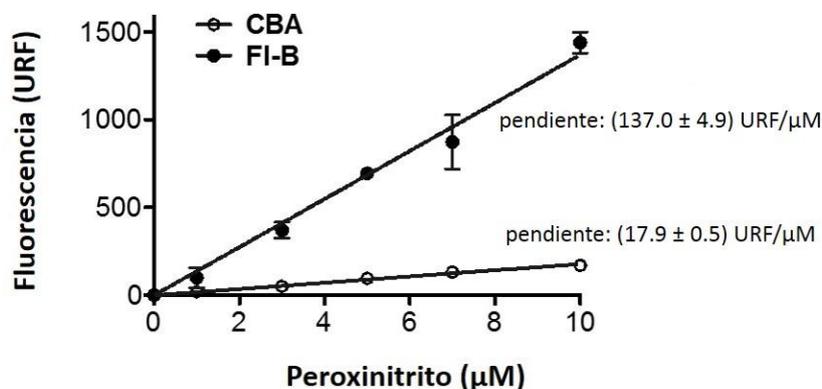
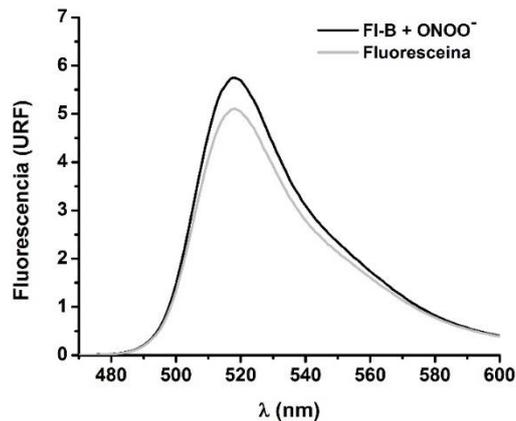


Figura 22. Detección de fluoresceína y 7-hidroxycumarina tras la oxidación de FI-B y CBA (20 μM), respectivamente, por peroxinitrito (0 – 10 μM) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) a 25°C. La fluorescencia se midió en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan) haciendo medidas simultáneas $\lambda_{\text{ex/em}} = 492/515$ nm y $\lambda_{\text{ex/em}} = 332/470$ nm para FI-B y CBA respectivamente. Los datos se ajustaron a una línea recta cuya pendiente (137.0 ± 4.9) o (17.9 ± 0.5) URF/ μM para la oxidación de FI-B y para la oxidación de CBA respectivamente.

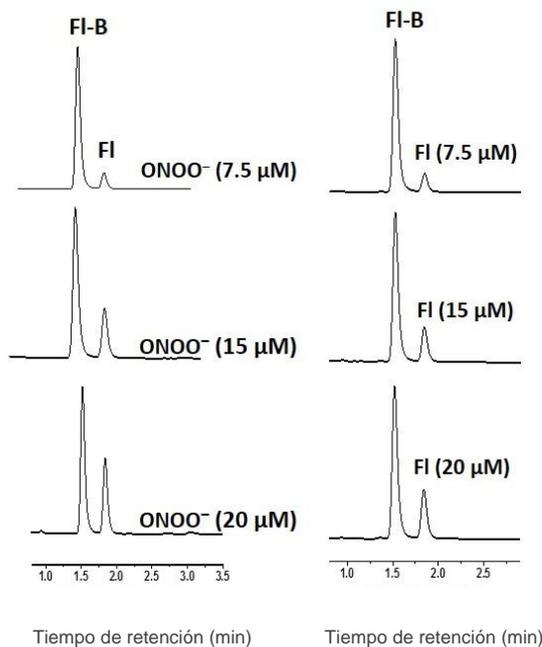
1.4 Determinación del rendimiento de la reacción con peroxinitrito

Posteriormente, determinamos el rendimiento de la reacción de FI-B con peroxinitrito por espectroscopia de emisión de fluorescencia y separación analítica de los productos por HPLC con detección fluorimétrica, siendo el rendimiento de la reacción del 99%, Figura 23. La posible formación de subproductos nitrados o especies dimerizadas, sería < 1%.

a



b



c

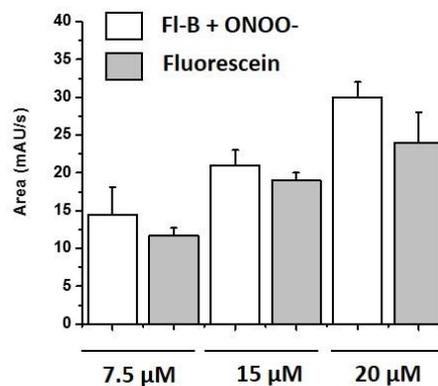
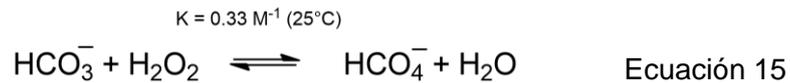


Figura 23. Determinación del rendimiento de la reacción de FI-B con peroxinitrito. (a) Espectros de emisión de fluorescencia obtenidos al hacer reaccionar FI-B (100 μM) con peroxinitrito (7.5 μM) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) (trazo negro), y se compara con el espectro de emisión de fluoresceína (7.5 μM) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) conteniendo FI-B (100 μM) (trazo gris). $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$ y λ_{em} de 480 a 600 nm. (b) Cromatogramas de HPLC (Absorción UV-Vis, detector a 254 nm) de las mezclas FI-B (100 μM) y peroxinitrito (7.5, 15, 20 μM) (izquierda), o fluoresceína (FI) (7.5, 15, 20 μM) (derecha) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4). (c) Comparación de las áreas obtenidas en b) para las diferentes concentraciones de peroxinitrito o fluoresceína.

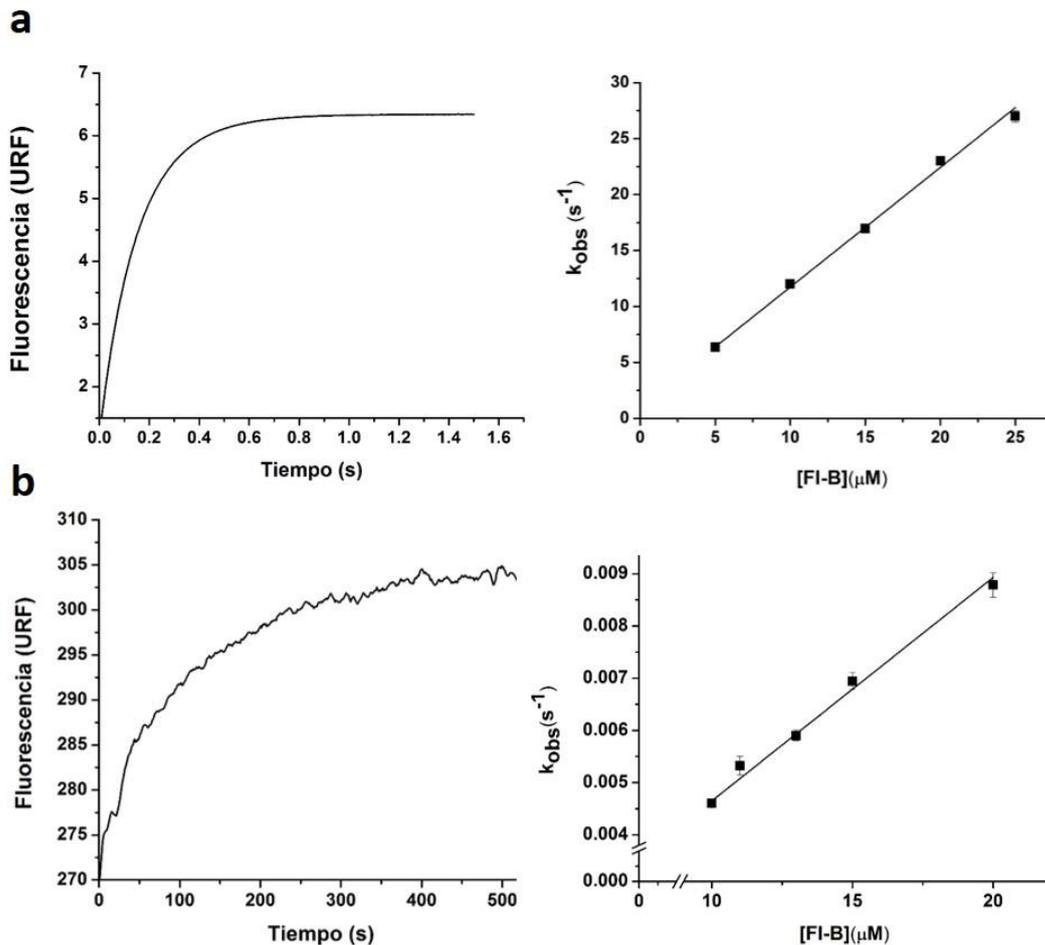
2. Oxidación de FI-B por oxidantes de relevancia biológica

2.1 Análisis cinético

Determinamos las constantes cinéticas de la reacción de FI-B con peroxinitrito, HOCl y H₂O₂ a 25°C y 37°C y pH 7.4 bajo condiciones de *pseudo*-primer orden (Figuras 24, 25 y Tabla 9). Además, se estudió la reacción entre FI-B y peroximonocarbonato (HCO₄⁻) a 25°C y pH 7.4, producto de la reacción en equilibrio entre el peróxido de hidrógeno y el bicarbonato, una especie más reactiva y oxidante que el H₂O₂, Ecuación 15:



Los cuatro oxidantes fueron capaces de oxidar FI-B. Sin embargo, la velocidad de reacción de FI-B con peroxinitrito es 10⁶, 5.500 y 2.500 veces más rápida que para H₂O₂, HCO₄⁻ o HOCl, respectivamente. A pesar de que en la literatura se ha reportado que FI-B no es capaz de reaccionar con HOCl (115), más adelante en la sección 2.2 analizaremos las condiciones experimentales en que fueron hechas esas suposiciones, que afectaron la reactividad hacia este oxidante en particular.



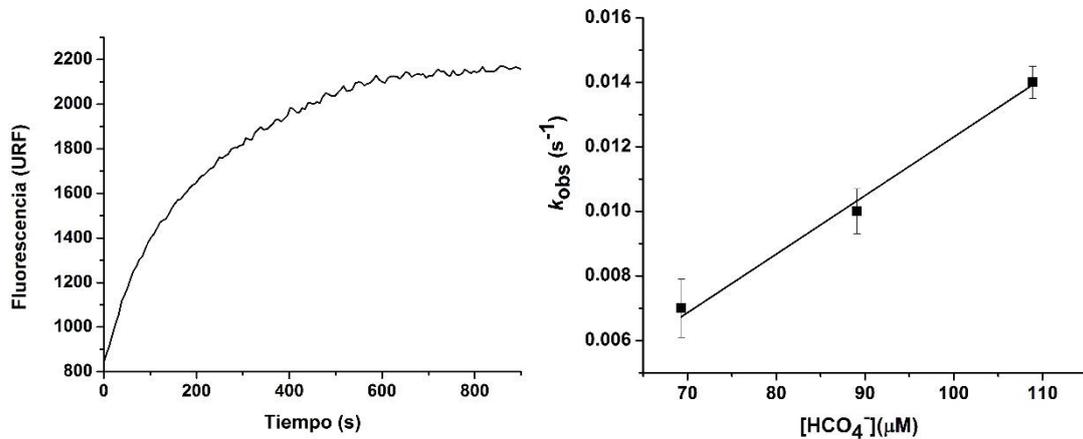
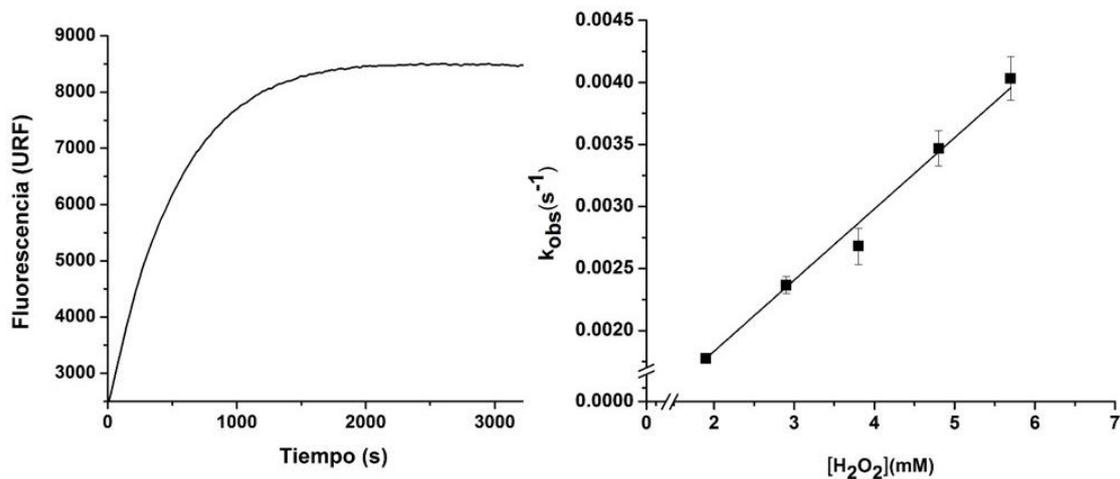
c

d


Figura 24. Cinética de la reacción de FI-B con peroxinitrito, HOCl, HCO_4^- y H_2O_2 , determinaciones realizadas a 25°C y pH 7.4 (a) Curso temporal de la emisión de fluorescencia tras la oxidación de FI-B (5 μM) por peroxinitrito (0.5 μM), registrada en un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped-flow). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de FI-B en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). (b) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B (14 μM) por HOCl (1 μM), registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de FI-B en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). (c) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B (10 μM) por H_2O_2 (6 mM) conteniendo HCO_3^- (55 mM), registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de HCO_4^- en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). (d) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B (10 μM) por H_2O_2 (2 mM), registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de H_2O_2 en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). Todas las determinaciones se realizaron en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4, conteniendo 0.1 mM de DTPA a 25°C, con $\lambda_{exc} = 492$ nm; $\lambda_{em} = 515$ nm, excepto para las determinaciones realizadas en stopped-flow donde mediciones de fluorescencia se realizaron con $\lambda_{exc} = 492$ nm y se recoge emisión total).

Cabe destacar, que al realizar las determinaciones de peroxinitrito o HOCl estos oxidantes fueron utilizados en cantidades subestequiométricas respecto a FI-B, mientras que para las determinaciones de H_2O_2 se tuvo que utilizar este oxidante en gran exceso debido a su cinética muy lenta (pequeña constante cinética de segundo orden).

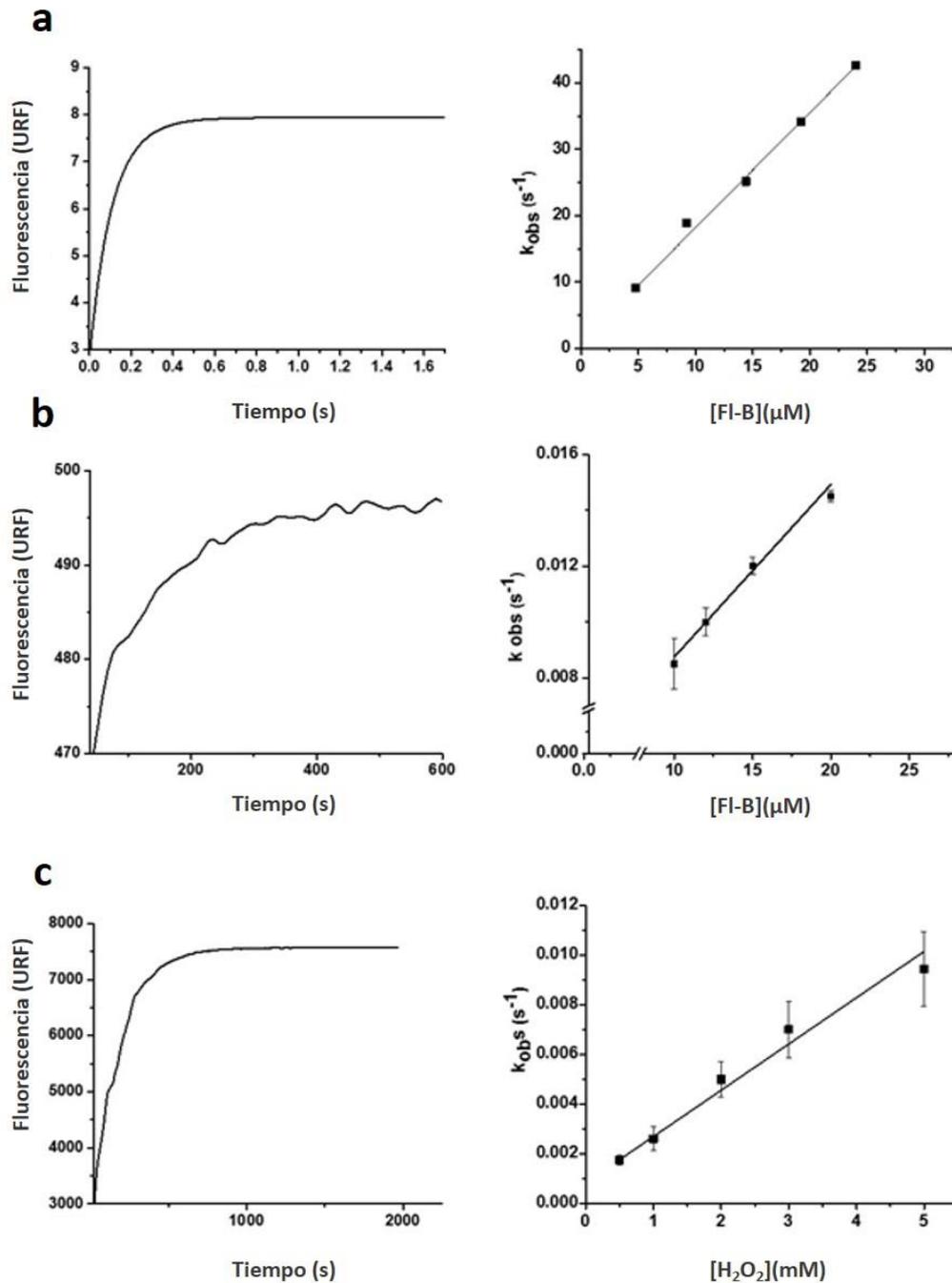


Figura 25. Cinética de la reacción de FI-B con peroxinitrito, HOCl y H_2O_2 , determinaciones realizadas a $37^\circ C$ y pH 7.4 (a) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B ($5 \mu M$) por peroxinitrito ($0.5 \mu M$), registrada en un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped-flow). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de FI-B en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). (b) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B ($10 \mu M$) por HOCl ($1 \mu M$), registrada en un lector de placas de

fluorescencia (Varioskan). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de FI-B en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). (c) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B (10 μ M) por H₂O₂ (2 mM), registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de H₂O₂ en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). Al igual que para las determinaciones a 25°C, el H₂O₂ se tuvo que utilizar en gran exceso debido a su cinética lenta. Todas las determinaciones se realizaron en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4, conteniendo 0.1 mM de DTPA a 37°C, con λ_{exc} = 492 nm; λ_{em} = 515 nm, excepto para las determinaciones realizadas en stopped-flow donde mediciones de fluorescencia se realizaron con λ_{exc} = 492 nm y se recoge emisión total).

Tabla 9. Constantes cinéticas determinadas para la reacción entre FI-B con diferentes oxidantes a 25°C o 37°C y pH 7.4.

Oxidante	k (M ⁻¹ s ⁻¹) a 25°C	k (M ⁻¹ s ⁻¹) a 37°C
Peroxinitrito	(1.07 ± 0.02) x 10 ⁶	(1.70 ± 0.05) x 10 ⁶
HOCl	(4.3 ± 0.2) x 10 ²	(6.2 ± 0.1) x 10 ²
HCO ₄ ⁻	(181.4 ± 12.0)	N.D.
H ₂ O ₂	(0.65 ± 0.03)	(1.7 ± 0.2)

N.D.: No determinado

2.2 Estudio comparativo sobre las diferentes condiciones experimentales que afectan la reactividad de FI-B con HOCl

FI-B es capaz de reaccionar con los oxidantes de relevancia biológica estudiados en la sección 2.1. Las constantes cinéticas obtenidas indican claramente la gran preferencia ésteres borónicos por peroxinitrito (ONOO⁻) debido a su perfil cinético más favorable sobre los otros nucleófilos (ClO⁻, HO₂⁻, HCO₄⁻), lo que está de acuerdo con lo determinado previamente para otros derivados de boronatos (27, 110).

Sin embargo, en la literatura se reportó que FI-B no es capaz de reaccionar con HOCl (115), pero esta discrepancia es debida a las diferentes condiciones experimentales en que la reacción fue estudiada. Los experimentos reportados por Chang y colaboradores en (115) se llevaron a cabo en buffer HEPES (*N*-(2-hidroxiethyl)piperazina-*N'*-(ácido 2-etansulfónico)), y en la solución stock de la sonda se utilizó DMSO como disolvente.

Ambos, el disolventes DMSO y el buffer HEPES interfieren en la reacción de HOCl hacia la sonda, donde el HOCl es capaz de reaccionar con el agrupamiento piperazina dando varios subproductos (compuestos tipo a la cloraminas) (161) enmascarando la reacción de HOCl hacia la sonda (Figura 26). Otra posible interacción podría deberse al grupo funcional sulfóxido del DMSO, que es propenso a ser oxidado por HOCl produciendo la sulfona correspondiente (162, 163), mientras que el ácido acético utilizado como disolvente alternativo en este trabajo está en el máximo de oxidación. En la Figura 26 b), se muestra cómo el exceso de oxidante en buffer fosfato daña a la estructura de la sonda apagando la fluorescencia con el tiempo, observándose una respuesta en forma de campana. Esto no ocurre al realizar la reacción en buffer HEPES y usando DMSO como disolvente de la sonda Figura 26 c).

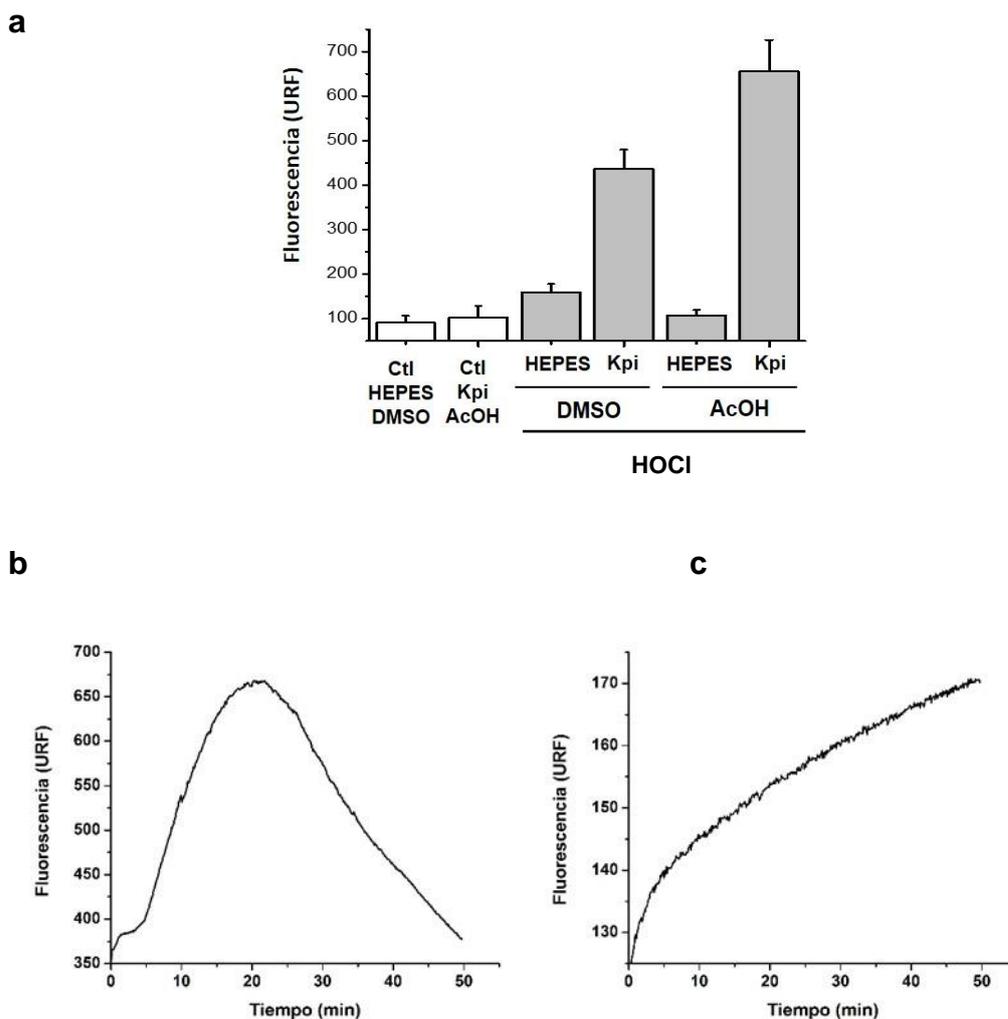


Figura 26. (a) Respuesta fluorescente por la oxidación de FI-B ($5 \mu\text{M}$) disuelta en DMSO (dimetilsulfóxido) o ácido acético (AcOH) reaccionando con HOCl ($100 \mu\text{M}$) (barras grises), medida a los 15 minutos del agregado del oxidante en diferentes buffers: HEPES (20 mM) o fosfato (KPi, 100 mM) a pH 7.0 y 25°C . (b) Curso temporal de la respuesta de fluorescencia tras la oxidación de FI-B ($5 \mu\text{M}$) disuelta en AcOH por HOCl ($100 \mu\text{M}$) en Kpi (100 mM) a pH 7.0 y 25°C . (c) Curso temporal de la respuesta de fluorescencia tras la oxidación de FI-B ($5 \mu\text{M}$) disuelto en DMSO por HOCl ($100 \mu\text{M}$) en HEPES (20 mM) a pH 7.0 y 25°C . Para todos los casos, la emisión de fluorescencia se registró en un lector de placas (Varioskan), $\lambda_{\text{exc}} = 492 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$.

2.3 Evaluación de la reactividad frente a oxidantes de un-electrón

Si bien los ácidos o ésteres borónicos por su átomo de B electrofílico, son capaces de sufrir adiciones por ataques de especies nucleofílicas, evaluamos si era posible su reacción con especies radicalares. En primer lugar, realizamos simulaciones cinéticas asistidas por computadora de la reacción de FI-B ($25 \mu\text{M}$) con peroxinitrito ($1 \mu\text{M}$), donde se calcula a lo largo del tiempo el consumo del reactivo FI-B, la formación del producto oxidado fluoresceína, y la descomposición homolítica de ONOOH en sus radicales

derivados ($\bullet\text{NO}_2$, $\bullet\text{OH}$) (Figura 27), a partir de las constantes cinéticas para todas las reacciones mostradas en la Tabla 10. Los datos muestran que en ausencia de CO_2 , y un exceso de FI-B sobre peroxinitrito, la mayoría del peroxinitrito (en su forma aniónica, $1\ \mu\text{M}$) reacciona con FI-B dando fluoresceína ($\sim 1\ \mu\text{M}$), y que la descomposición de ONOOH en sus radicales derivados es una ruta despreciable (Figura 27).

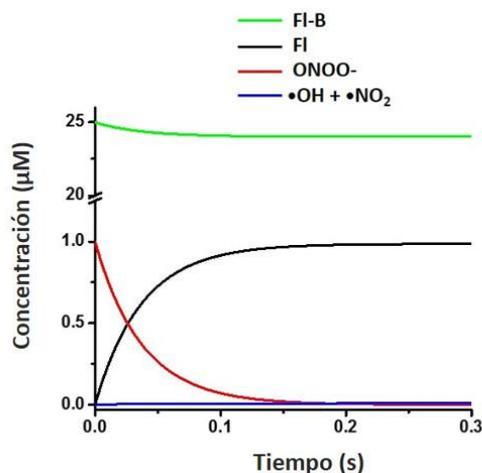


Figura 27. Simulación de la formación de radicales derivados de peroxinitrito ($\bullet\text{NO}_2$, $\bullet\text{OH}$). Simulaciones cinéticas asistidas por computadora de la formación de fluoresceína (FI), consumo de FI-B y descomposición de peroxinitrito a lo largo del tiempo, a partir de la reacción de FI-B ($25\ \mu\text{M}$) con peroxinitrito ($1\ \mu\text{M}$). También se indica la acumulación de radicales $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$ provenientes de la homólisis de ONOOH. Se utilizó el Software Gepasi (versión 3.3), y las reacciones y constantes de velocidad mostradas en la Tabla 10 (164, 165).

En ausencia de CO_2 , la mayoría del peroxinitrito reacciona directamente con FI-B y solo una menor fracción de peroxinitrito ($<1\%$ del total) sufre descomposición de primer orden a nitrato y radicales secundarios. Estos resultados respaldan que la formación de fluoresceína se debe a la reacción bimolecular directa de FI-B con peroxinitrito.

A continuación, realizamos experimentos para evaluar si los radicales derivados de peroxinitrito influyen o afectan la conversión de FI-B a fluoresceína. Para esto, aumentamos la estequiometría de la reacción (FI-B:peroxinitrito) a (1:1), además forzamos la generación de radicales o agregamos atrapadores de radicales, Figura 28. Los compuestos fenólicos como ácido *p*-hidroxifenilacético (pHPA), pueden ser hidroxilados, nitrados u oxidados con formación de dímeros por $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$. Debido a estas reacciones actúan como atrapadores de radicalarios, al consumir estas especies. La oxidación no enzimática de nitrito (NO_2^-) por un oxidante fuerte de un electrón como $\bullet\text{OH}$ o $\text{CO}_3^{\bullet-}$ es fuente de radical $\bullet\text{NO}_2$ (42), por lo que el agregado de nitrito a la reacción favorece la formación de $\bullet\text{NO}_2$.

Se realiza una condición de Adición Reversa (AR) donde se deja descomponer el peroxinitrito previamente, dando mayoritariamente nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), y así descartar la contribución de estas especies a la oxidación de la sonda, Figura 28.

El CO_2 es un blanco muy importante de peroxinitrito debido a su alta concentración en medios biológicos (1.2 mM) y su rápida reacción ($k \sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), (Esquema 27). Por lo tanto, evaluamos la capacidad de FI-B para detectar peroxinitrito en presencia de CO_2 . Incluso a concentraciones fisiológicas de CO_2 , FI-B es capaz de detectar peroxinitrito produciendo una buena señal fluorescente ($\sim 50\%$ de la señal original) como muestra la Figura 28.

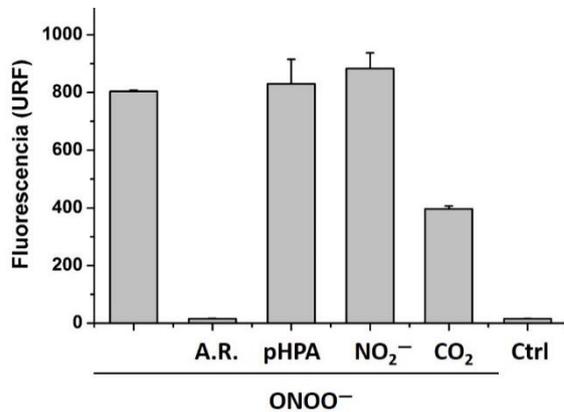
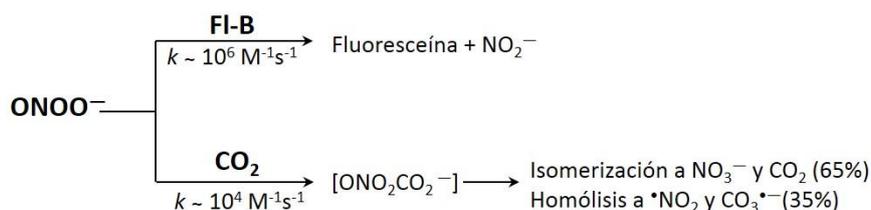


Figura 28. Respuesta de FI-B (10 μM) reaccionando con igual concentración de peroxinitrito (10 μM) en buffer fosfato 100 mM pH 7.4, a 25°C. A.R.: adición reversa, NaNO_2 (200 μM), pHPA (ácido *p*-hidroxifenilacético) (200 μM), NaHCO_3 25 mM dando 1.2 mM CO_2 .

2.4 Reactividad de FI-B con peroxinitrito en presencia de CO_2

A continuación, estudiamos la competencia de FI-B y CO_2 por peroxinitrito, realizando simulaciones asistidas por computadora y mediciones de curso temporal de oxidación de la sonda en espectrofotómetro de flujo detenido, trabajando a menores concentraciones de peroxinitrito (1 μM), en presencia de concentraciones fisiológicas de CO_2 y con FI-B (25 μM). En la Figura 29, se muestran los datos cinéticos experimentales y simulados de la competencia de peroxinitrito entre FI-B y CO_2 , según el Esquema 27. Donde se observa que en presencia de CO_2 hay una contribución marginal de los radicales de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$ al rendimiento de oxidación de FI-B.



Esquema 27. Representación esquemática de la competencia cinética entre FI-B y CO_2 por peroxinitrito.

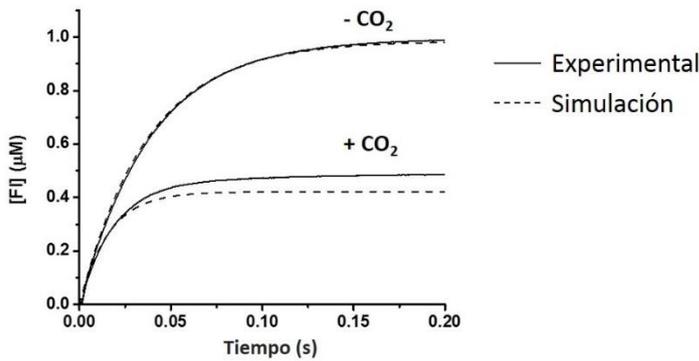


Figura 29. Reacción entre FI-B y peroxinitrito en presencia de CO₂. Curso temporal de la oxidación de FI-B (25 μM) por peroxinitrito (1 μM) en presencia o ausencia de CO₂ (NaHCO₃ 25 mM, CO₂ 1.2 mM), en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4 conteniendo 0.1 mM DTPA) a 25 °C, registrados en un espectrofotómetro de flujo detenido, con $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$ y emisión total. Los registros

experimentales se muestran con una línea continua. En línea discontinua se muestra la simulación cinética asistida por computadora de la oxidación de FI-B por peroxinitrito bajo las mismas condiciones de reacción y considerando las reacciones presentadas en la Tabla 10.

2.5 Reactividad de FI-B con el radical catiónico derivado de H₂O₂/HRP (Compuesto I)

Si bien los compuestos derivados de boronatos reaccionan preferentemente a través de procesos de oxidación de dos electrones por ataque nucleofílico, estudiamos si la sonda era capaz de reaccionar con radicales derivados de H₂O₂/hemo-peroxidasas (Compuesto I). Utilizamos como modelo la HRP (peroxidasa de rábano) que se oxida por una molécula de H₂O₂ formando un intermedio llamado Compuesto I. El Compuesto I se caracteriza por tener un grupo oxoferrilo (Fe^{IV}=O) y un radical catiónico centrado en la porfirina.

Como se muestra en la Figura 30, la formación del Compuesto I no tuvo efecto sobre la reactividad de la sonda ya que FI-B no reacciona con estos sistemas.

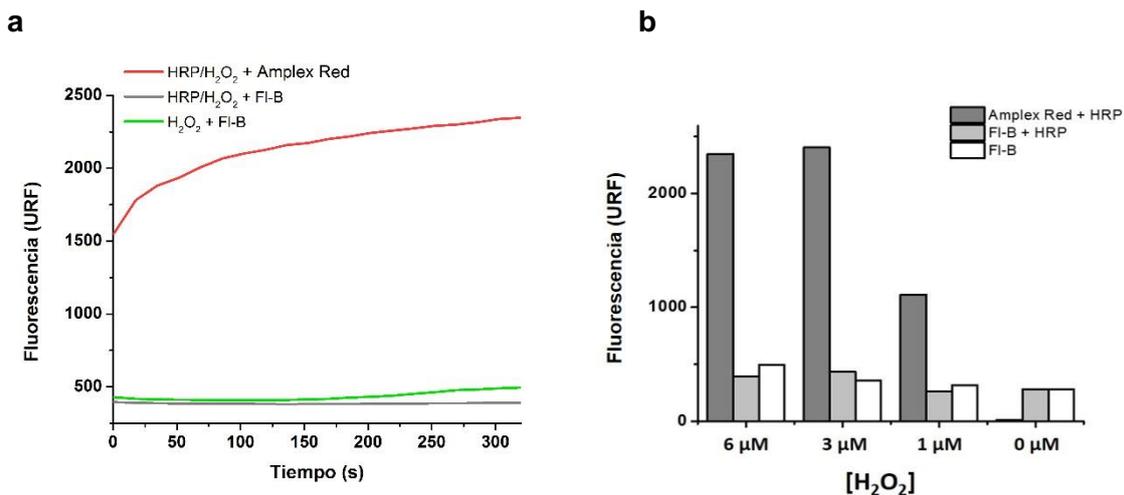


Figura 30. Evaluación de la reactividad de FI-B frente a oxidantes derivados de H₂O₂ en sistemas catalizados por hemo-peroxidasas (Compuesto I). a. Curso temporal de la peroxidasa de rábano (HRP, 10 $\mu\text{g/mL}$) reaccionando con H₂O₂ (6 μM) para formar el compuesto radicalar enzimático I. Se usó Amplex Red® (20 μM) como control para detectar la actividad de peroxidasa que produce el producto fluorescente resorfurina ($\lambda_{\text{ex}} = 563 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 587 \text{ nm}$) dando una señal fluorescente intensa. FI-B (20 μM) en presencia de HRP (10 $\mu\text{g} / \text{mL}$) y H₂O₂ (6 μM) tiene una

débil emisión de fluorescencia, ya que no hay reacción de FI-B con el Compuesto I. Mientras que en ausencia de HRP se observó una señal fluorescente más alta producto de la reacción de FI-B con H₂O₂. (b) Se muestran valores de intensidad de fluorescencia para la reacción de FI-B (20 μ M) en presencia de HRP (10 μ g/mL) y diferentes concentraciones de H₂O₂ (0 – 6 μ M) a los 5 minutos de incubación. Las determinaciones se llevaron a cabo en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) a 37°C, en un lector de placas de fluorescencia en Varioskan, medidas simultáneas a : $\lambda_{\text{ex}} = 563$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 587$ nm para la detección de resorufina, y $\lambda_{\text{ex}} = 492$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 515$ nm para la detección de fluoresceína.

3. Detección de peroxinitrito endógeno en diferentes modelos celulares

3.1 Ensayo de Citotoxicidad

Antes de evaluar la utilidad de FI-B en la detección de peroxinitrito en sistemas celulares, se realizaron ensayos de citotoxicidad (Figura 31) en dos líneas celulares (células BAECs y células Vero). Como muestra la Figura 31, la incubación de las células durante 24h, incluso a altas concentraciones de la sonda (1 mM) no afectó a la viabilidad celular, determinado por el método de viabilidad celular por exclusión del colorante azul de Tripano y análisis de morfología celular, demostrando la no toxicidad de la sonda FI-B.

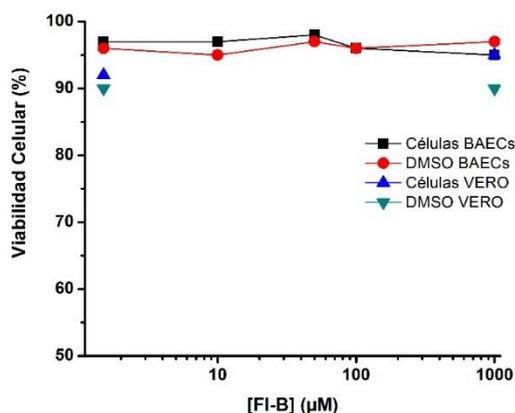


Figura 31. Estudios de Citotoxicidad de FI-B dos modelos celulares (células endoteliales aórticas bovinas, BAECs y células VERO). Las monocapas de células BAECs confluentes y células Vero se incubaron con concentraciones crecientes de FI-B (1 a 1000 μ M) durante 24 h a 37°C en atmósfera conteniendo 5% CO₂. La viabilidad celular se estudió mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano en un contador de células automatizado (Invitrogen Countess™ Automated Cell Counter). Las incubaciones de células control se realizaron con DMSO (5% v/v). ■ BAECs; ● BAECs Control; ▲ VERO; ▼ VERO Control.

Dada la naturaleza no tóxica de FI-B a continuación, se estudió la capacidad de la sonda para detectar peroxinitrito generado endógenamente. Se estudiaron dos modelos celulares pre validados de generación de peroxinitrito endógeno, en células endoteliales normales y disfuncionales (166), y en un modelo de infección de macrófagos por un patógeno intracelular (56), secciones 3.2 a 3.5.

3.2 Detección de peroxinitrito endógeno en células endoteliales presencia de CO₂

En primer lugar, se evaluó la capacidad de FI-B (50 μ M) en la detección de peroxinitrito en células endoteliales normales en presencia y en ausencia de CO₂, un competidor de este oxidante en el medio celular. Las células BAECs se estimularon para la producción de •NO desencadenando la actividad de eNOS (óxido nítrico sintasa epitelial) con el ionóforo de calcio ionomicina. Los datos muestran que la ionomicina provoca un aumento de la intensidad de fluorescencia respecto a la oxidación FI-B a las condiciones

control. La intensidad de fluorescencia se reduce en gran medida en presencia del inhibidor de la eNOS L-NAME (éster metílico de *N*-nitro-*L*-arginina), indicando que el oxidante producido en estas condiciones es un derivado de $\cdot\text{NO}$ como peroxinitrito (Figura 32). En presencia de CO_2 , la fluorescencia obtenida tras la activación de la eNOS disminuyó un 50%, sin embargo, se continúa observando una buena señal. Estos datos están de acuerdo con los datos mostrados en las Figuras 28 y 29.

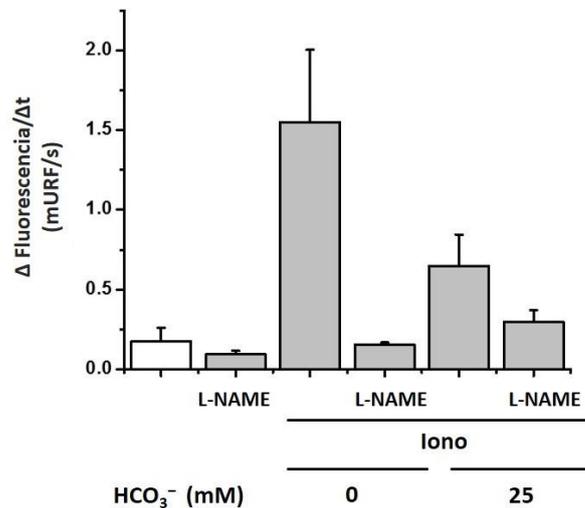


Figura 32. Oxidación de FI-B en BAECs en presencia de CO_2 . Monocapas de células BAECs confluentes fueron preincubadas con FI-B ($50 \mu\text{M}$) durante 30 min. Se utilizó ionomicina ($4 \mu\text{M}$) para desencadenar la actividad de eNOS en presencia o ausencia del inhibidor de NOS L-NAME (10 mM), en dPBS o dPBS suplementado con bicarbonato 25 mM . Las pendientes se calcularon a partir del curso temporal de la oxidación de FI-B en las diferentes condiciones celulares medidas en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan) ($\lambda_{\text{ex/em}} = 492/515 \text{ nm}$). Los datos mostrados son las medias \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

3.3 Detección de peroxinitrito endógeno en células en endoteliales disfuncionales

A continuación, se evaluó capacidad en la detección de la producción de peroxinitrito endógeno en células BAECs disfuncionales, luego del tratamiento de estas células con SIN-1 (dador de peroxinitrito) durante la toda la noche. Este tratamiento provoca un aumento intracelular de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por disfunción mitocondrial y desacoplamiento de la eNOS conduciendo a la inducción de la muerte celular programada (166). Dado que la vida media de SIN-1 ($200 \mu\text{M}$) se estima en nuestras condiciones experimentales en ~ 15 min, una exposición durante toda la noche asegura que el peroxinitrito derivado de SIN-1 se ha acabado varias horas antes de que se iniciaran los experimentos con FI-B. El flujo de peroxinitrito detectado luego de la estimulación de la eNOS (con ionomicina), fue tres veces más alto en células BAECs disfuncionales respecto a las células control (Figura 33).

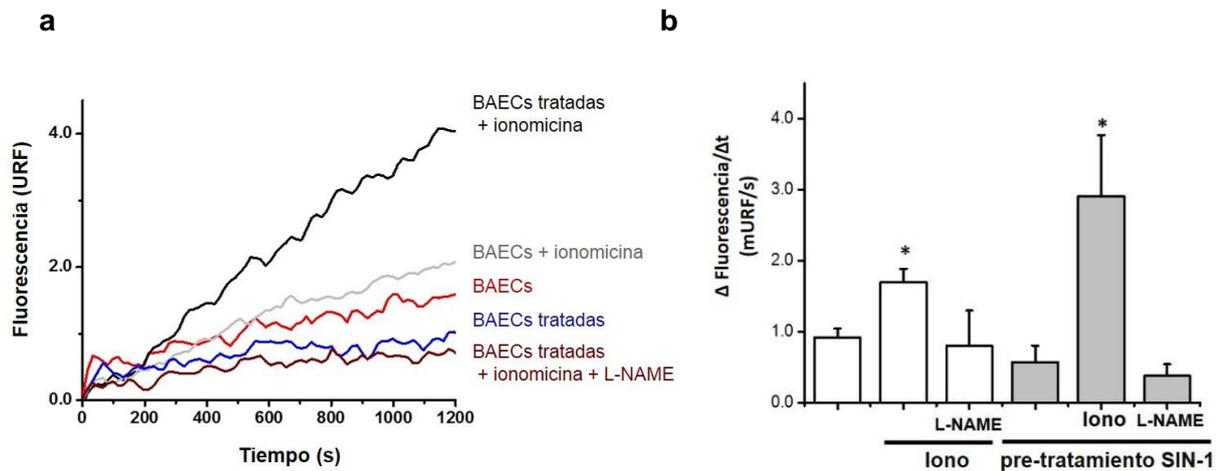


Figura 33. Detección de peroxinitrito producido endógenamente por células BAECs. (a) Curso temporal de la oxidación FI-B (50 μ M) en diferentes condiciones celulares. La formación de fluoresceína fue registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan) ($\lambda_{ex/em}$ = 492/515 nm) a 37°C. Las condiciones fueron: BAECs, células control; BAECs Tratadas, células pre-tratadas con SIN-1 (200 μ M, \sim 7 μ M peroxinitrito/min); Iono, ionomicina (4 μ M) agregada en el momento de la medición; L-NAME (10 mM) 1 hora antes de la medición. (b) Promedio obtenido a partir de las pendientes del panel (a). BAECs control (barras blancas), BAECs pre-tratadas con SIN-1 (barras grises). Los datos son medias \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * $P < 0.01$ indica la diferencia estadística en comparación con BAECs control (células no tratadas previamente) por el test de ANOVA, prueba de Tukey.

Paralelamente, se realizó el mismo experimento, en las mismas condiciones utilizando CBA como sonda fluorescente (pre incubación de CBA 50 μ M por 30 min). Como se muestra en la Figura 34, CBA no fue capaz de detectar la generación fisiológica de peroxinitrito. Esto demuestra la gran sensibilidad del fluoróforo fluoresceína respecto a 7-hidroxycumarina.

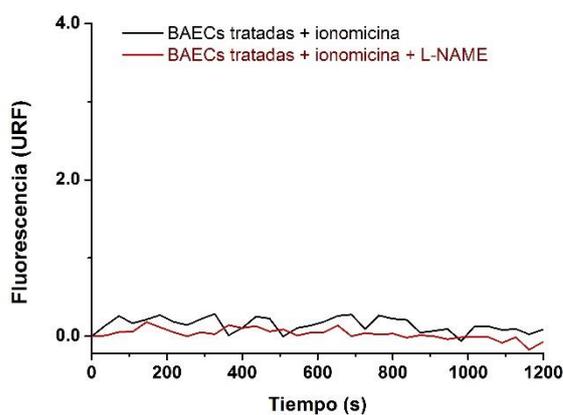


Figura 34. Curso temporal de la oxidación de CBA (50 μ M) en diferentes condiciones celulares. La formación de 7-hidroxycumarina (COH) fue registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan) (λ_{ex} = 332, λ_{em} = 470 nm) a 37°C. BAECs Tratadas: células pre-tratadas con SIN-1 (200 μ M, \sim 7 μ M peroxinitrito/min) con agregado de ionomicina (4 μ M) en el momento de la medición; L-NAME (10 mM) 1 hora antes de la medición. CBA no fue capaz de detectar la producción del oxidante.

Los datos obtenidos, mostrados en las Figuras 32 y 33, permiten estimar el flujo de producción de peroxinitrito intracelular en células BAECs normales (tras la estimulación de la eNOS), basado en la velocidad de oxidación de FI-B, como se describe en la sección 3.6.

3.4 Detección del flujo de peroxinitrito intramitocondrial en células endoteliales

Por otra parte, además provocamos la inducción intramitocondrial sitio específica de la generación del radical $O_2^{\bullet-}$, utilizando antimicina AA, un inhibidor del Complejo III de la cadena respiratoria (167), en presencia o ausencia del dador de $\bullet NO$ (NOC-18, 1 mM) (Figura 35). El $\bullet NO$ promueve la formación de peroxinitrito en el sitio de generación del $O_2^{\bullet-}$ (mitocondrias). Como se observa en la Figura 35, la máxima señal de fluorescencia se obtuvo cuando las células BAECs fueron expuestas a la combinación de NOC-18 y AA. En la condición con solo NOC-18, se puede observar una pequeña señal de fluorescencia. Esto es debido a la inhibición mediada por $\bullet NO$ de la citocromo c oxidasa (168, 169) generando $O_2^{\bullet-}$ intramitocondrial y por lo tanto peroxinitrito.

Se realizó una microscopía de fluorescencia para confirmar que el sitio de oxidación de FI-B sea el compartimento mitocondrial de las células BAECs tratadas. Mientras que la fluorescencia celular observada en presencia de SIN-1 (dador de peroxinitrito en todos los compartimentos celulares) dio un patrón difuso (Figura 35 c, imagen D), la presencia de AA y $\bullet NO$ dio un patrón punteado y una oxidación discreta de FI-B compatible con peroxinitrito intramitocondrial (Figura 35 c, imagen C).

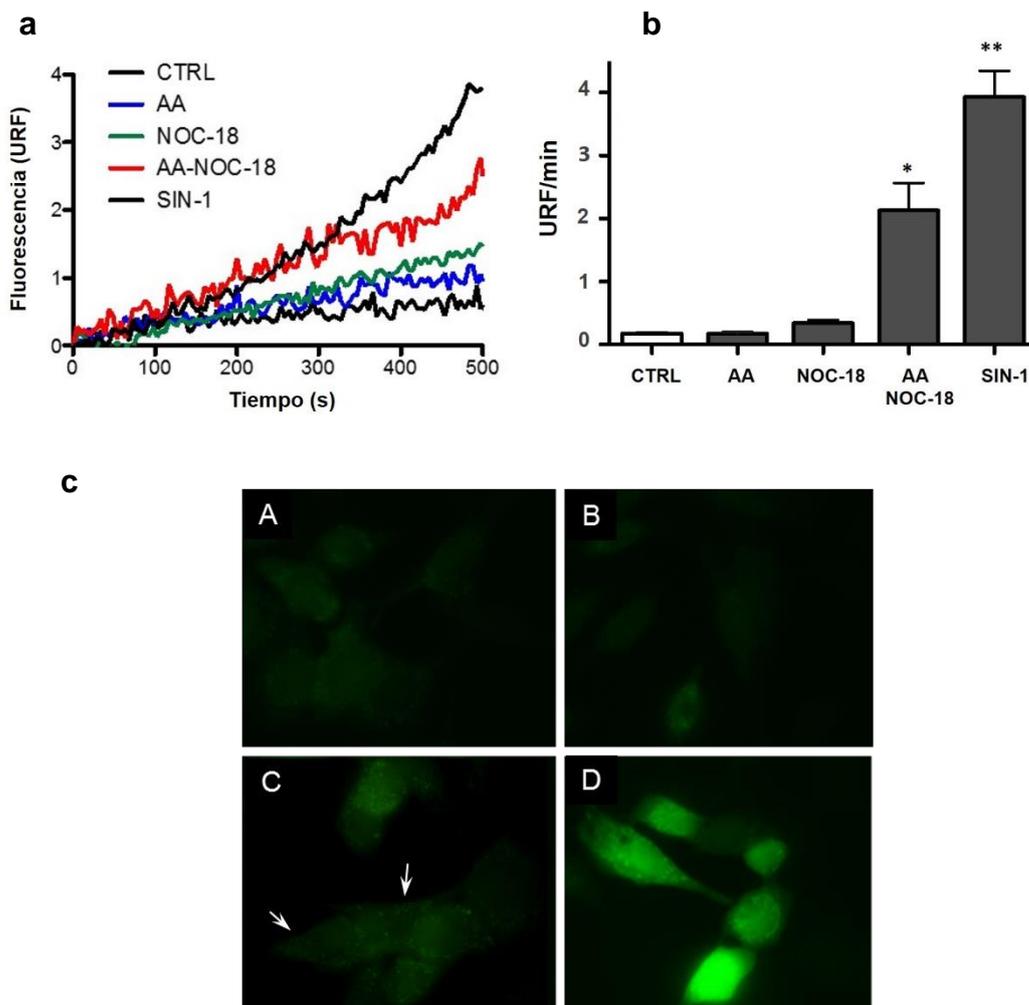


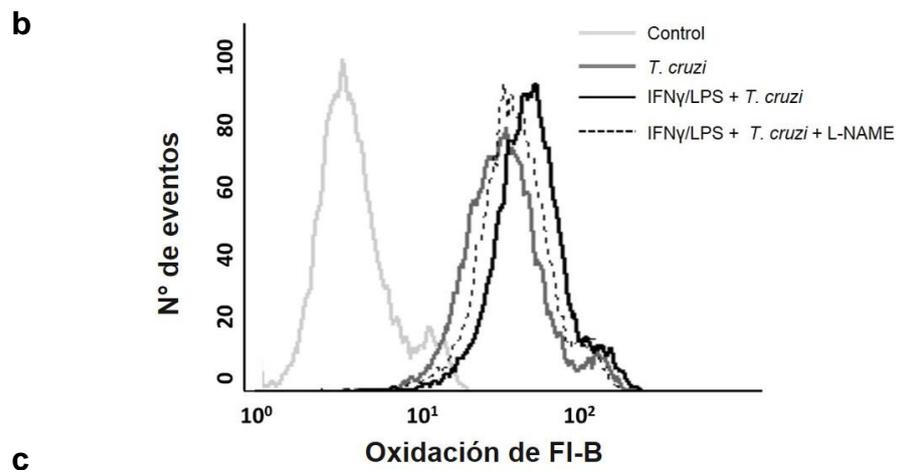
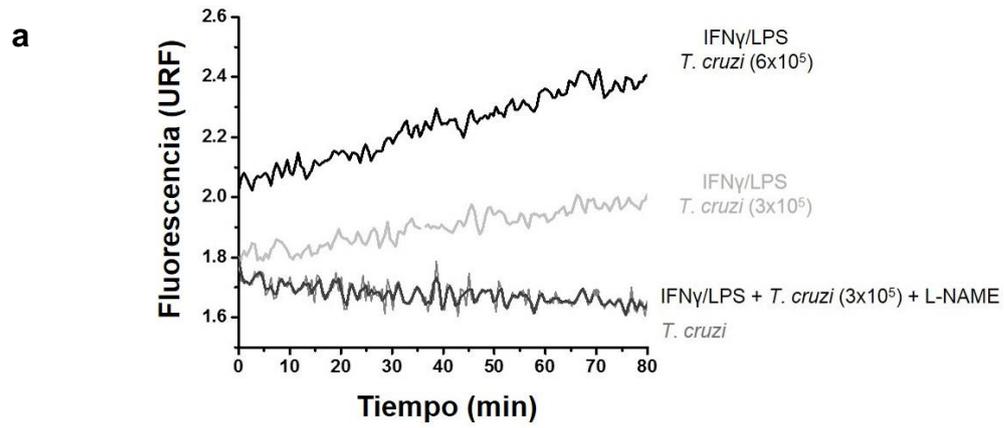
Figura 35. Generación de peroxinitrito intramitocondrial en células BAECs. (a) Curso temporal de la oxidación de FI-B en las diferentes condiciones celulares. Monocapas de células BAECs confluentes se pre incubaron con FI-B (50 μM) en dPBS y estimulan para producir peroxinitrito

intramitocondrial mediante tratamiento con AA (4 μM) en presencia o ausencia de NOC-18 (1 mM, produciendo 0.15 $\mu\text{M} \cdot \text{NO} \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} \sim 1080 \text{ min}$). SIN-1 (20 μM ; 0.7 $\mu\text{M} \text{ peroxinitrito} \text{ min}^{-1}$) se utilizó como control positivo para generación de peroxinitrito. Las medidas se registraron en un lector de placas fluorescentes (Varioskan) ($\lambda_{\text{ex/em}} = 492/515 \text{ nm}$). (b) Las pendientes se calcularon a partir de los datos primarios. Los datos son las medias \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Indica diferencia estadística con respecto al control, condición AA y NOC-18, y ** indica diferencia estadística con respecto a AA + Condición NOC-18 ($P < 0.01$) por el test de ANOVA, prueba de Tukey. (c) BAECs fueron tratados como en el panel (a) y la oxidación de FI-B visualizada por microscopía de fluorescencia. (A) BAECs Control; (B) células tratadas con AA (4 μM); (C) células tratadas con AA (4 μM) y NOC-18 (1 mM); (D) SIN-1 (20 μM ; 0.7 $\mu\text{M} \text{ min}^{-1}$ de peroxinitrito a 37°C). Las flechas en (C) indican la oxidación de FI-B en las mitocondrias de las células.

3.5 Oxidación de FI-B dentro de *T. cruzi* internalizado en fagosomas de macrófagos

En un segundo modelo, nos planteamos como objetivo detectar el peroxinitrito producido endógenamente por macrófagos infectados con el patógeno intracelular *Trypanosoma cruzi*, el agente causante de la enfermedad de Chagas (170). Los macrófagos fueron inmunoestimulados para la inducción de la iNOS y posteriormente infectados con tripomastigotas de *T. cruzi* (forma infectiva). La internalización de los tripomastigotas por los macrófagos provoca la activación de la NADPH oxidasa unida a membrana con la consiguiente generación de grandes cantidades de $\text{O}_2^{\bullet-}$ hacia el parásito internalizado en el fagosoma (56). Los tripomastigotas de *T. cruzi* (3 o 6 $\times 10^5$ células mL^{-1}) fueron precargados con FI-B (100 μM) durante 30 min a 37°C. Monocapas de macrófagos confluentes (sin estimulación o inmunoestimulados para la producción de $\bullet\text{NO}$ con IFN- γ /LPS) fueron infectados con los parásitos precargados con FI-B, y posteriormente analizamos la oxidación de FI-B por espectroscopía de fluorescencia, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia (Figura 36). En la Figura 36 se puede observar que la oxidación FI-B es dependiente del número de parásitos, y fue máxima en los macrófagos inmunoestimulados donde se genera peroxinitrito (Figura 36, panel a). La señal fue disminuída completamente por el inhibidor de la NOS L-NAME (10 mM), indicando la generación intrafagosomal de peroxinitrito. En ausencia de $\bullet\text{NO}$, donde sólo se estaría produciendo $\text{O}_2^{\bullet-}$ y por lo tanto H_2O_2 , no se observó señal, lo que está de acuerdo con la baja constante de velocidad de FI-B y H_2O_2 (Tabla 9). Este resultado también se confirmó por análisis de citometría de flujo de los macrófagos infectados (Figura 36, panel b) y por microscopía de epifluorescencia (Figura 36, panel c). En esta última técnica, se observó la distribución discreta de fluoresceína, siendo estrictamente localizada en el sitio de internalización del parásito (fagosoma) y no en otros compartimentos celulares del macrófagos (Figura 36, panel c).

Los datos obtenidos sobre la oxidación intrafagosomal de FI-B, permiten estimar el flujo de peroxinitrito intrafagosomal como se describe en la sección 3.6.



DAPI

FI-B

MERGE

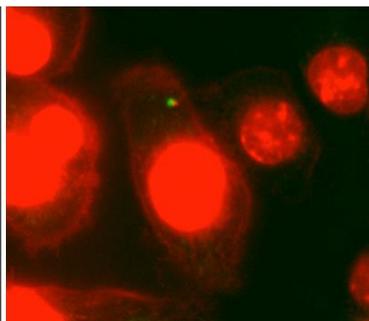
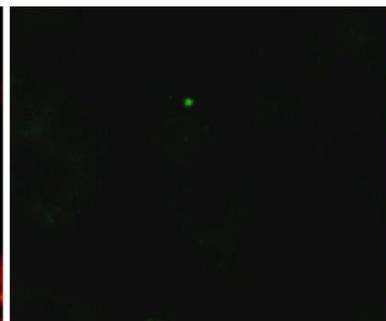
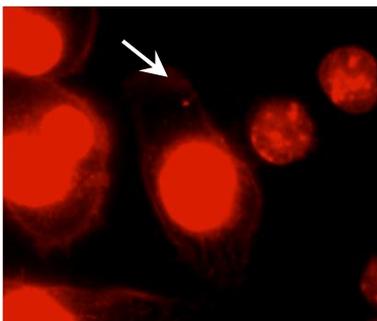
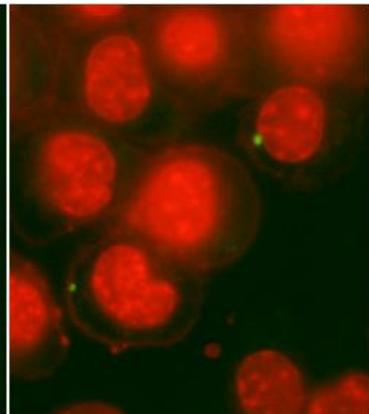
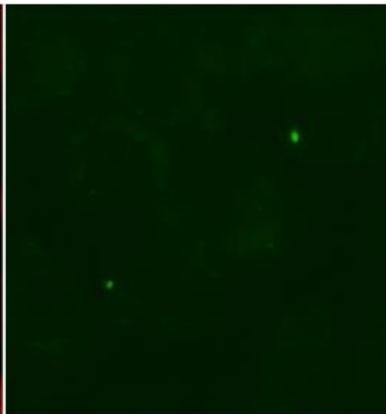
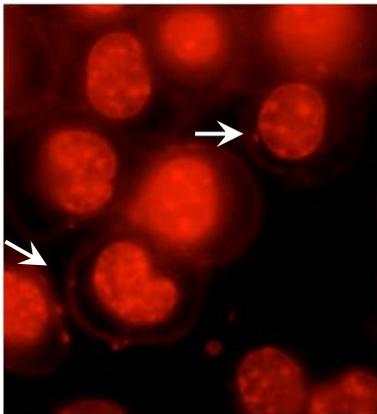


Figura 36. Oxidación de FI-B en el interior de *T. cruzi* internalizados en fagosomas de macrófagos. (a) Tripomasmigotas de *T. cruzi* (3 o 6×10^5 células/mL) pre cargados con FI-B ($100 \mu\text{M}$, 30 min en dPBS a 37°C) se utilizaron para infectar macrófagos no estimulados y estimulados para la inducción de iNOS (IFN- γ , 400 U mL^{-1} y LPS, 8 g/mL durante 5 h) en ausencia o presencia del inhibidor de iNOS (L-NAME, 10 mM). Después de 1 h de infección, los parásitos no incorporados fueron eliminados y la oxidación de FI-B se registró en un lector de placas ($\lambda_{\text{ex/em}} = 492/515 \text{ nm}$). (b) Análisis por citometría de flujo de macrófagos infectados. Histograma obtenido siguiendo la fluorescencia con el canal verde HL-1. Control: macrófagos no infectados (histograma gris); macrófagos infectados con *T. cruzi* precargado con FI-B (histograma gris oscuro); macrófagos estimulados por citoquinas (IFN-LPS) infectados con *T. cruzi* precargado con FI-B (histograma negro); macrófagos estimulados con citoquinas e infectados con *T. cruzi* precargados con FI-B en presencia de L-NAME (10 mM) (histograma línea punteada). (c) Oxidación de FI-B detectada por microscopía de fluorescencia en los macrófagos estimulados (IFN γ /LPS) e infectados por *T. cruzi* pre cargados con FI-B. DAPI (tinción de ADN, rojo). Las flechas indican la presencia de ADN del parásito (DAPI), fluoresceína y la combinación de imágenes (Merge) de fluoresceína co-localizando con el ADN del parásito. Se muestran dos conjuntos de experimentos.

En paralelo, también se realizó el mismo experimento utilizando CBA (preincubación de los parásitos $6 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, con $100 \mu\text{M}$ CBA por 30 min a 37°C , (Figura 37). En estas condiciones no se detectó señal fluorescente por la 7-hidroxycumarina en un lector de placas de fluorescencia. Nuevamente mostrando el menor límite de detección del fluoróforo fluoresceína con respecto a la cumarina. Además, debido a la λ_{exc} del CBA no es posible analizar el experimento por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.

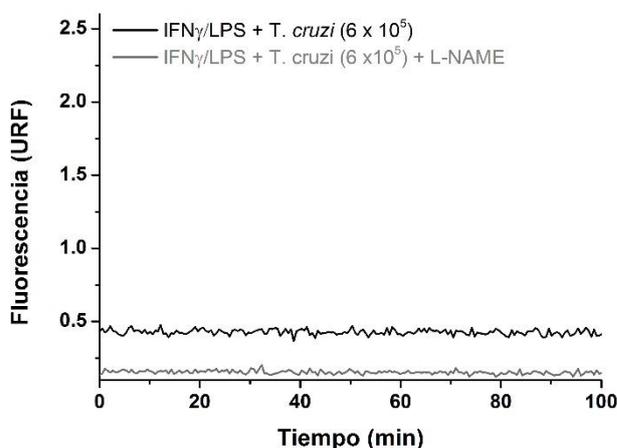


Figura 37. Oxidación de CBA en el interior de *T. cruzi* internalizados en fagosomas de macrófagos. (a) Tripomasmigotas de *T. cruzi* (6×10^5 células/mL) pre cargados con CBA ($100 \mu\text{M}$, 30 min en dPBS a 37°C) se utilizaron para infectar macrófagos estimulados para la inducción de iNOS (IFN- γ , 400 U mL^{-1} y LPS, 8 g/mL durante 5 h) en ausencia o presencia del inhibidor de iNOS (L-NAME, 10 mM). Después de 1 h de infección, los parásitos no incorporados fueron

eliminados y la oxidación de CBA se registró en un lector de placas ($\lambda_{\text{ex/em}} = 332/470 \text{ nm}$). CBA no fue capaz de detectar la producción del oxidante.

3.6 Cuantificación del flujo de producción de peroxinitrito en los modelos celulares

El flujo de peroxinitrito intracelular se calculó a partir de los datos obtenidos en las Figuras 32 y 33, ajustando las unidades obtenemos el valor de la oxidación de FI-B en el tiempo como (URF/s). De la curva de calibración (Figura 22 URF vs. $[\text{ONOO}^-](\mu\text{M})$), obtenemos la pendiente de la gráfica de $137 \text{ URF}/\mu\text{M}$.

$$\frac{\text{pendiente (URF/s)}}{\text{pendiente (URF/}\mu\text{M)}} = \mu\text{M (ONOO}^-)/\text{s} \quad \text{Ecuación 16}$$

A partir de la Ecuación 16 y conociendo el volumen en el pocillo de la placa ($V = 0.5$ mL), podemos calcular los $\mu\text{moles ONOO}^-/\text{s}$, medidos en el total del volumen del pocillo.

Asumiendo el volumen de una célula de $1232 \mu\text{m}^3$ (1.12×10^{-12} L) (171) y teniendo en cuenta el número total de células en cada pocillo (5×10^5 BAECs/pocillo), podemos calcular el volumen de la monocapa de células BAECs.

La fracción de flujo de peroxinitrito intracelular detectable como oxidación de FI-B dentro de las células, se calculó como moles de peroxinitrito/volumen celular total, Ecuación 17:

$$\frac{\mu\text{moles ONOO}^-/\text{s}}{\text{Vol.de la monocapa}} = 0.01 \mu\text{M/s de peroxinitrito} \quad \text{Ec. 17}$$

Por lo tanto, a partir de la oxidación de FI-B se calculó $0.01 \mu\text{M/s}$ de peroxinitrito en BACEs (tras activación de la eNOS), como la fracción de peroxinitrito que podemos detectar.

Luego, el flujo de peroxinitrito intracelular *real* se calculó teniendo en cuenta todas las demás reacciones dianas intracelulares de peroxinitrito (76, 172), esto es :

Se define $k_T[\text{T}]$ como la velocidad de reacción del peroxinitrito con todos los blancos celulares (T, del inglés Targets). La concentración de peroxinitrito en estado estacionario va a depender de la velocidad de su formación ($k_f[\bullet\text{NO}][\text{O}_2^{\bullet-}]$), y la velocidad de descomposición dada por su homólisis ($k_H = 0.9 \text{ s}^{-1}$) y k_T la reacción contra todos los blancos, (Ecuación 18), por lo tanto:

$$[\text{ONOO}^-]_{\text{ss}} = \frac{k_f[\bullet\text{NO}][\text{O}_2^{\bullet-}]}{(k_H + k_T[\text{T}])} \quad \text{Ecuación 18}$$

Las k_T varían de $\sim 300 - 500 \text{ s}^{-1}$, dependiendo de los diferentes sistemas celulares (76, 172). Por lo tanto, siendo $k_T \gg k_H$, se puede despreciar k_H de la ecuación quedando como la Ecuación 19:

$$[\text{ONOO}^-]_{\text{ss}} = \frac{k_f[\bullet\text{NO}][\text{O}_2^{\bullet-}]}{(k_T[\text{T}])} \quad \text{Ecuación 19}$$

En nuestro sistema utilizamos $50 \mu\text{M}$ de FI-B otro blanco para ONOO^- , con una k de velocidad de $\sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Entonces la k_T para FI-B sería: $k[\text{FI-B}] = (1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}) \times (50 \times 10^{-6} \text{ M}) = 50 \text{ s}^{-1}$ (asumiendo que efectivamente haya $50 \mu\text{M}$ de FI-B dentro de la célula).

Si el total de reacciones que consumen peroxinitrito en las células endoteliales está en el orden de $\sim 300 \text{ s}^{-1}$, entonces si lo que aporta la FI-B $\sim 50 \text{ s}^{-1}$, entonces en presencia

de FI-B, la $k_T = 300 \text{ s}^{-1} + 50 \text{ s}^{-1} = 350 \text{ s}^{-1}$. Por lo tanto, en nuestro sistema el flujo detectable por la sonda es 1/7 del total, $350 \text{ s}^{-1}/50 \text{ s}^{-1} = 7$.

Entonces el flujo intracelular *real* de peroxinitrito en BAEC normales después de la activación de eNOS es $\sim 0.1 \mu\text{M s}^{-1}$.

La formación de peroxinitrito intrafagosomal en un solo fagosoma se calculó suponiendo un volumen fagosomal similar a la de un tripomastigota (3 fL). El flujo de peroxinitrito intra-fagosomal se determinó a partir de los datos de la oxidación FI-B y se calculó según la Ecuación 20:

$$\mu\text{M (ONOO}^-)_{\text{intrafagosomal/s}} = \frac{\text{moles de ONOO}^-}{V_{\text{total del fagosoma}}} \quad \text{Ecuación 20}$$

Conclusiones parciales

En esta sección se describió a la fluoresceína-boronato (FI-B), desde su síntesis, caracterización hasta su aplicación en diferentes modelos celulares como sonda para la detección de peroxinitrito. La FI-B donde el éster pinacol borónico está unido covalentemente a fluoresceína, fue reportado por Chang *et al* (115), como una sonda para detectar H_2O_2 . Sin embargo, varios trabajos en la literatura han demostrado la gran reactividad de peroxinitrito con compuestos derivados de ácidos o ésteres borónicos (27, 109, 110), incluidos los derivados de fluoresceína, que los hacen sondas prometedoras para la detección de peroxinitrito en sistemas biológicos.

La validación exhaustiva como sonda para la directa detección de peroxinitrito en sistemas biológicos, demuestra las ventajas de su uso para la detección y también cuantificación de este oxidante.

FI-B fue sintetizada en dos pasos de reacción con buen rendimiento global ($\sim 42\%$) y alta pureza ($>99\%$) (Esquema 26 y Figura 19). Debido al centro electrofílico de los ésteres borónicos, el ataque nucleofílico por peroxinitrito en su forma aniónica (ONOO^-) es una reacción irreversible y muy rápida, que produce el correspondiente compuesto hidroxilado fluoresceína con $>99\%$ de rendimiento (Figura 23). El rendimiento de la reacción de FI-B con peroxinitrito dando fluoresceína fue mayor que el rendimiento descrito anteriormente para otras sondas derivadas de boronatos (27, 110), reportado en el orden de $\sim 80\text{-}90\%$ (173). Por lo tanto, para la reacción con FI-B, se espera que los productos secundarios que incluyen productos nitrados y especies diméricas (173) sea inferior al 1%.

El análisis por espectroscopia de fluorescencia mostró que hay un aumento lineal de la intensidad de fluorescencia con adiciones sucesivas de peroxinitrito (Figuras 21 y 22). Además, determinamos la constante de velocidad de la reacción de FI-B hacia H_2O_2 , HOCl y peroxinitrito, siendo la constante de la reacción de FI-B con peroxinitrito varios órdenes de magnitud mayor que para H_2O_2 o HOCl (Tabla 9, Figuras 24 y 25). Estos valores están en el mismo orden de magnitud que para la mayoría de otros boronatos reportados (27, 110), lo que indica que los ácidos borónicos y/o ésteres borónicos son grupos funcionales que reaccionarán preferentemente con ONOO^- debido a su perfil cinético más favorable sobre otros nucleófilos relevantes en medios biológicos.

La oxidación del boronato al fenol correspondiente se produce a través de un ataque nucleofílico del oxidante en su forma aniónica, sin formación de estructuras radicalares intermedias de la sonda. Esto genera una ventaja para su utilización ya que a diferencia de lo que ocurre con otras sondas redox comúnmente utilizadas, donde el exceso de estos radicales reacciona con productos intermedios apagando la señal fluorescente (174, 175), el exceso de radicales como $\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$ no afecte la reacción de FI-B con peroxinitrito.

FI-B compitió bien con CO_2 por ONOO^- , observándose una buena señal fluorescente incluso con niveles fisiológicos de CO_2 . La concordancia entre los datos experimentales y computacionales (Figura 29) con respecto a los efectos de CO_2 en los registros de cursos temporales de emisión de fluorescencia, apoyan un modelo de cinético de competencia de FI-B y CO_2 por el nucleófilo ONOO^- . Además, estos experimentos descartaron una contribución significativa de los radicales $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y/o $\bullet\text{NO}_2$ a la formación de fluoresceína a partir de FI-B.

Se evaluó la capacidad de FI-B para la detección directa de peroxinitrito producido endógenamente en diferentes modelos celulares. En primer lugar, la generación de peroxinitrito endógeno en células endoteliales normales, tras la activación de la eNOS inducida por ionomicina, donde la emisión de fluorescencia por la oxidación de FI-B fue completamente disminuída en presencia del inhibidor de la NOS L-NAME, indicando que el oxidante producido en estas condiciones es un derivado de $\bullet\text{NO}$, peroxinitrito. (Figuras 32).

En estas condiciones, la velocidad de oxidación de FI-B se determinó como $0.01 \mu\text{M s}^{-1}$ mostrando la gran capacidad de FI-B para la detección de oxidantes intracelulares, incluso en presencia de otras dianas celulares (T, targets o dianas; por ejemplo, CO_2 , peroxirredoxinas, proteínas que contienen hemo, entre otros (76)). Teniendo en cuenta la reactividad global de peroxinitrito, se define el término $k_T[\text{T}]$ como la velocidad de reacción del peroxinitrito con todos los blancos celulares, y se estima entre $300\text{--}500 \text{ s}^{-1}$ (172).

Para determinar la fracción de peroxinitrito detectado por FI-B en nuestro sistema celular, calculamos $k_{\text{FI-B}}[\text{FI-B}]$ para la reacción de peroxinitrito con FI-B ($50 \mu\text{M}$) como 50 s^{-1} , siendo una fracción del total peroxinitrito producido por la célula ($k_T[\text{T}] / k_{\text{FI-B}}[\text{FI-B}]$). Por lo tanto, el flujo real intracelular de peroxinitrito en células BAECs normales tras la activación de eNOS es $\sim 0.1 \mu\text{M s}^{-1}$. El valor calculado está de acuerdo con cálculos teóricos previos (172).

La detección de peroxinitrito aumentó en gran medida en células endoteliales disfuncionales, susceptibles a un aumento de la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por desacople de la eNOS y fuga de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Figura 33) (166). FI-B también fue capaz de detectar el sitio la generación de peroxinitrito intramitocondrial en células endoteliales tratadas con AA en presencia de flujos exógenos de $\bullet\text{NO}$ y/o peroxinitrito (Figura 35).

Finalmente, FI-B también se evaluó en un modelo de infección *in vitro*, en macrófagos infectados con el parásito *Trypanosoma cruzi*, el agente responsable de la enfermedad de Chagas. Usando tripomastigotas de *T. cruzi* pre cargados con FI-B, evaluamos la generación de peroxinitrito hacia el fagosoma de macrófagos donde el parásito ha sido internalizado. FI-B fue extremadamente sensible en la detección de peroxinitrito en este

compartimento de macrófagos, medido por diferentes técnicas convencionales como citometría de flujo, lector de placa de fluorescencia y microscopía epifluorescencia (Figura 36). El hecho de que la emisión de fluorescencia en los macrófagos inmunoestimulados fue totalmente anulada en presencia del inhibidor de iNOS, afirma que la especie que se está detectando es un oxidante derivado de $\bullet\text{NO}$, como el peroxinitrito, y descarta cualquier contribución de otras especies reactivas como H_2O_2 o HOCl. Además, el rol del HOCl en los procesos oxidativos en macrófagos J774-1 fue descartado en reportes previos debido a que MPO (mieloperoxidasa) no está presente en niveles significativos en este tipo celular (56).

FI-B también nos permitió estimar la tasa de producción de peroxinitrito intrafagosomal. Actualmente no hay datos disponibles del valor de $k_f[\text{T}]$ para peroxinitrito en tripomastigotas de *T. cruzi*, por lo que realizamos una aproximación utilizando un valor moderado de 500 s^{-1} (172). Con esta suposición, y considerando una tasa de oxidación de FI-B de $\sim 0.25 \mu\text{M s}^{-1}$, la tasa de formación de peroxinitrito el fagosoma se puede estimar como $1.0 \mu\text{M s}^{-1}$ (durante los 90 minutos del estallido respiratorio (55)). Este valor está de acuerdo con el valor informado previamente de $\sim 50 - 100 \mu\text{M min}^{-1}$ (equivalente a $0.8 - 1.66 \mu\text{M s}^{-1}$) (176) usando la sonda DCFH₂, en macrófagos con estimulación no fisiológica LPS/IFN- γ y PMA.

Poder contar con la sonda FI-B como herramienta de detección de peroxinitrito, es una gran ventaja y es utilizada por otros integrantes de nuestro grupo con excelentes resultados, permitiéndoles avanzar en sus investigaciones y aportando al desarrollo de otras tesis. Además, permitió la colaboración con diferentes grupos de investigación nacionales, de la región e internacionales.

Esta herramienta contribuye al entendimiento de los mecanismos moleculares y celulares en el desarrollo de patologías relacionadas con el estrés nitrooxidativo generando un gran avance para el área redox.

Este trabajo dió origen a una publicación como primer autor en una revista arbitrada y permitió la colaboración con investigadores nacionales e internacionales contribuyendo en diversos trabajos científicos, como se detalla en el apartado Publicaciones y Colaboraciones.

Materiales y Métodos

1. Síntesis y caracterización espectroscópica de Fluoresceína-boronato (FI-B)

Reactivos

Todos los productos químicos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y utilizados sin purificación posterior. Las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera inerte de argón (Ar (g)), y se utilizaron disolventes secos.

El grado de avance de las reacciones se monitorea por cromatografía en capa fina (TLC) en placas sílica gel TLC-PET (Fluka). Visualización con luz UV ($\lambda = 254$ nm). La cromatografía de columna (CC) se realizó en sílica flash (60 Å, 230–400 mesh, 40–63 μ m, Fluka) como fase estacionaria.

Los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los compuestos se realizan en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz). Como disolvente se utilizó CDCl_3 y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de partes por millón (ppm) en relación con el TMS y las multiplicidades según s: singulete, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete, br: señal ancha (del inglés *broad signal*). La completa caracterización es realizada con la combinación de experimentos bidimensionales COSY, HMQC o HSQC y HMBC.

Los espectros de masa por impacto electrónico se realizan en un equipo Shimadzu GC/MS QP 1100 EX a un potencial de ionización de 70 eV por inyección directa (ID).

Trifluorometansulfonato de 3'-hidroxi-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanten]-6'-ilo (25): (115)

En un balón bajo atmósfera de Ar (g) se agrega fluoresceína comercial (500 mg, 1.5 mmol), y *N*-fenil-bis(trifluorometansulfonimida) (537 mg, 1.5 mmol) y se protege de la luz. Se disuelve en 5 mL de DMF y se agrega di-isopropiletilamina (DIPEA, 1.0 mL, 6 mmol) recién destilada. Se deja agitando a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar (g) y protegido de la luz. Se monitorea la reacción por TLC. Luego de 72h se detiene la reacción. Se agrega HCl 1M (10 mL) para acidificar el medio y se hace un reparto con AcOEt hasta extracción total (5 x 10 mL). Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na_2SO_4 , se filtra y se destila a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad Hexano:AcOEt (9:1) hasta (7:3). Sólido amarillo claro, R = 56% (387 mg).

La caracterización espectroscópica y propiedades físicas coinciden con las de referencia.(115)

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6.64 (2H, br s), 6.81 (1H, d, $J = 4$ Hz), 6.89 (1H, d, $J = 8$ Hz), 6.95 (1H, dd, $J = 8$ y 4 Hz), 7.19 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7.25 (1H, d, $J = 4$ Hz), 7.67-7.73 (2H, m), 8.05 (1H, d, $J = 8$ Hz).

^{13}C NMR δ : 103.2, 110.0, 110.5, 113.3, 116.6, 117.1, 119.7, 120.3, 123.9, 125.3, 126.3, 128.9, 129.21 130.1, 130.2, 135.5, 150.0, 151.9, 152.1, 152.6, 158.9, 169.5.

MS (EI): m/z (%) = 464 (1.2), 420 (24.2), 331 (1.4), 287 (100), 259 (33.1).

3'-hidroxi-6'-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-ona (FI-B, Fluoresceína-boronato):

Se sintetizó como se describe anteriormente (115) con modificaciones. En un balón bajo atmósfera de Ar (g) se agrega **25** (387 mg, 0.83 mmol), *bis*(pinacolato)diboro (210 mg, 0.83 mmol), acetato de potasio (244 mg, 2.5 mmol) y 1,1'-*bis*(difenilfosfino)ferroceno-dicloropaladio(II)•CH₂Cl₂ (203 mg, 0.24 mmol) y se disuelve en 10 mL de dioxano. Se lleva la mezcla a reflujo en baño de aceite siempre bajo atmósfera inerte. La reacción se monitorea por TLC. Luego de 6 horas de calentamiento a reflujo se apaga el calentamiento y se deja agitando a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente se detiene la reacción. Se agrega AcOEt (10 mL) y se hace un reparto con solución saturada de NaCl (5 x 10 mL), la fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se destila a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad Hexano:AcOEt (8:2) hasta (6:4). Sólido amarillo, R = 75% (276 mg).

La caracterización espectroscópica y propiedades físicas coinciden con las de referencia (115).

¹H NMR δ: 1.37 (12H, s), 6.10 (1H, br s), 6.56 (1H, d, *J* = 8 Hz), 6.67 (1H, d, *J* = 8 Hz), 6.77 (1H, d, *J* = 4 Hz), 6.80 (1H, d, *J* = 8 Hz), 7.14 (1H, d, *J* = 8 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 8 Hz), 7.63-7.68 (2H, m), 7.74 (1H, s), 8.04 (1H, d, *J* = 4 Hz).

¹³C NMR δ: 84.3, 103.2, 103.3, 110.9, 112.3, 121.4, 123.5, 123.6, 123.8, 123.9, 125.1, 125.2, 126.3, 127.3, 129.3, 129.4, 129.8, 135.2, 150.7, 152.4, 153.5, 157.9, 170.0.

MS (EI): *m/z* (%) = 441 (3.5), 398 (100), 381 (26.7), 315 (25.4), 297 (65.7), 271 (48.5), 254 (30.4).

2. Preparación de soluciones de FI-B

Para todos los experimentos, se preparó una solución stock de FI-B disolviendo el compuesto sólido en dimetilsulfóxido (DMSO, 5 mM FI-B), excepto para las mediciones con HOCl. En las determinaciones con HOCl, FI-B se disolvió en ácido acético glacial debido a que el ClO⁻ es capaz de oxidar el grupo funcional sulfóxido del DMSO a la sulfona correspondiente (162, 163), y de esta manera enmascarar la reactividad de la sonda con el oxidante.

Las soluciones stock de FI-B en DMSO se almacenan a -20°C y se realiza una nueva dilución en solución acuosa cada vez antes de su uso. Hay que tener en cuenta que, si la solución stock se prepara directamente en medio acuoso, una pequeña fracción (0.5–1%) de FI-B podría hidrolizarse al almacenarla por un período prolongado.

3. Determinación del rendimiento de la reacción de FI-B con peroxinitrito

El rendimiento de la reacción de FI-B con peroxinitrito se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Agilent Technologies 1200) acoplado a detector de fluorescencia. Las muestras (2 µL) se separaron en una columna de Ascentis® Express fenil-hexil, 5 cm x 4.6 mm, 2.7 µm) (Supelco Analytical), equilibrada con acetonitrilo

(CH₃CN) al 40% (v/v) en solución acuosa, conteniendo 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético. Se realizó elución isocrática a un flujo de 1 mL/min con detección de fluorescencia (excitación a $\lambda = 492$ nm y emisión a $\lambda = 515$ nm) y por absorción UV-visible ($\lambda = 254$ nm). En estas condiciones, FI-B tiene un tiempo de retención de 1.5 min y FI de 1.8 min.

Se hace reaccionar FI-B (100 μ M) y diferentes concentraciones de peroxinitrito (7.5, 15, 20 μ M) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) y se comparan con FI (7.5, 15, 20 μ M) disuelta en FI-B (100 μ M). El rendimiento de la reacción se determinó como el promedio de la proporción de áreas ($\text{Area picO}_{\text{ONOO}^-} / \text{Area picO}_{\text{FI}}$) x 100 para cada concentración.

4. Análisis Cinético

Las determinaciones de las constantes cinéticas de FI-B con los diferentes oxidantes se llevaron a cabo bajo condiciones de *pseudo*-primer orden (exceso de 10 veces FI-B sobre peroxinitrito o HOCl). En el caso de H₂O₂, el oxidante se utilizó en un exceso de 200 veces. Para las determinaciones con HCO₄⁻, se preincubó H₂O₂ con NaHCO₃ y las concentraciones de HCO₄⁻ se calcularon según la Ecuación 15. Se realizó la técnica cinética de flujo detenido utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido Applied Photophysics 18MX equipado con fotomultiplicadores para mediciones de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 492$ nm; emisión total). Para las determinaciones cinéticas con H₂O₂, HCO₄⁻, HOCl se utilizó un lector de placas de fluorescencia (Varioskan, Thermo, $\lambda_{\text{ex}} = 492$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 515$ nm). Todas las determinaciones se realizaron en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4, conteniendo 0.1 mM de DTPA a 25°C o 37°C.

Los cursos temporales de aumento de fluorescencia debido a la formación de fluoresceína a partir de FI-B, para cada concentración de oxidante se ajustaron a curvas exponenciales simples, obteniendo una constante cinética observada k_{obs} . Las k_{obs} obtenidas de esta manera, se graficaron en función de la concentración de sonda ajustándose a una recta cuya pendiente es la k cinética de la reacción.

Cuando se estudió la cinética de la reacción de FI-B con peroxinitrito en presencia de CO₂, se siguió el curso temporal de la respuesta de fluorescencia tras la oxidación de FI-B (25 μ M) por peroxinitrito (1 μ M) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) conteniendo NaHCO₃ 25 mM (correspondiente a 1.2 mM CO₂) a 25 °C. Para las determinaciones cinéticas con H₂O₂ y HOCl se utilizó un lector de placas de fluorescencia (Varioskan, Thermo, $\lambda_{\text{ex}} = 492$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 515$ nm).

5. Modelado cinético de la competencia de peroxinitrito por FI-B o por CO₂

Se realizaron simulaciones cinéticas asistidas por computadora con el Software Gepasi (versión 3.3), utilizando las reacciones y constantes de velocidad reportados en la literatura y listados en la Tabla 10 (164, 165).

Tabla 10. Reacciones del modelo cinético de competencia de peroxinitrito entre FI-B y CO₂.

Reacción	<i>k</i>	Referencia
1) ONOOH → NO ₃ ⁻ + H ⁺	0.26 s ⁻¹	(177)
2) ONOOH → •NO ₂ + •OH	0.11 s ⁻¹	(177)
3) FI-B + ONOO ⁻ → FI + NO ₂ ⁻	1.07 x 10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹	(111)
4) ONOO ⁻ + CO ₂ → NO ₃ ⁻ + CO ₂	2.0 x 10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹	(82)
5) ONOO ⁻ + CO ₂ → CO ₃ ^{*-} + •NO ₂	1.0 x 10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹	(82)

6. Cultivos celulares

Las células endoteliales aórticas bovinas (BAECs) se obtuvieron de aortas bobinas frescas como se describió anteriormente (61). Los cultivos celulares de BAECs se mantienen en medio M199 suplementado con L-glutamina (2 mM), HEPES (10 mM), penicilina (100 unidades/mL), estreptomycin (100 µg/mL), SFB (10 % v/v) a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂.

Los parásitos *Trypanosoma cruzi* en el estadio tripomastigota se obtuvieron del sobrenadante de células Vero (ATCC CCL-81™) infectadas, como se describió anteriormente (178).

La línea celular de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC-TIB-67) se cultivó en medio DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) suplementado con L-glutamina (2 mM), penicilina (100 unidades/mL), estreptomycin (100 mg/L), SFB decomplementado (10 % v/v) a 37°C en atmósfera humidificada con 5 % CO₂.

6.1. Ensayo de citotoxicidad

La viabilidad celular se midió por el ensayo de exclusión del colorante azul de tripano después de 24 horas de exposición a FI-B y/o DMSO (5% v/v, condiciones control). Las monocapas de células confluentes BAECs y de células Vero se trataron con diferentes concentraciones de FI-B (1 a 1000 µM) por 24 h. Las células se lavaron en PBS, se levantaron por tripsinización y se estudió la viabilidad celular por el ensayo de exclusión de azul de tripano, utilizando un contador de células automatizado (Invitrogen Countess™).

7. Tratamiento de los cultivos celulares y determinación de la oxidación de FI-B

7.1 Detección de peroxinitrito endógeno en células BAECs

Las células BAECs se cultivaron en M199 suplementado con 0.4% (v/v) SFB por 24 h en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ a 37°C, previo al comienzo de las diferentes condiciones experimentales.

BAECs confluentes se incubaron con FI-B (50 µM) durante 30 minutos, se lavan para eliminar la sonda no incorporada, y posteriormente se reemplaza el medio con solución

salina de buffer fosfato (dPBS, *Dulbecco's phosphate buffered saline solution* conteniendo NaCl (137 mM), Na₂HPO₄ (8.1 mM), CaCl₂ (0.9 mM), MgCl₂ (0.5 mM), KCl (2.7 mM) y KH₂PO₄ (1.45 mM) suplementado con L-arginine (1 mM)), pH 7.4 en presencia o ausencia de NaHCO₃ (25 mM). Se utilizó ionomicina (4 μM) para desencadenar la actividad eNOS en presencia o ausencia de L-NAME (10 mM, agregado 30 min antes del ensayo) como inhibidor de NOS. El curso temporal de la oxidación FI-B se monitoreó en un lector de placas siguiendo la emisión de fluorescencia a 37°C (Varioskan, Thermo) a $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$.

7.2 Detección de peroxinitrito endógeno en células en BAECs disfuncionales

Las células BAECs fueron pretratadas con SIN-1 (200 μM, ~ 7 μM peroxinitrito min⁻¹) durante toda la noche para generar disfunción mitocondrial y/o desacoplar la óxido nítrico sintasa de endotelial (eNOS) ambos procesos aumentan los niveles de O₂^{•-} (166). Al día siguiente, se retira el medio y se reemplaza con dPBS suplementado como se describe arriba en la sección 7.1. Los cultivos celulares se incubaron con FI-B o CBA (50 μM) durante 30 minutos a 37°C y la sonda no incorporada se elimina mediante tres lavados con dPBS. Se utilizó ionomicina (4 μM) para desencadenar la activación de eNOS en presencia o ausencia del inhibidor de NOS L-NAME (10 mM). El curso temporal de la oxidación FI-B se monitoreó en un lector de placas de fluorescencia a 37°C (Varioskan, Thermo) a $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$, mientras que la oxidación de CBA se monitoreó a $\lambda_{\text{ex}} = 332 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$.

7.3 Detección de peroxinitrito intramitocondrial en células endoteliales

Las células BAECs se incubaron con FI-B (50 μM) por 40 minutos a 37°C, y posteriormente se agrega Antimicina A (AA, 4 μM) como inhibidor del Complejo III de la cadena respiratoria, inhibiendo la transferencia de electrones y por lo tanto estimulando la producción de O₂^{•-} intramitocondrial. El peroxinitrito intramitocondrial se generó por el agregado del dador de •NO NOC-18 (1 mM, dando un flujo de •NO 0.15 μM/min). Como control positivo de la producción de peroxinitrito en BAECs se utilizó SIN-1 (20 μM, dando un flujo de peroxinitrito de 0.7 μM/min). El curso temporal de la oxidación FI-B se monitoreó en un lector de placas de fluorescencia a 37°C (Varioskan, Thermo) a $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$, mientras que la oxidación de CBA se monitoreó a $\lambda_{\text{ex}} = 332 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$.

BAECs tratadas con las mismas condiciones experimentales también se analizaron por microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse TE-200, microscopio invertido), las imágenes fueron tomadas con cámara digital monocromática (Nikon DS-Qi1MC) y analizadas con el programa ImageJ™.

7.4 Oxidación de FI-B dentro de *T. cruzi* internalizado en fagosomas de macrófagos

Los macrófagos inmunoestimulados (para inducir la iNOS, óxido nítrico sintasa inducible) se obtuvieron mediante la incubación de éstas células con IFN-γ (400

unidades mL^{-1}) y LPS ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 5 horas en medio DMEM a 37°C (176). Tripomastigotes de *T. cruzi* (3×10^5 o 6×10^5 células/mL) fueron precargados con FI-B ($100 \mu\text{M}$) o CBA ($100 \mu\text{M}$) durante 30 min a 37°C en dPBS. Después de la incubación, los tripomastigotes se centrifugaron a 800 g durante 10 min a 25°C y se lavaron dos veces en dPBS con el fin de eliminar la sonda no incorporada. *T. cruzi* precargados con FI-B o CBA se incubaron con los macrófagos inmunoestimulados en ausencia o presencia del inhibidor de iNOS L-NAME (10 mM , 30 min antes de la infección). Después de 1 h de incubación, se siguió el curso temporal de la oxidación FI-B en un lector de placas de fluorescencia a 37°C (Varioskan, Thermo) a $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$, mientras que la oxidación de CBA se monitoreó a $\lambda_{\text{ex}} = 332 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$.

Los macrófagos infectados se levantaron con tripsina y se analizaron por citometría de flujo (FACS Calibur, Becton Dickinson). Al menos 30.000 eventos se evaluaron en cada tratamiento experimental y se analizaron usando el programa WinMID 2.9.

Por último, los macrófagos se sembraron en placas de vidrio (MatTek Co., USA) y se trataron como se describió anteriormente. Los macrófagos fueron analizados por microscopía de epi-fluorescencia a un aumento de 1000X (Nikon Eclipse TE-200 microscopio invertido), las imágenes digitales tomadas con cámara digital (Nikon DS-Qi1MC blanco y negro) y se analizaron utilizando el programa ImageJ™.

Para la estimación del flujo de peroxinitrito intrafagosomal, los macrófagos inmunoestimulados (para inducción de iNOS) (6×10^5 células/mL) se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* precargados con FI-B ($100 \mu\text{M}$, 30 minutos a 37°C). Después de 2 h de incubación los parásitos no incorporados fueron eliminados por lavado en dPBS (4 veces). Los fagosomas de los macrófagos se obtuvieron mediante el paso de células a través de una aguja 27 G x 1/2" para romper las membranas plasmáticas (100 veces). Los fagosomas se contaron en una cámara de Neubauer (4.4×10^5 fagosomas/ $100 \mu\text{L}$) y la oxidación de FI-B dentro de los fagosomas se midió con un lector de microplacas (Varioskan, Thermo).

Capítulo 1. Parte 2.2

2.2 FI-B en la detección de hidroperóxidos de aminoácidos y proteicos

Introducción y estrategia experimental

Los hidroperóxidos (R-OOH) de residuos aminoacídicos (tirosina, triptófano e histidina) en proteínas se forman por modificaciones oxidativas inducidas por especies reactivas de oxígeno. Estas modificaciones postraduccionales pueden traer serias consecuencias biológicas, debido a que los hidroperóxidos son intermedios inestables y pueden propagar aún más el daño oxidativo en las proteínas. Los hidroperóxidos de proteínas pueden inducir daño secundario a través de la inactivación de enzimas dependientes de tioles esenciales para la función celular, además se ha reportado que los hidroperóxidos proteicos pueden inducir daño al ADN (179).

Los métodos clásicos para la detección de hidroperóxidos proteicos incluyen:

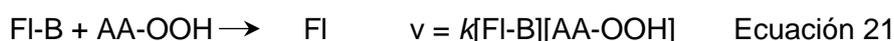
i. El ensayo de FOX, donde el ROOH oxida Fe^{+2} a Fe^{+3} en medio ácido, y posteriormente el reactivo naranja de xilenol (XO, del inglés Xylenol Orange) actúa como quelante de la especie oxidada dando un complejo de coordinación XO-Fe^{+3} coloreado que absorbe a 560 nm (180, 181).

ii. Valoración iodométrica, el ROOH oxida yoduro a triioduro (I_3^-) que se titula con una solución de tiosulfato utilizando almidón como indicador (182).

Sin embargo, estos métodos presentan varias limitaciones, por ejemplo, múltiples especies actúan como interferentes generando resultados erróneos, no tienen una estequiometría definida, además de que no pueden ser aplicados para determinaciones en tiempo real.

Debido al carácter nucleofílico de los hidroperóxidos en su forma desprotonada (ROO^-) serían capaces de reaccionar con centros electrofílicos como los ácidos y/o ésteres borónicos, de hecho recientemente se han reportado las constantes de velocidad de la reacción entre ciertos hidroperóxidos aminoacídicos (AA-OOH) y boronatos (179). En ese trabajo se determinó que la reacción entre AA-OOH y CBA es ligeramente más rápida que para H_2O_2 ($k_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), siendo $k_{\text{TyrOOH}} = 23 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{TrpOOH}} = 11 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{HisOOH}} = 23 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (179).

En esta sección se describe la evaluación de la reactividad entre FI-B e hidroperóxidos aminoacídicos y proteicos generados por la oxidación de oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), Ecuación 21. Además, se describe el desarrollo de un método de cuantificación de hidroperóxidos aminoacídicos a partir de la oxidación de FI-B en velocidades iniciales.



Por último, se evaluó la capacidad de FI-B en la detección de hidroperóxidos de proteínas plasmáticas en muestras de plasma humano, comparándola con CBA y el Ensayo de FOX. También, se determinaron los límites de detección de fluoresceína (FI)

y 7-hidroxycumarina (COH), demostrando que FI es un fluoróforo más sensible y eficiente.

Resultados y Discusión

1. Generación de hidroperóxidos aminoacídicos (AA-OOH)

Los hidroperóxidos de aminoácidos (AA-OOH) se generaron al hacer reaccionar al aminoácido correspondiente con oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$). El oxígeno singulete puede generarse por reacciones fotosensibilizantes, mediante la irradiación de luz de la correcta longitud de onda a ciertos agentes fotosensibilizantes⁴ como la rosa bengala (Figura 38), los cuales absorben la energía llevando a la molécula a un estado excitado. Posteriormente, la energía de excitación se transfiere a una molécula de O_2 adyacente transformándola a un estado de oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), mientras que el agente fotosensibilizante vuelve al estado basal (183), Ecuación 22.

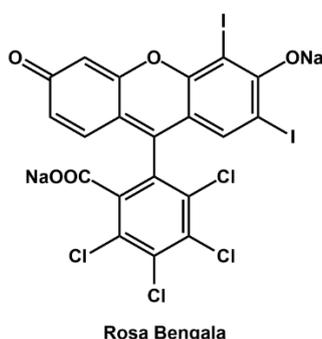
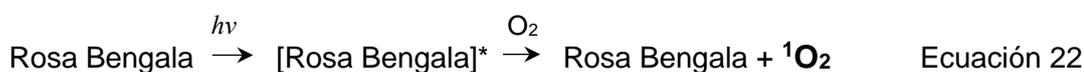


Figura 38. Estructura química de Rosa Bengala, sal disódica de 4,5,6,7-tetracloro-2',4',5',7'-tetraiodofluoresceina.

Por lo tanto, al irradiar con luz ($h\nu$) una mezcla conteniendo al aminoácido puro (Tyr, Trp, o His) y rosa bengala, se generó el hidroperóxido correspondiente a partir de la generación de $^1\text{O}_2$, según el mecanismo de reacción mostrado en la Figura 39 para Tyr. Análogamente se generaron los hidroperóxidos de otros aminoácidos como Trp e His, Figura 40.

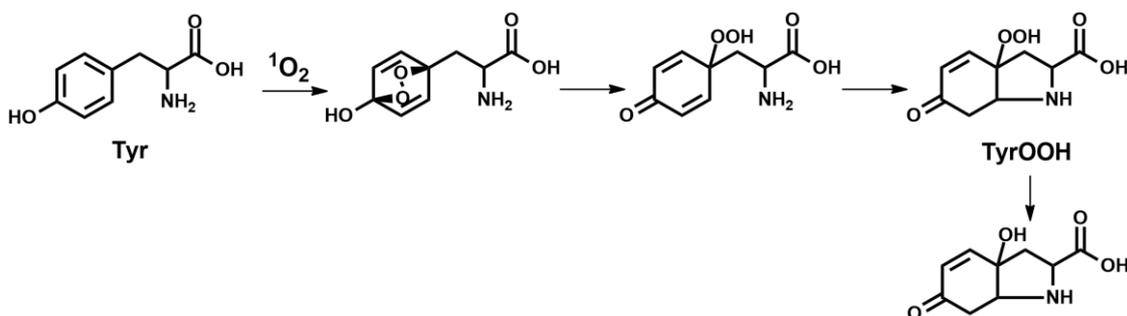


Figura 39. Mecanismo de formación del hidroperóxido de tirosina (TyrOOH), a partir de tirosina (Tyr) y oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$). Modificado de (184).

⁴ Un agente fotosensibilizador o fotosensibilizante es una molécula que produce un cambio químico en otra molécula en un proceso fotoquímico.

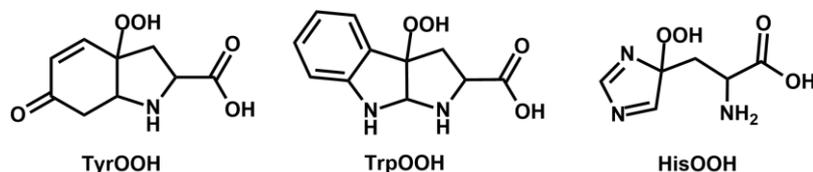


Figura 40. Estructura química de hidroperóxidos de aminoácidos. TyrOOH, hidroperóxido de tirosina; TrpOOH, hidroperóxido de triptófano; HisOOH, hidroperóxido de histidina. Modificado de (179).

2. Oxidación de FI-B por AA-OOH y evaluación de la estabilidad

En primer lugar, evaluamos si FI-B era capaz de reaccionar con los hidroperóxidos aminoacídicos al medir el aumento de fluorescencia por oxidación de FI-B debida a la reacción con TyrOOH, TrpOOH, e HisOOH, Figura 41.

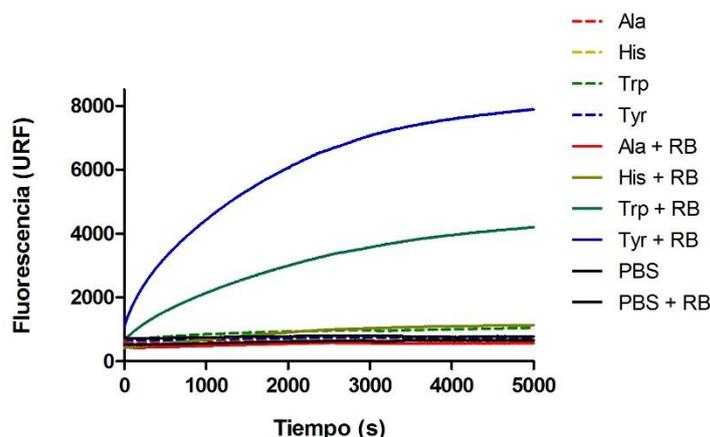


Figura 41. Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B (20 μM) por la formación de hidroperóxidos de diferentes aminoácidos (Tyr, Trp, His). Ala se utiliza como control negativo de formación del hidroperóxido. Previamente, para la generación de los hidroperóxidos de aminoácidos se hizo reaccionar al AA correspondiente (0.5 mM) con Rosa Bengala (RB, 10 μM) y se irradia por 10 min con luz (100 W). Se agrega catalasa (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) antes de cada medida y se deja reaccionar 5 min para evitar reacción con trazas de H_2O_2 que se pudieran haber formado. Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 25°C, registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan), $\lambda_{\text{ex}}=492$ nm y $\lambda_{\text{em}}=515$ nm.

Si bien en literatura se reporta que los boronatos no son capaces de reaccionar a pH fisiológico con hidroperóxidos lipídicos (L-OOH) debido al alto pK_a de éstos ($pK_a > 12$) (179), estudiamos la reacción de FI-B con dos hidroperóxidos lipídicos estables comerciales, hidroperóxido de cumeno (CumOOH) y *tert*-Butilhidroperóxido (*t*-ButOOH), Figura 42.

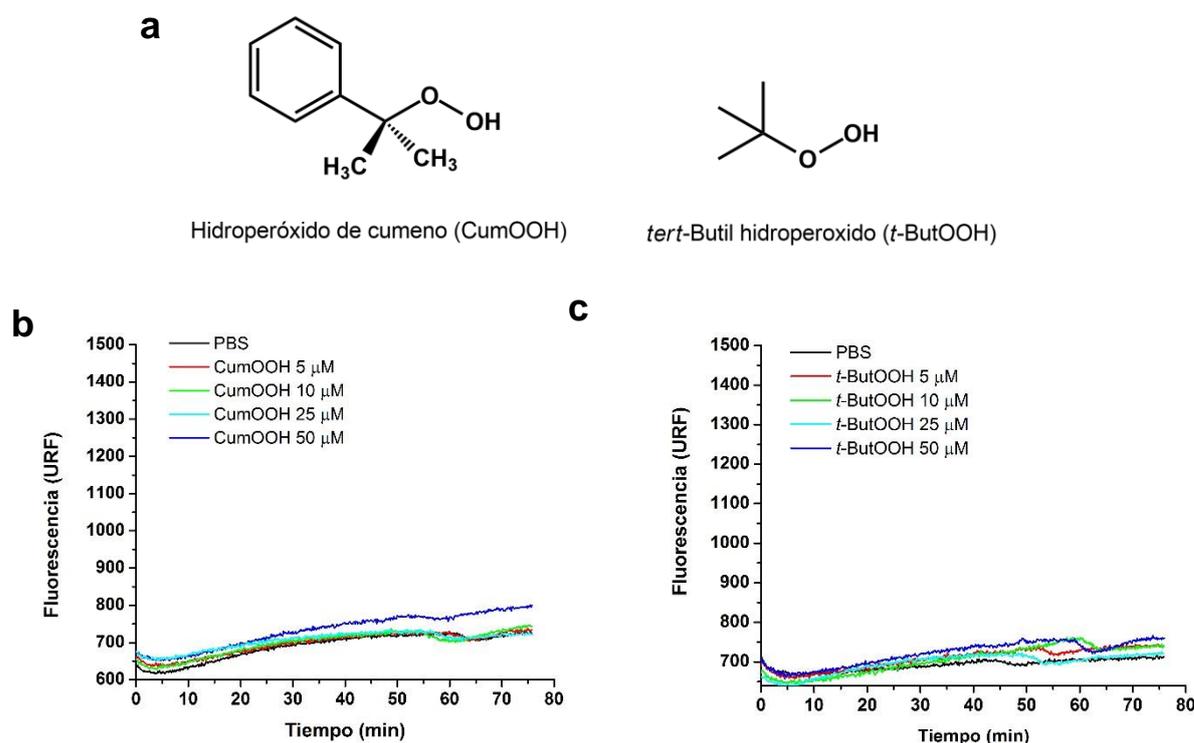


Figura 42. Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B (50 μM) por reacción con hidroperóxidos lipídicos comerciales. a) Estructuras químicas de los hidroperóxidos lipídicos utilizados. b) y c) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B (50 μM) por reacción con CumOOH (panel b) y *t*-ButOOH (panel c) a diferentes concentraciones 5, 10, 25, 50 μM . c) Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 25°C, registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan), $\lambda_{\text{ex}}=492$ nm y $\lambda_{\text{em}}= 515$ nm.

Como muestra la Figura 42, efectivamente no hubo reacción entre boronatos e hidroperóxidos lipídicos a diferencia de los hidroperóxidos aminoacídicos donde se observa aumento de fluorescencia por oxidación de FI-B. Una de las causas posibles de la falta de reacción a pH fisiológico, puede ser como se mencionó, el alto pKa de los primeros, siendo el pKa = 12.8 para el hidroperóxido de cumeno y pKa = 12.6 para el *tert*-Butil hidroperóxido (185).

Luego, evaluamos la estabilidad en el tiempo de las especies oxidadas. Para esto se generaron los AA-OOH por reacción entre $^1\text{O}_2$ y el aminoácido correspondiente al irradiar una mezcla conteniendo RB (10 μM) y AA (0.5 mM) por 5 minutos de exposición a $h\nu$ (100 W). Posteriormente, se dejan las soluciones en oscuridad a temperatura ambiente por 0, 30 y 60 minutos, se agrega catalasa antes de cada medida y se mide oxidación de FI-B, Figura 43.

Los datos obtenidos están de acuerdo con estudios previos realizados por el Davies y colaboradores (184), donde se observa que los hidroperóxidos generados son estables a T.A. al menos por 60 minutos.

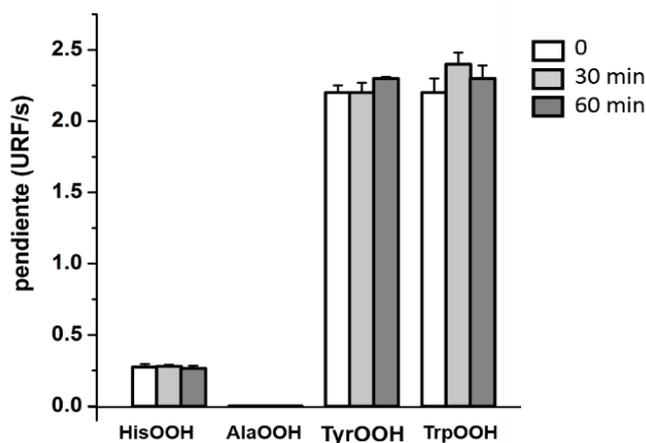


Figura 43. Estabilidad en el tiempo de los hidroperóxidos aminoacídicos generados medidos por oxidación de FI-B ($20 \mu\text{M}$). Para la generación de los hidroperóxidos de aminoácidos se hizo reaccionar al AA (0.5 mM) correspondiente con Rosa Bengala (RB, $10 \mu\text{M}$) y se irradia por 5 min con luz (100 W). Se dejan las soluciones en oscuridad a temperatura ambiente por 0, 30 y 60 minutos, se agrega catalasa ($80 \mu\text{g/mL}$) antes de cada medida. Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM , pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 25°C , registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan), $\lambda_{\text{ex}}=492 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}}= 515 \text{ nm}$. Se muestra el promedio de tres registros independiente.

3. Cuantificación de [AA-OOH] por el método de velocidades iniciales

Posteriormente, ensayamos diferentes tiempos (0, 5 y 10 min) de irradiación de luz ($h\nu$, 100 W) sobre la mezcla de Tyr y RB, dando una formación de TyrOOH directamente proporcional al tiempo de exposición a $h\nu$. (Figura 44, Tabla 11).

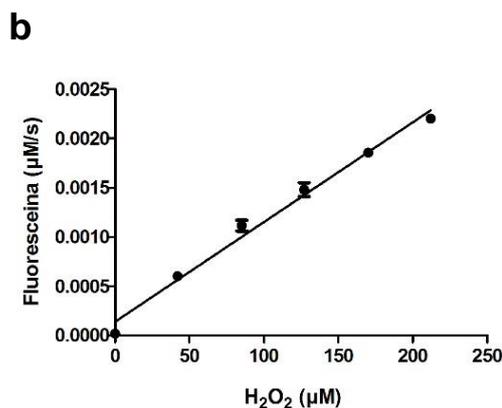
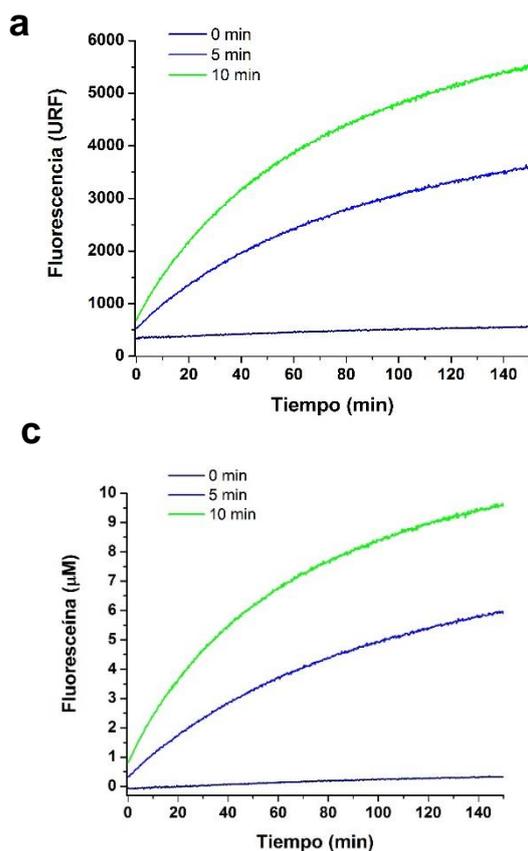


Figura 44. Formación de TyrOOH por reacción entre ¹O₂ y Tyr al irradiar una mezcla conteniendo RB (10 μM) y Tyr (0.5 mM) por 0, 5 y 10 minutos de exposición a hv. a) Curso temporal de la emisión de fluorescencia tras la oxidación de FI-B (20 μM) por TyrOOH. b) Curva de calibración de producto formado fluoresceína (μM/s) tras la oxidación de FI-B (20 μM) por concentraciones conocidas de H₂O₂, conteniendo RB 10 μM. c) Curso temporal de fluoresceína formada. Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 25°C, registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan), λ_{ex}=492 nm y λ_{em}= 515 nm.

En la Tabla 11 se muestran los valores de [TyrOOH] estimadas a partir la extrapolación de la curva de calibración con H₂O₂, Figura 44 panel b.

Por otro lado, podemos suponer que las velocidades de reacción entre FI-B y H₂O₂ o FI-B y TyrOOH, en velocidades iniciales se igualen en determinado momento para determinada combinación de concentraciones de [H₂O₂] y de [TyrOOH], según la Ecuación 23. Trabajando en condiciones de *pseudo*-primer orden, sabiendo el valor de [FI-B] utilizado en la medición, conociendo el valor de $k_{H_2O_2} = 0.65 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ determinado en este Trabajo, para una [H₂O₂] dada, conocemos el término a la izquierda de la Ecuación 23. Utilizando el valor de la constante de velocidad reportada para $k_{TyrOOH} = 23.4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (179)⁵ y aplicando la Ecuación 23, se pueden estimar los valores de concentración de TyrOOH ([TyrOOH]) formados, Tabla 11.

$$V_{H_2O_2} = V_{TyrOOH}$$

$$k_{H_2O_2}[FI-B][H_2O_2] = k_{TyrOOH}[FI-B][TyrOOH] \quad \text{Ecuación 23}$$

⁵ Para la determinación del valor de la constante de velocidad k_{TyrOOH} el boronato utilizado fue CBA (178). Sin embargo ya hemos demostrado que los valores de k de diferentes nucleófilos con boronatos están en el mismo orden de magnitud para la mayoría de los boronatos reportados.

Tabla 11. Comparación de [TyrOOH] calculada por el método de velocidades iniciales, con las obtenidas mediante curva de calibración para diferentes tiempos de irradiación de hv sobre una mezcla conteniendo Tyr y RB, medido por oxidación de FI-B.

Tiempo (hv)	v ($\mu\text{M/s}$) ¹	[TyrOOH] (μM) ¹	v ($\mu\text{M/s}$) ²	[TyrOOH] (μM) ²
0 min	4.90×10^{-5}	0.11	4.92×10^{-5}	0.105
5 min	1.19×10^{-3}	2.6	1.19×10^{-3}	2.9
10 min	2.23×10^{-3}	4.8	2.24×10^{-3}	4.8

¹ [TyrOOH] estimada a partir de oxidación de FI-B en velocidades iniciales, utilizando la constante de velocidad reportada en (179).

² [TyrOOH] estimada a partir de la extrapolación de la curva de calibración con H₂O₂, Figura 44 panel b).

Como se puede observar en la Tabla 11, los valores calculados por ambas aproximaciones son casi idénticos, validando el método de velocidades iniciales para hidroperóxidos de aminoácidos aislados.

La determinación de la concentración de hidroperóxidos aminoácidos en una muestra problema por el método de velocidades iniciales utilizando FI-B como sonda de detección tiene varias ventajas: es más rápido y sencillo desde el punto de vista práctico debido a que se puede medir en tiempo real, no es necesario completar la reacción (sólo importan los primeros minutos de reacción), y además se evitaría la realización de una curva de calibración. Sin embargo, tiene la limitante de que las *k* de velocidad deben ser conocidas.

3.1 Determinación de la $k_{\text{BSA-OOH}}$

Para poder aplicar el método de velocidades iniciales a muestras más complejas, por ejemplo, de hidroperóxidos proteicos utilizamos como modelo a la BSA (seroalbúmina bovina, del inglés Bovine serum albumin) una proteína ampliamente utilizada en laboratorios de bioquímica. La BSA tiene en su estructura proteica 21 residuos de Tyr, 3 residuos de Trp, y 17 residuos de His, como los aminoácidos más susceptibles de ser oxidados al hidroperóxido.⁶

El hidroperóxido de BSA (BSA-OOH) fue generado mediante la reacción con ¹O₂ producido por la irradiación de luz (hv) a una mezcla conteniendo la proteína y rosa bengala.

En primer lugar evaluamos el aumento de fluorescencia por oxidación de FI-B debida a la reacción con BSA-OOH, Figura 45.

Si bien se observa oxidación de FI-B debida a la formación de BSA-OOH para dos tiempos de exposición a hv, donde el agente reductor NaBH₄ atenúa la señal fluorescente por reducción del hidroperóxido, Figura 45, no fue posible determinar un valor de la constante de reacción entre FI-B y BSA-OOH.

⁶ Secuencia aminoacídica publicada en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA51411.1>

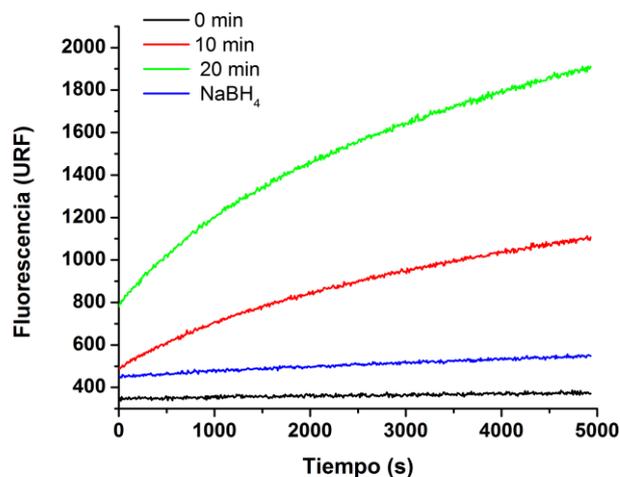


Figura 45. Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B (20 μM) por la formación de hidropéroxido proteico (BSA-OOH). Previamente, para la generación del hidropéroxido de BSA se hizo reaccionar BSA (5 mg/mL) con Rosa Bengala (RB, 10 μM) y se irradia por 10 y 20 min con luz (100 W). El agente reductor NaBH_4 (1 mM) se agrega luego de la irradiación con luz y se deja reaccionar por 10 minutos. Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 25°C, registrada en un lector de placas de fluorescencia (Varioskan), $\lambda_{\text{ex}}=492$ nm y $\lambda_{\text{em}}=515$ nm.

Los cursos temporales de oxidación de FI-B por BSA-OOH bajo condiciones de *pseudo*-primer orden no se ajustaron a curvas exponenciales (Figura 45) por lo que no fue posible la determinación de la constante de velocidad de la reacción entre FI-B y BSA-OOH.

4. Detección de hidropéroxidos proteicos en una muestra compleja

A continuación evaluamos la detección mediante oxidación de FI-B por hidropéroxidos proteicos en muestras de plasma humano fresco, el cual contiene ~ 80 mg/mL de proteínas plasmáticas (9). En primer lugar, estudiamos la posible formación de hidropéroxidos proteicos formados en proteínas plasmáticas por exposición del plasma humano al O_2 atmosférico, Figura 46.

Como muestra la Figura 46, si bien los cursos temporales muestran curvas con ruido, se puede observar que la emisión de fluorescencia debida a la oxidación por hidropéroxidos de proteínas plasmáticas aumenta con la exposición de éstas al O_2 , mientras que el agente reductor NaBH_4 reduce completamente la señal debido a la reducción de los hidropéroxidos, Figura 46 panel a). En el panel b) de la Figura 46 se muestra que el ruido en las curvas no es debida a la autooxidación de FI-B ya que es estable a lo largo del tiempo, ni el plasma en ausencia de sonda genera señales que puedan interferir.

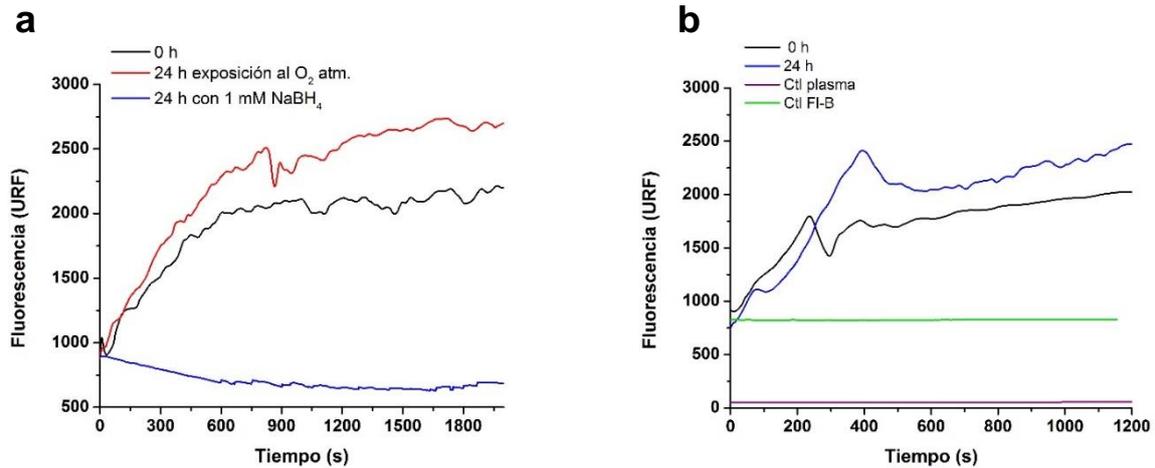


Figura 46. Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B (20 μ M) por hidroperóxidos de proteínas plasmáticas, en muestras de plasma humano conteniendo 1 mg/mL de proteínas plasmáticas expuestas a 0 y 24 h al oxígeno atmosférico a 4°C. a) El agente reductor NaBH₄ (1 mM) se agrega y se deja reaccionar por 10 minutos antes de la medición. b) Una corrida independiente donde se muestra que la sonda FI-B es estable a lo largo del tiempo a pesar de la exposición al láser del fluorímetro, y además el plasma en ausencia de sonda no produce señal fluorescente. Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 25°C, con agregado de catalasa 80 μ g/mL por 5 min para eliminar cualquier traza de H₂O₂ antes de cada corrida, registrada en un espectrofluorímetro (JASCO), λ_{ex} =492 nm y λ_{em} = 515 nm.

Luego, evaluamos si FI-B es capaz de discriminar hidroperóxidos proteicos en muestras de plasma diluídas de diferente concentración, Figura 47.

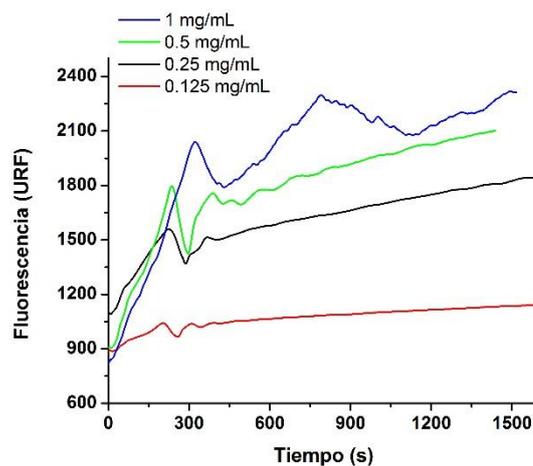


Figura 47. Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de FI-B (20 μ M) por hidroperóxidos de proteínas plasmáticas, en muestras de plasma humano conteniendo 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL de proteínas plasmáticas. Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 25°C, con agregado de catalasa 80 μ g/mL por 5 min para eliminar cualquier traza de H₂O₂ antes de cada corrida, registrada en un espectrofluorímetro (JASCO), λ_{ex} =492 nm y λ_{em} = 515 nm.

En un intento por mejorar las curvas de los cursos temporales se ensayaron las siguientes estrategias:

- i. Se agregó dodecilsulfato sódico (SDS) al 5 y 10% sin mejoras.
- ii. También se intentó con el agregado de fluoresceína para ocupar sitios de unión con proteínas plasmáticas, pero tampoco se observaron mejoras significativas.
- iii. Otra estrategia fue hacer reaccionar 0.5 mg/mL de proteínas plasmáticas con FI-B (20 μ M) y tomar alícuotas cada 1 min, realizar una extracción orgánica (donde ensayamos diferentes disolventes como acetonitrilo, acetona, o DMSO), centrifugación a 20.000g por 30 min a 4°C, para separar las proteínas plasmáticas de moléculas del fluoróforo formado y cualquier otra especie que pudiera estar interfiriendo en la medida, y medir emisión de fluorescencia en fluorímetro de cada muestra, sin éxito. Probablemente la sonda quedó retenida en pellet debido a que no observamos señal.
- iv. Por último para descartar la interferencia de algún componente de bajo peso molecular en la reacción, por ejemplo, hidroperóxidos de ácido úrico que pudieran estar presentes en las muestras de plasma humano, evaluamos la reacción de FI-B (20 μ M) con 0.5 mg/mL de proteínas plasmáticas tomando alícuotas cada 1 min. Luego, realizamos una cromatografía de filtración en gel, a cada alícuota, la cual separa las moléculas según su diferente peso molecular, utilizando una columna HiTrap® Desalting, en un equipo ÄKTA™ siguiendo absorbancia a 280 nm y emisión de fluorescencia en fluorímetro. Lamentablemente tampoco pudimos separar el fluoróforo de la fracción proteica para ningún tiempo evaluado.

Por lo tanto, un método cinético de detección de hidroperóxidos de proteínas plasmáticas midiendo emisión de fluorescencia tras la oxidación de FI-B a lo largo del tiempo en muestras de plasma, no sería de elección debido a que las curvas de los cursos temporales presentan oscilaciones y ruido.

Es así que decidimos realizar un método a *punto final*, es decir medir la emisión de fluorescencia tras la oxidación de FI-B por hidroperóxidos proteicos luego de determinado tiempo de reacción.

Determinación del tiempo final de reacción

Para determinar el tiempo final de la reacción entre FI-B e hidroperóxidos de proteínas plasmáticas, se hizo reaccionar a FI-B (20 μ M) con concentraciones crecientes de proteínas plasmáticas, se tomaron alícuotas cada 5 min y se midió la emisión de fluorescencia, Figura 48.

En la Figura 48, se muestra la mejor correlación entre concentración de proteínas plasmáticas y emisión de fluorescencia, siendo 25 minutos el tiempo óptimo de reacción. A menores y mayores tiempos se observan correlaciones erráticas.

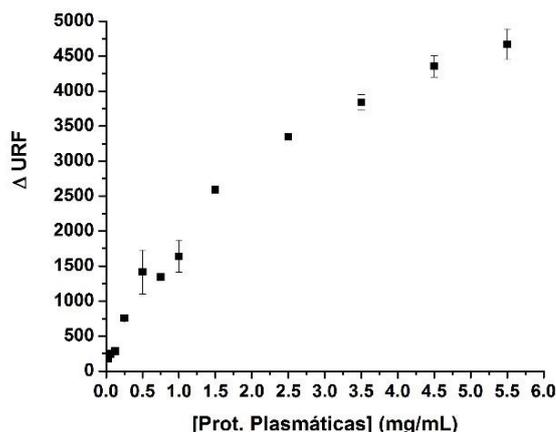


Figura 48. Determinación del punto final de la reacción entre FI-B (20 μ M) e hidroperóxidos de proteínas plasmáticas. A $t = 25$ min se observa buena correlación entre diferentes concentraciones de proteínas plasmáticas (0.031, 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 y 5.5 mg/mL) y emisión de fluorescencia por oxidación de FI-B. Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 25°C, con agregado de catalasa 80 μ g/mL por 5 min antes de cada corrida, registrada en un espectrofluorímetro (JASCO), $\lambda_{ex}=492$ nm y $\lambda_{em}=515$ nm. Sensibilidad manual a 250 V. Se muestra el promedio de 3 registros independientes.

5. Comparación en la detección por CBA y por el Ensayo de FOX

Realizamos el ensayo de FOX, un método colorimétrico clásico para la detección y cuantificación de hidroperóxidos orgánicos (180, 181) sobre las muestras de plasma humano. El principio de este ensayo se basa en que el ROOH oxida Fe^{+2} a Fe^{+3} en medio ácido, y posteriormente el reactivo naranja de xilenol (XO, del inglés Xylenol Orange) actúa como quelante de la especie oxidada dando un complejo XO- Fe^{+3} coloreado que absorbe a 560 nm.

Al realizar el ensayo en diferentes concentraciones de proteínas plasmáticas 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/mL, no se observó cambio de color en las muestras, donde los valores de absorbancia obtenidos fueron cercanos a 0. Esto significa que las concentraciones de hidroperóxidos proteicos en esas diluciones son menores al límite de detección del ensayo de FOX. Mientras que para mayores concentraciones de proteínas plasmáticas 2, 5 y 10 mg/mL se observó precipitación de proteínas debido al medio ácido del ensayo. Por lo tanto, no fue posible la aplicación de este método clásico en la detección de hidroperóxidos de proteínas plasmáticas.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con reportes previos sobre detección y cuantificación de hidroperóxidos aminoacídicos (en particular TyrOOH), donde Winterbourn y colaboradores observan que la cantidades detectadas por HPLC son 6 veces menores que las detectadas por FOX (186), mientras que otros autores como Kalyanaraman y colaboradores, reportan que las cantidades detectadas de TyrOOH por CBA son de 3 a 5 veces menores que las cantidades que el ensayo de FOX es capaz de detectar (179).

Por último, utilizamos la sonda CBA para detectar hidroperóxidos de proteínas plasmáticas y así compararla con FI-B. CBA es capaz de reaccionar con especies

nucleofílicas, debido a que tiene un ácido borónico en su estructura, y fue utilizada por Kalyanaraman y colaboradores para determinar la constante cinética de la reacción con tres hidroperóxidos de aminoácidos como se describía más arriba.

Al repetir las condiciones mostradas en la Figura 48 realizadas con FI-B (20 μM), CBA (20 μM) no fue capaz detectar hidroperóxidos de proteínas plasmáticas presentes en la muestra, incluso a la mayor concentración de 5.5 mg/mL proteínas plasmáticas. Para todas las determinaciones la sensibilidad configurada en el fluorímetro fue de 250 V.

Posteriormente, para poder observar señal fluorescente debida a la oxidación de CBA por hidroperóxidos de proteínas plasmática, se tuvo que forzar las condiciones de medida del equipo a altos voltajes como 600 V, donde 3.5 mg/mL y 5.5 mg/mL proteínas plasmáticas arrojaron valores ΔURF (1563 ± 732) y (2756 ± 135), respectivamente.

Por lo tanto, a continuación, estudiamos los límites de detección de ambos fluoróforos fluoresceína (FI) y 7-hidroxicumarina (COH), Figura 49 y Tabla 12.

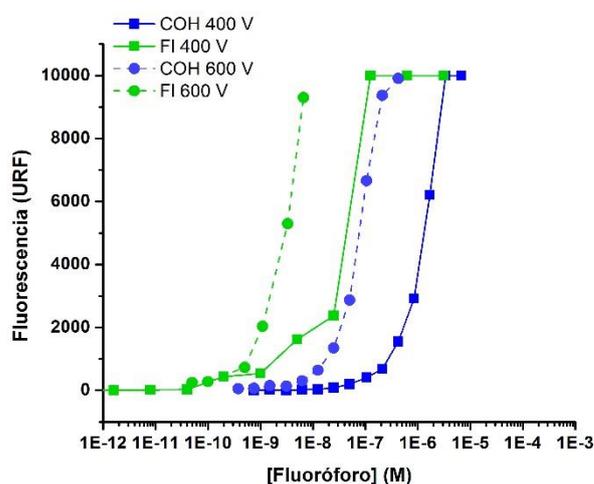


Tabla 12. Comparación de límites de detección de FI y COH.

Fluoróforo	Límite de detección	
	400 V	600 V
COH	200 nM	12.5 nM
FI	1 nM	0.5 nM

Figura 49. Determinación de los límites de detección de los fluoróforos fluoresceína (FI, trazo verde) y 7-hidroxicumarina (COH, trazo azul). Se realizan diluciones seriadas de ambos fluoróforos de manera independiente y se mide la emisión de fluorescencia a dos valores de sensibilidad configuradas en el espectrofluorímetro, sensibilidad manual 400 V (línea continua) y sensibilidad manual 600 V (línea cortada). Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 25°C, registrada en un espectrofluorímetro (JASCO), $\lambda_{\text{ex}}=492$ nm y $\lambda_{\text{em}}=515$ nm para FI; y $\lambda_{\text{ex}}=332$ nm y $\lambda_{\text{em}}=470$ nm para COH.

Como muestra la Figura 49 y la Tabla 12, la fluoresceína es un fluoróforo más sensible que la 7-hidroxicumarina. Aunque los boronatos derivados de cumarinas como CBA (ácido cumarin-7-borónico) reaccionan con constantes cinéticas comparables con oxidantes nucleofílicos, como fue determinado más temprano en este trabajo, FI-B es más sensible debido a que la fluoresceína (FI) es un fluoróforo más eficiente que la 7-hidroxicumarina (COH). La fluoresceína tiene un mayor coeficiente de absorción molar ($\epsilon_{\text{FI}, 490 \text{ nm}} = 76.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (159); $\epsilon_{\text{COH}, 323 \text{ nm}} = 11.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (160)), y posee un mayor rendimiento cuántico ($\Phi_{\text{F, FI}} = 0.93$ (159); $\Phi_{\text{F, COH}} = 0.15$ (160)), que la 7-hidroxicumarina, haciéndola un fluoróforo más sensible y eficiente.

Conclusiones parciales

En esta sección se describió la evaluación de la reactividad entre FI-B e hidropéroxidos aminoacídicos y proteicos generados por la oxidación de oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), y la detección de hidropéroxidos de proteínas plasmáticas en plasma humano.

Desarrollamos un método de cuantificación de hidropéroxidos aminoacídicos a partir de la oxidación de FI-B en velocidades iniciales (Tabla 11). La determinación de la concentración de hidropéroxidos aminoacídicos en una muestra problema por el método de velocidades iniciales utilizando FI-B como sonda de detección tiene varias ventajas: es más rápido y sencillo desde el punto de vista práctico debido a que se puede medir en tiempo real, no es necesario completar la reacción (sólo importan los primeros minutos de reacción), y además se evitaría la realización de una curva de calibración. Sin embargo, tiene la limitante de que las k de velocidad deben ser conocidas.

Lamentablemente no pudimos determinar la k de la reacción entre FI-B y BSA-OOH debido a que los cursos temporales no siguen curvas exponenciales.

Por último, se evaluó la capacidad de FI-B en la detección de hidropéroxidos de proteínas plasmáticas en muestras de plasma humano, donde un método de determinación a punto final es más adecuado que un método cinético. En este caso el tiempo de reacción óptimo establecido para la reacción entre FI-B e hidropéroxidos de proteínas plasmáticas es de $t = 25$ min.

Posteriormente, comparamos la sensibilidad en detección de FI-B con CBA y el Ensayo de FOX, donde demostramos nuevamente que FI-B es una sonda mucho más sensible debido llegando a menores límites de detección que CBA o FOX, debido a que la fluoresceína es un fluoróforo mucho más sensible y eficiente, Tabla 12.

Materiales y Métodos

Reactivos

Los aminoácidos tirosina (Tyr), triptófano (Trp) e histidina (His) y la sal disódica de 4,5,6,7-tetracloro-2',4',5',7'-tetraiodofluoresceína (rosa bengala) se adquirieron de Sigma-Aldrich. BSA (seroalbúmina bovina, del inglés Bovine Serum Albumin) se adquirió de Sigma-Aldrich. FI-B se sintetizó de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1, Sección 2.1. Sal tetrasódica de 3,3'-bis [*N,N*-bis(carboximetil)aminometil] - *o*-cresolsulfoftaleína (Xylenol Orange) se adquirió de Applichem. El plasma humano se obtuvo de donantes sanos; la sangre completa se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 4°C para extraer el plasma (sobrenadante). Las muestras se alicuotan y se congelan a -80°C para su almacenamiento. Antes de cada experimento se descongelan y se vuelven a centrifugar a 8000 g durante 3 minutos a 4°C para eliminar el material insoluble. Se agrega catalasa (80 µg/mL) antes de cada experimento.

Generación y detección de hidroperóxidos aminoacídicos o proteicos con FI-B

Los hidroperóxidos aminoacídicos o proteicos se generaron mediante irradiación de luz $h\nu$ (100 W) sobre una mezcla del correspondiente aminoácido (Tyr, Trp o His) 0.5 mM en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4 conteniendo 0.1 mM DTPA, o BSA (0.5 mM) respectivamente, con rosa bengala (10 μ M, disuelta en EtOH), por 5, 10, 15 o 30 min según cada experimento.

Cuando se trabajó con muestras de plasma se consideró un contenido de ~80 mg/mL de proteínas plasmáticas para las diluciones posteriores.

Previo al agregado de la sonda FI-B se agregó a cada muestra catalasa 80 μ g/mL por 5 min para eliminar cualquier traza de H_2O_2 que se haya formado en la fotólisis.

Se preparó una solución stock de FI-B (4.5 mM en DMSO) y se agregó esta solución directamente a las muestras para obtener la concentración deseada de FI-B (20 μ M).

Los registros de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Jasco FP-8500, Sensibilidad Manual 250 V, $\lambda_{exc} = 492$ nm; $\lambda_{em} = 515$ nm. Para otros experimentos la emisión de fluorescencia se registró en un lector de placas (Varioskan), $\lambda_{exc} = 492$ nm; $\lambda_{em} = 515$ nm. Se realizaron al menos tres determinaciones para cada condición experimental.

Ensayo de FOX

Se evaluó el ensayo de FOX (187) para detectar hidroperóxidos en proteínas plasmáticas en muestras de plasma humano fresco (conteniendo ~ 80 mg/mL de proteínas plasmáticas (9)). Se realizaron diluciones en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4, y a cada dilución de proteínas plasmáticas: 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 5 y 10 mg/mL se agregaron 900 μ L del reactivo de FOX (100 μ M Xylenol Orange, 250 μ M Fe^{+2} , 25 mM H_2SO_4 , y 4 mM BHT en 90% (v/v) metanol), se incubó por 30 min a temperatura ambiente, y se mide absorbancia a 560 nm. El quelante DTPA no se agrega a las muestras cuando se usa el reactivo de FOX.

Capítulo 1. Parte 2.3

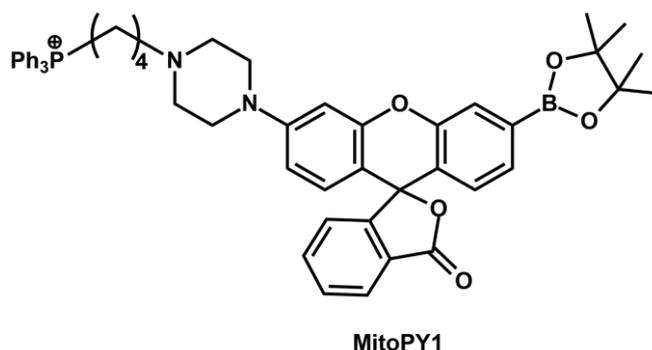
2.3 Validación de la sonda comercial MitoPY1 para la detección de peroxinitrito

Introducción y estrategia experimental

La detección precisa de peroxinitrito en diferentes compartimentos celulares y la estimación de sus tasas de formación, representan pasos fundamentales para entender cómo las especies derivadas de óxido nítrico afectan procesos biológicos, incluyendo disfunción mitocondrial y muerte celular.

En el Capítulo 1, parte 1.2, describimos el diseño, síntesis y caracterización de sondas fluorescentes derivadas del éster borónico de la cumarina dirigidas a la matriz mitocondrial **MitoCT-i** y **MitoCT-ii** para la detección de peroxinitrito desarrolladas en la presente tesis.

En esta sección se detalla el trabajo realizado para la caracterización de una sonda comercial llamada **MitoPY1** (del inglés, Mitochondria Peroxy Yellow 1), la cual fue inicialmente reportada para la detección de H_2O_2 en mitocondrias (188), Esquema 28. Estructuralmente **MitoPY1** es un éster borónico soportado sobre el esqueleto de fluoresceína como el fluoróforo, la cual además soporta una piperazina como conector a 4 C de distancia del catión lipofílico trifenilfosfonio para dirigirla a la matriz mitocondrial. Debido a que posee un éster borónico en su estructura, y como ha sido ampliamente estudiado que la reacción con nucleófilos como peroxinitrito es cinéticamente más favorable que con H_2O_2 (27, 111) evaluamos la posibilidad de su utilización para la detección de peroxinitrito mitocondrial. Además, estudiamos sus propiedades espectroscópicas debido a que el fluoróforo fluoresceína (FI) es un fluoróforo más sensible y eficiente que la 7-hidroxycumarina (COH) como ya ha sido demostrado en este trabajo, debido a un mayor coeficiente de absorción molar y mayor rendimiento cuántico.



Esquema 28. Estructura química de la sonda **MitoPY1** disponible comercialmente (número CAS 1041634-69-8) (188).

Resultados y Discusión

Caracterización de MitoPY1

1. Oxidación de MitoPY1 por peroxinitrito

Inicialmente evaluamos las propiedades espectroscópicas de MitoPY1 y su posibilidad de reaccionar frente a peroxinitrito. Para ello determinamos la emisión de fluorescencia tras la oxidación de MitoPY1 (10 μM) por adiciones sucesivas de peroxinitrito (0 – 5 μM). Se observó un comportamiento lineal de la emisión de fluorescencia tras la oxidación de MitoPY1 por peroxinitrito (Figura 50).

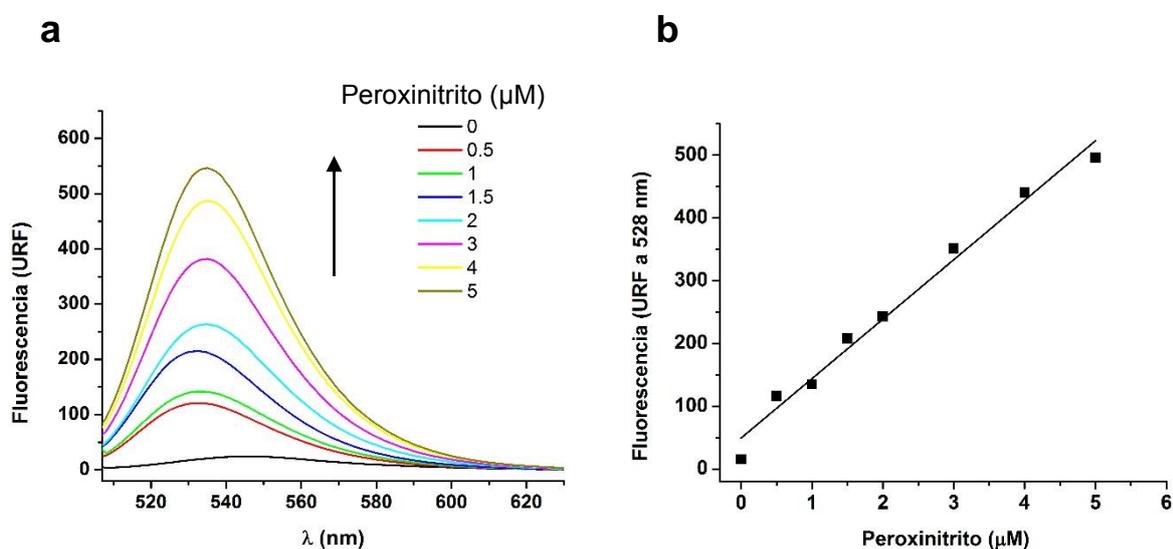


Figura 50. Respuesta fluorescente tras la oxidación de MitoPY1 por peroxinitrito. (a) Espectro de emisión de fluorescencia obtenido al hacer reaccionar MitoPY1 (10 μM) con concentraciones crecientes de peroxinitrito (0–5 μM) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 25°C. Excitación a $\lambda=503$ nm y emisión recogida desde 515 a 630 nm, con un máximo a 528 nm. (b) Los valores del máximo de fluorescencia (URF a 528 nm) de la parte (a) se ajustaron a una línea dando una ecuación de la recta: $y = (94.7 \pm 4.9)x + (49.4 \pm 13.1)$, $R^2 = 0.992$.

Si bien peroxinitrito reaccionó con MitoPY1 como es de esperar para derivados de ésteres borónicos, al avanzar en la caracterización de la sonda comenzamos a observar fenómenos de aumento de emisión de fluorescencia en ausencia de oxidante, Figura 51. MitoPY1 expuesto al aire aumenta la fluorescencia con el tiempo, con un mayor aumento a 37°C, incluso en ausencia de oxidantes agregados, Figura 51, panel b.

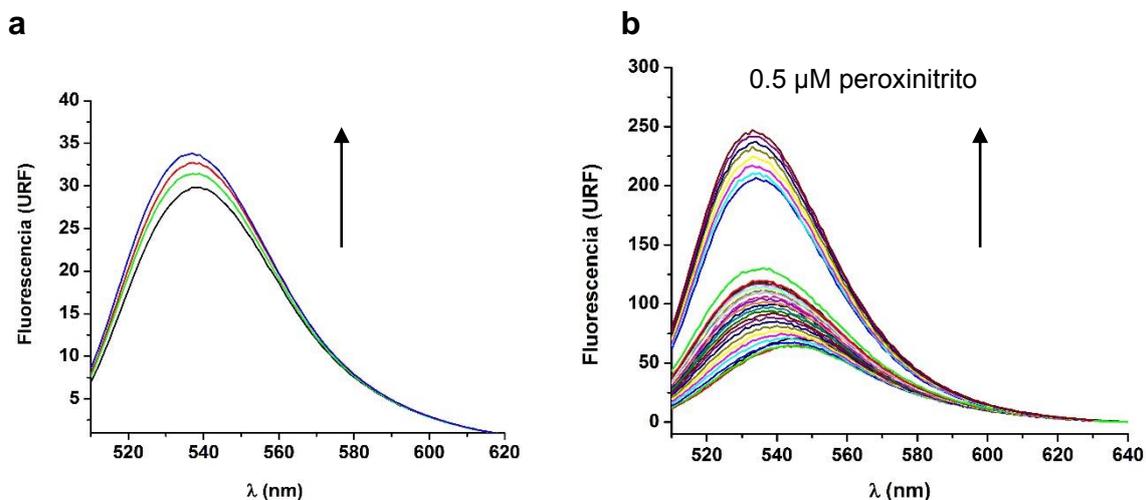


Figura 51. Respuesta de fluorescencia de MitoPY1 en ausencia de oxidantes a lo largo del tiempo (salvo indicado en la Figura). Espectros de fluorescencia de MitoPY1 (10 μM) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.8, 0.1 mM DTPA) a 25°C (a) o 37°C (b) a diferentes tiempos, una corrida cada 1.5 min. Excitación a $\lambda=503$ nm y emisión recogida desde 515 a 640 nm, registrado en un espectrofluorímetro JASCO.

2. Análisis cinético de la oxidación de MitoPY1 por peroxinitrito

La sonda MitoPY1 inicialmente reportada para la detección de H_2O_2 , tiene una constante de velocidad de segundo orden muy pequeña para la reacción con este oxidante ($k_{\text{H}_2\text{O}_2} \sim 0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (188)).

A pesar de que ya es bien establecido que las sondas derivadas de boronatos reaccionan muy rápidamente con peroxinitrito (111, 189-191), estudiamos la cinética de la reacción de MitoPY1 con este oxidante por dos técnicas, donde el análisis cinético directo (Figura 52) y la cinética por competencia (Figura 54) muestran que MitoPY1 reacciona rápidamente ($k \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) con el anión peroxinitrito (ONOO^-), (Tabla 12).

2.1 Método directo por técnica de flujo detenido

Mediante el análisis directo de cinética rápida por la técnica de flujo detenido (Figura 52) determinamos un valor constante de velocidad de segundo orden de $0.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $0.43 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 25°C, y pH 7.4 o 7.8, respectivamente. Tabla 12.

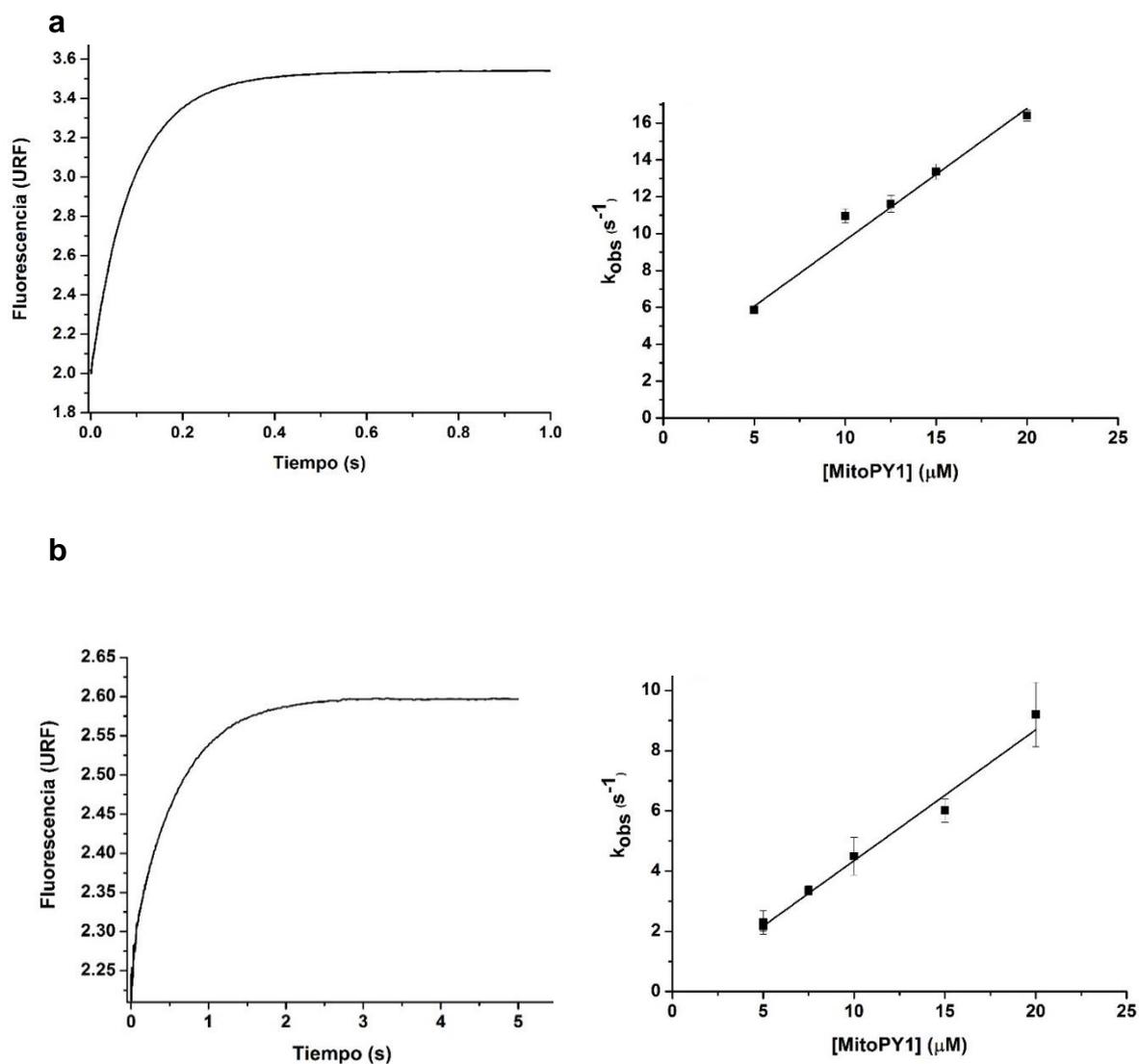


Figura 52. Cinética de la reacción de MitoPY1 con peroxinitrito, determinaciones realizadas a pH 7.4 o pH 7.8 y 25°C.

(a) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de MitoPY1 (10 μM) por peroxinitrito (0.5 μM), registrada en un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped-flow). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de MitoPY1 en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) a 25°C, con excitación a $\lambda_{\text{ex}}=503$ nm y se recoge emisión total.

(b) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de MitoPY1 (2 μM) por peroxinitrito (0.2 μM), registrada en un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped-flow). Panel derecho: efecto de las concentraciones crecientes de MitoPY1 en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7.8, 0.1 mM DTPA) a 25°C, con excitación a $\lambda_{\text{ex}}=503$ nm y se recoge emisión total.

También, intentamos determinar la constante de velocidad de la reacción a 37°C y pH 7.8, condiciones similares a las mitocondriales. Aunque los ajustes no eran tan buenos como 25°C, se pudo estimar una constante de segundo orden de $\sim 0.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabla 13).

Una consideración importante, es que encontramos que la sonda MitoPY1 aumenta la fluorescencia espontáneamente con el tiempo a 37°C, y esto se exagera al aumentar la concentración de la sonda, como muestra la Figura 53. Por lo tanto, los ajustes exponenciales se realizaron a tiempos muy cortos (< 2 s) y bajas concentraciones de MitoPY1.

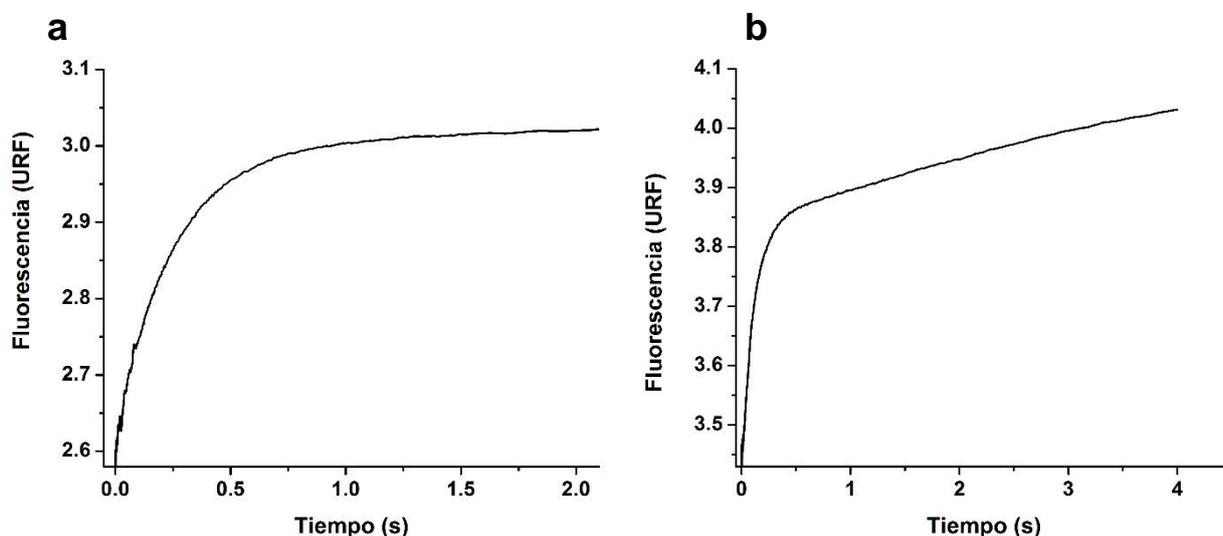


Figura 53. (a) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de MitoPY1 (5 μM) por peroxinitrito (0.5 μM), registrada en un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped-flow). (b) Curso temporal de la emisión de fluorescencia debida a la oxidación de MitoPY1 (10 μM) por peroxinitrito (0.5 μM), registrada en un espectrofotómetro de flujo detenido (stopped-flow). Las determinaciones fueron realizadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7.8, 0.1 mM DTPA) a 37°C, con excitación a $\lambda_{\text{ex}}=503$ nm y se recoge emisión total.

2.2 Ensayo de competencia

Alternativamente, se realizó un análisis cinético por competencia simple, como un método cinético adicional, para la oxidación de MitoPY1 por peroxinitrito en presencia de ácido fenilalanina-4-borónico (FBA)⁷ y se confirmó el valor constante de velocidad a 25°C en el orden de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, como un método indirecto adicional (Figura 54, Tabla 13).

⁷ El FBA (ácido fenilalanina-4-borónico) es un derivado de ácido borónico no fluorescente como un blanco alternativo para peroxinitrito, que reacciona con una $k = 1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (27. Sikora A, Zielonka J, Lopez M, Joseph J, & Kalyanaraman B (2009) Direct oxidation of boronates by peroxynitrite: mechanism and implications in fluorescence imaging of peroxynitrite. *Free Radical Biology and Medicine* 47(10):1401-1407.

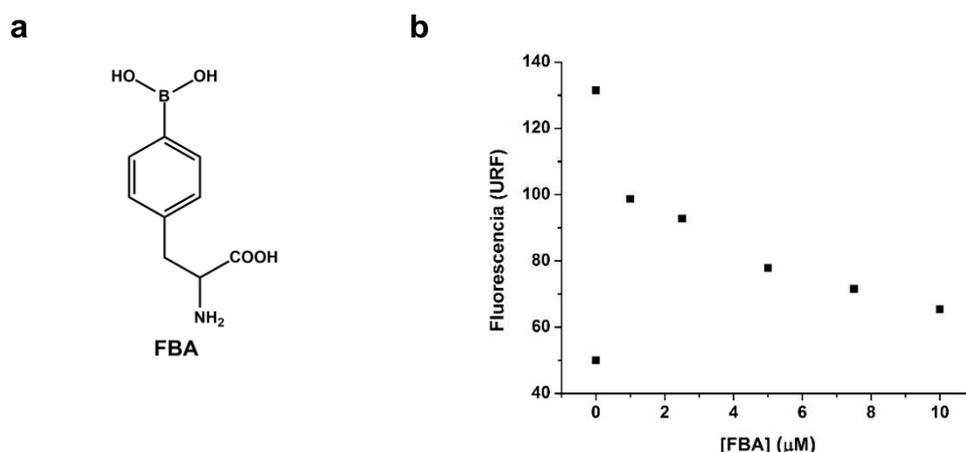


Figura 54. (a) Estructura química de FBA (ácido fenilalanina-4-borónico). (b) Ensayo de competencia. MitoPY1 (10 μM), peroxinitrito (1 μM), en presencia de concentraciones crecientes de FBA (0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 μM). Las reacciones se realizaron en buffer fosfato 100 mM conteniendo DTPA 0.1 mM, pH 7.4, a 25°C. La emisión de fluorescencia de MitoPY1ox ($\lambda_{\text{ex}} = 503$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 538$ nm) se registró en un espectrofluorímetro Jasco FP-8500.

Tabla 13. Constantes cinéticas para la reacción entre peroxinitrito y **MitoPY1** determinadas a 25°C o 37°C y pH 7.4 o pH 7.8, determinado por métodos directos o ensayo de competencia.

Metodología/Condiciones	k ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		
	25°C y pH 7.4	25°C y pH 7.8	37°C y pH 7.8
<i>Directo</i>	$(0.70 \pm 0.04) \times 10^6$	$(0.43 \pm 0.01) \times 10^6$	$(0.80 \pm 0.10) \times 10^6$
<i>Competencia</i>	$(1.0 \pm 0.3) \times 10^6$	ND	ND

ND, no determinado

3. Evaluación de la estabilidad de MitoPY1

Debido a todas las observaciones anteriores sobre aumento de fluorescencia en ausencia de oxidantes, se decidió estudiar la estabilidad de MitoPY1 frente a la exposición al aire (conteniendo 21% de O₂ (g)) y a la luz, a 37°C temperatura, siendo esta temperatura donde se observan cambios más significativos, Figura 55.

Como se muestra en la Figura 55 MitoPY1 sufre de autooxidación, catalizada en presencia de la luz.

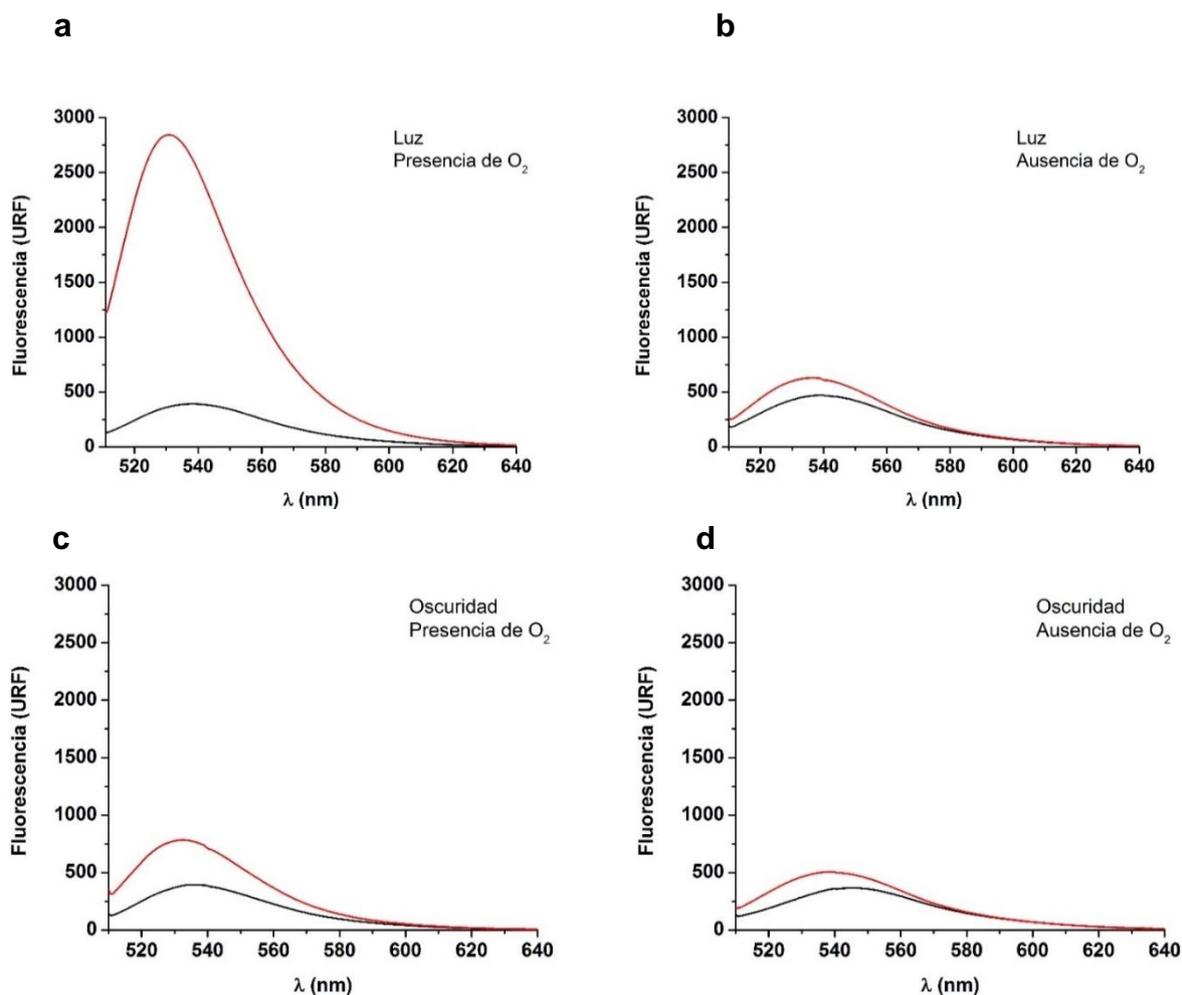


Figura 55. Respuesta de fluorescencia de MitoPY1 en presencia o ausencia de luz y presencia o ausencia de aire. Espectros de fluorescencia de MitoPY1 (5 μ M) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.8, DTPA 0.1 mM) a 37°C. La ausencia de O₂ (g) se generó barboteando Ar (g) en la cubeta del fluorímetro (1 mL) durante 15 minutos. Trazo negro: tiempo 0 min; trazo rojo: 60 min de exposición a las condiciones experimentales en cada caso. La emisión de fluorescencia de MitoPY1ox ($\lambda_{\text{ex}} = 503$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 538$ nm) se registró en un espectrofluorímetro Jasco FP-8500. Sensibilidad manual a 300 V.

Al comparar con la sonda FI-B expuesta a las condiciones donde MitoPY1 presentó mayor autoxidación (presencia de luz y O₂) Figura 56, FI-B no mostró aumentos espontáneos de emisión de fluorescencia en las mismas condiciones, siendo una sonda más estable, sin presentar procesos de autoxidación.

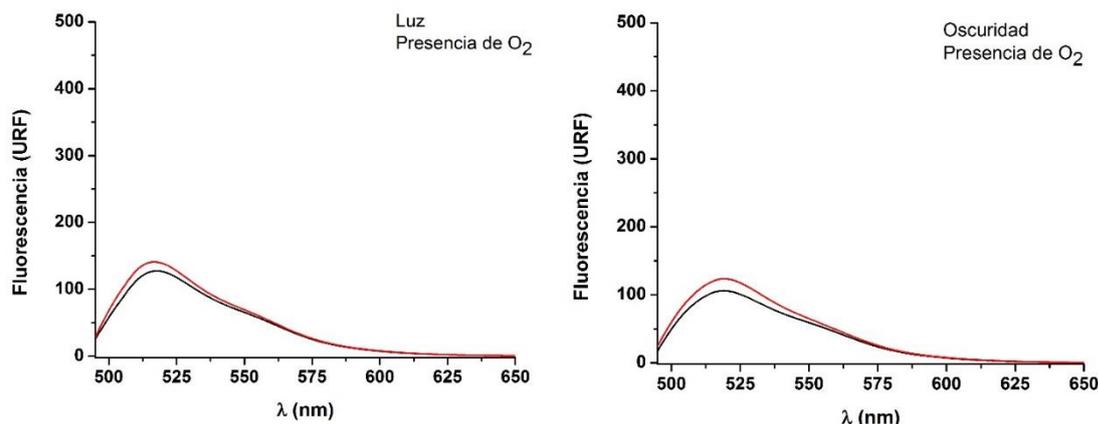


Figura 56. Respuesta de fluorescencia de FI-B en presencia o ausencia de luz y presencia de aire. Espectros de fluorescencia de FI-B (5 μM) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.8, DTPA 0.1 mM) a 37°C. Trazo negro: tiempo 0 min; trazo rojo: 60 min de exposición a las condiciones experimentales en cada caso. La emisión de fluorescencia de FI ($\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$) se registró en un espectrofluorímetro Jasco FP-8500. Sensibilidad manual a 300 V.

Conclusiones parciales

La sonda MitoPY1 previamente reportada y comercialmente disponible para la detección de H_2O_2 mitocondrial, reacciona con peroxinitrito a una alta velocidad debido a su alta constante de velocidad de segundo orden ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Sin embargo, presentó algunos inconvenientes debido a la inestabilidad y autoxidación.

Por lo tanto, a la hora de utilizar MitoPY1 en los diferentes modelos experimentales, es necesario controles apropiados y una cuidadosa interpretación de los resultados.

Como se describió anteriormente en el capítulo 1, sección 1.2, al variar el *scaffold* de la molécula de una fluoresceína a una cumarina modificada como **MitoCT-i** y **MitoCT-ii**, se evitan los problemas de inestabilidad y autoxidación.

Materiales y Métodos

Reactivos

MitoPY1 se adquirió de Sigma-Aldrich (SML0734), y se preparó una solución stock 2 mM en DMSO. Para cada experimento, se realiza una nueva dilución en solución acuosa cada vez antes de su uso.

Análisis cinético de la reacción de MitoPY1 con peroxinitrito

Las determinaciones de las constantes cinéticas de la reacción de MitoPY1 (0, 5, 10, 15, 20, 25 μM) con peroxinitrito (0.5 μM) se llevaron a cabo bajo condiciones de *pseudo*-primer orden (exceso de 10 veces MitoPY1 sobre peroxinitrito). Se realizó la técnica cinética de flujo detenido utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido Applied Photophysics 20MX equipado con fotomultiplicadores para mediciones de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 503 \text{ nm}$; emisión total). Todas las determinaciones se realizaron en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4 o pH 7.8 conteniendo 0.1 mM de DTPA a 25°C o 37°C.

Los cursos temporales de aumento de fluorescencia debido a oxidación de MitoPY1, para cada concentración de sonda se ajustaron a curvas exponenciales simples, obteniendo una constante cinética observada k_{obs} . Las k_{obs} obtenidas de esta manera, se graficaron en función de la concentración de sonda ajustándose a una recta cuya pendiente es la k cinética de la reacción.

Ensayo de Competencia

Además, se realizó un ensayo de competencia para confirmar el valor de la constante de velocidad de la reacción de MitoPY1 con peroxinitrito, como un método cinético adicional (192, 193). En este ensayo de competencia se evaluó la oxidación de MitoPY1 por peroxinitrito en presencia de concentraciones crecientes de FBA (ácido fenilalanina-4-borónico), como un blanco alternativo para peroxinitrito de constante de velocidad de segundo orden conocida (27), según las siguientes ecuaciones:



Las reacciones se realizaron en buffer fosfato 100 mM conteniendo DTPA 0.1 mM, pH 7.4, a 25°C. Las concentraciones de los reactivos fueron peroxinitrito (1 μM), MitoPY1 (10 μM) y FBA (0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 μM). La emisión de fluorescencia de MitoPY1ox ($\lambda_{\text{ex}} = 503 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$) se registró en un espectrofluorímetro Jasco FP-8500.

Debido a que no son condiciones de *pseudo*-primer orden, la constante de velocidad de oxidación de MitoPY1 por peroxinitrito en el ensayo de competencia se calculó usando la Ecuación 26 (192, 193).

$$\frac{k_{FBA}}{k_{MitoPY1}} = \frac{\ln\left(\frac{[FBA]_o}{[FBA]_o - [FOH]_\infty}\right)}{\ln\left(\frac{[MitoPY1]_o}{[MitoPY1]_o - [MitoPY1ox]_\infty}\right)}$$

Ecuación 26

Donde k_{FBA} es la constante de velocidad de la reacción de FBA con peroxinitrito ($k_{FBA}=1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$); $k_{MitoPY1}$ es la constante de velocidad de la reacción de MitoPY1 con peroxinitrito; $[FBA]_o$ y $[FOH]_\infty$ son concentración inicial de FBA y concentración final de FBA oxidado, en cada condición experimental. $[MitoPY1]_o$ y $[MitoPY1ox]_\infty$ son concentración inicial de MitoPY1 y concentración final de MitoPY1 oxidado en cada condición experimental.

Debido a que únicamente $[MitoPY1ox]_\infty$ puede ser determinado por técnicas fluorescentes, ya que FOH no es un producto fluorescente, la siguiente relación estequiométrica se utilizó para cuantificar a $[FOH]$:

$$[\text{ONOO}^-] = [\text{FOH}] + [\text{MitoPY1ox}]$$

Ecuación 27

El valor de la constante de velocidad desconocida ($k_{MitoPY1}$) se calculó como el promedio para cada conjunto de concentraciones iniciales y finales (192, 193).

Capítulo 2

Origen de los átomos de oxígeno en los productos de oxidación de sondas boronadas

2. Origen de los átomos de oxígeno en los productos de oxidación de sondas boronadas

Introducción y estrategia experimental

Los arilboronatos son cinéticamente selectivos para peroxinitrito sobre otros oxidantes nucleofílicos, debido a que reaccionan casi un millón de veces más rápido con este oxidante que con H_2O_2 a pH fisiológico, y ~2500 o ~5500 veces más rápido con peroxinitrito que con HOCl o peroximonocarbonato respectivamente ($k_{\text{ONOO}^-} \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{HOCl}} \sim 400\text{-}600 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{HCO}_4^-} \sim 100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{H}_2\text{O}_2} \sim 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) como ha sido demostrado por nosotros y otros grupos (27, 109, 111). El mecanismo de reacción de boronatos (tanto ácidos como ésteres borónicos) más aceptado implica, un primer paso de adición nucleofílica del oxidante desprotonado ROO^- al átomo de boro electrofílico, generando un aducto aniónico cuaternario que sufre una posterior escisión heterolítica en el enlace peroxilo O-O dando fenoxiboronato, e hidrólisis dando el fenol correspondiente con ~85-99% de rendimiento. Se ha descrito una ruta radicalar secundaria exclusiva de la reacción con ONOO^- , donde el enlace peroxilo se escinde homolíticamente dando $\text{RO}\cdot$ y $\cdot\text{NO}_2$, que se recombinan dando el producto nitrado como producto secundario (173), Esquema 58. Si bien el mecanismo de reacción ha sido estudiado analizando los productos oxidados mediante HPLC (27), identificación de intermedios radicalares mediante EPR y cálculos teóricos DFT (173, 194), el origen del átomo de oxígeno que se incorpora a la molécula no es conocido, pudiendo provenir del propio agente oxidante (ROOH) o del medio de reacción (H_2O). Es fundamental comprender los mecanismos de formación de los productos de oxidación para un mejor entendimiento y utilización de sondas electrofílicas derivadas de boronatos. Esto permite un riguroso análisis del sistema de estudio tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando sondas como moléculas reporteras de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.

En este contexto, nos planteamos como objetivo completar la elucidación del mecanismo de oxidación de ácidos y/o ésteres borónicos con cuatro oxidantes de relevancia biológica, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito ($\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$), peroximonocarbonato (HCO_4^-) y ácido hipocloroso (HOCl). Se analizó el origen de los átomos de oxígeno en los productos de oxidación del ácido borónico oMitoPhB(OH)₂.

Metodología propuesta

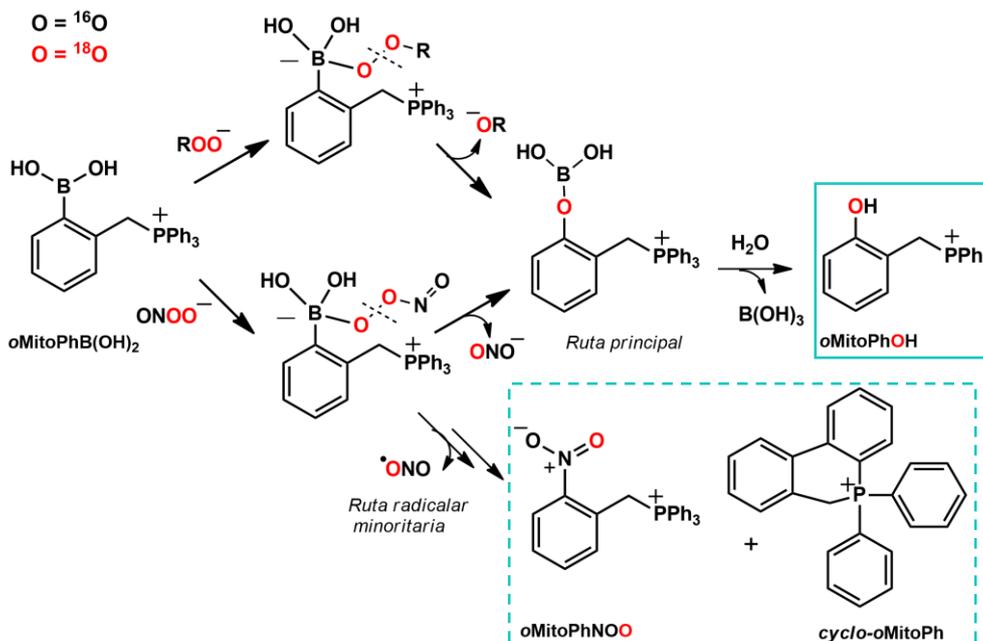
El marcado isotópico es una técnica poderosa en el estudio del mecanismo de las reacciones químicas y enzimáticas. Mediante técnicas analíticas como cromatografía líquida acoplado a espectrómetro de masas (LC-MS) es posible detectar la aparición de productos de reacción marcados isotópicamente con ^{18}O . La estrategia experimental para rastrear el átomo de oxígeno que se incorpora, consiste en la generación de oxidantes marcados con oxígeno-18 (^{18}O , isótopo estable del ^{16}O) y posterior análisis de su incorporación a las sondas, mediante UHPLC-MS/MS.

Haciendo reaccionar boronatos con oxidantes marcados con ^{18}O , como peróxido de hidrógeno marcado ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$), peroxinitrito marcado con ^{18}O ($^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$),

peroximonocarbonato marcado ($\text{HC}^{16}\text{O}_2^{18}\text{O}_2^-$) y ácido hipocloroso marcado (H^{18}OCl) es posible analizar el origen del átomo de oxígeno.

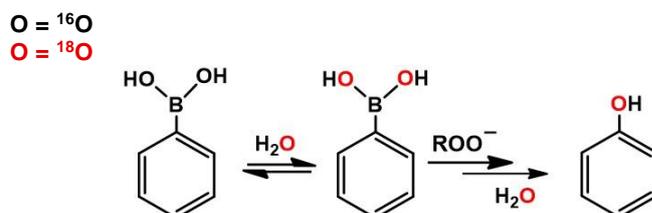
Hasta el momento, el único oxidante marcado con ^{18}O que está disponible comercialmente es $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$, por lo que se planteó el desafío de generar los otros tres oxidantes marcados ya que no están disponible comercialmente.

En este trabajo utilizamos la sonda *o*MitoPhB(OH)₂ (ácido fenilborónico acoplado a trifenilfosfinio), la cual ya ha sido previamente caracterizada para la reacción con H_2O_2 , HOCl y peroxinitrito, Esquema 28 (195, 196).



Esquema 28. Estrategia experimental diseñada. Se analizará el producto mayoritario *o*MitoPhOH (~85 %), y los productos minoritarios nitrado *o*MitoPhNO₂ (~0.5 %) y ciclo-*o*MitoPh (~ 10 %) al hacer reaccionar la sonda *o*MitoPhB(OH)₂ con oxidantes marcados en agua, u oxidantes no marcados en agua marcada (H_2^{18}O). En rojo se representan los átomos de ^{18}O .

También se plantea llevar a cabo las reacciones utilizando H_2^{18}O como disolvente del medio de reacción, en este caso utilizando oxidantes sin marcar. Al usar agua marcada como medio de la reacción se podría dar un primer paso de intercambio isotópico entre los oxígenos del agrupamiento ácido borónico de la sonda con los ^{18}O del H_2^{18}O , y posterior oxidación con el oxidante sin marcar. Sin embargo, el posible intercambio isotópico no afectaría el análisis. En función del producto obtenido, se determinará el origen del átomo de O, Esquema 29. En el caso de que el oxígeno proviniera del agua del medio de reacción se esperaría el fenol marcado.



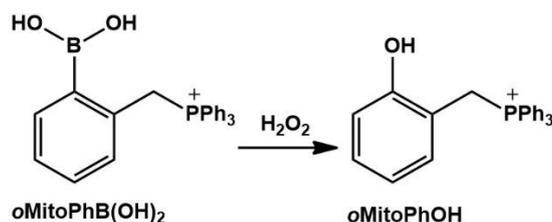
Esquema 29. Oxidación en agua marcada. En rojo se representan los átomos de ^{18}O .

Resultados y Discusión

1. Oxidación de boronatos por peróxido de hidrógeno marcado ($H_2^{18}O_2$): incorporación de ^{18}O en el producto fenólico.

Para monitorear los productos de oxidación de boronatos, elegimos trabajar con la sonda *o*MitoPhB(OH)₂, ya que su reactividad hacia H₂O₂ y peroxinitrito ha sido estudiada en detalle, sus productos caracterizados y la técnica de medida puesta a punto en el Centro de Investigación donde se realizó el trabajo (198-200).

La oxidación de *o*MitoPhB(OH)₂ por H₂O₂ lleva a la formación del correspondiente producto fenólico *o*MitoPhOH (Esquema 31).



Esquema 31. Oxidación de la sonda *o*MitoPhB(OH)₂ por H₂O₂.

Debido a que el producto fenólico no es fluorescente se realizó el análisis utilizando la técnica de cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para su seguimiento y análisis. El H₂O₂ (estrictamente la especie que reacciona es el peróxido de hidrógeno desprotonado, HOO⁻) reacciona con la sonda dando un derivado fenoxiboronato como producto intermedio, que tras hidrólisis se obtiene el producto fenólico y ácido bórico como únicos productos.

Para determinar si el átomo de oxígeno fenólico proviene del H₂O₂ o del agua del medio de la reacción, realizamos la oxidación de *o*MitoPhB(OH)₂ por H₂¹⁶O₂ en H₂¹⁸O y por H₂¹⁸O₂ en H₂¹⁶O (Figura 57).

En presencia de H₂¹⁶O₂ se observa el pico correspondiente al producto *o*MitoPh¹⁶OH con *m/z* = 369, mientras que en presencia de H₂¹⁸O₂ el producto presenta un valor de *m/z* = 371 (Figura 57, panel b), atribuido a *o*MitoPh¹⁸OH. Los análisis mediante LC-MS/MS indicaron que no hay formación de *o*MitoPh¹⁸OH durante la oxidación de la sonda por H₂¹⁶O₂ en H₂¹⁸O, mientras que este último era el producto predominante en presencia de H₂¹⁸O₂ (Figura 57, panel c). Por lo tanto, concluimos que durante la oxidación de los boronatos por H₂O₂, el átomo de oxígeno en el producto fenólico deriva exclusivamente del H₂O₂ y no del agua del medio de la reacción.

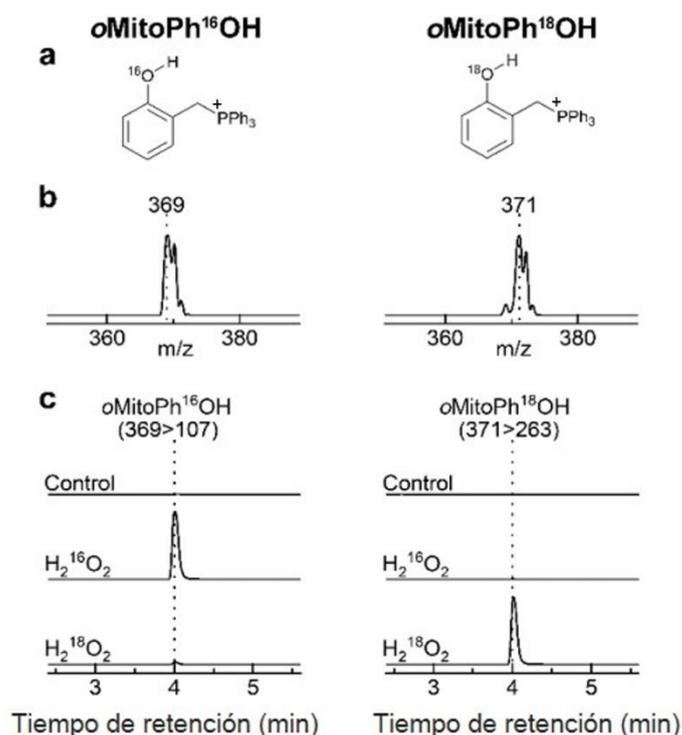


Figura 57. Incorporación de un átomo de oxígeno en el producto fenólico durante la oxidación de *o*MitoPhB(OH)₂ por H₂O₂. (a) Estructuras químicas de los productos; (b) espectro de masas de los productos registrados online; (c) cromatograma LC-MS/MS del producto fenólico *o*MitoPhOH conteniendo ¹⁶O (*panel izquierdo*) u ¹⁸O (*panel derecho*). Los análisis de LC-MS/MS fueron realizados luego de hacer reaccionar a *o*MitoPhB(OH)₂ (20 μM) por 20 min en ausencia del oxidante (control), con H₂¹⁶O₂ (10 mM) en H₂¹⁸O (97%), o con H₂¹⁸O₂ (10 mM) en H₂¹⁶O.

2. Oxidación de boronatos por peroximonocarbonato marcado (HC¹⁶O₂¹⁸O₂⁻)

En presencia de CO₂, el H₂O₂ está en equilibrio ($K = 0.33 \text{ M}^{-1}$ a 25°C) con un oxidante más potente, el peroximonocarbonato (HOOCO₂⁻) (201). Como se describió en el capítulo 1, parte 2, recientemente, se demostró que la velocidad de oxidación de sondas derivadas de boronatos (CBA, CBE y FI-B) por H₂O₂ aumenta con la adición de bicarbonato (202). Por lo tanto, evaluamos si el HCO₄⁻ derivado de H₂O₂, es capaz de incorporar el átomo de oxígeno en la sonda *o*MitoPhB(OH)₂.

Primero, determinamos las condiciones experimentales que nos permitieran detectar una mayor formación de producto fenólico durante la reacción de la sonda con H₂O₂ (50 μM) tras la adición de concentraciones crecientes de NaHCO₃ (0, 25, 50 mM). Efectivamente, la velocidad de formación de producto aumentó con una mayor concentración de NaHCO₃, lo que se observó por monitoreo mediante LC-MS de la acumulación de *o*MitoPhOH durante el tiempo de incubación, Figura 58.

Este efecto se observó para ambos isótopos, H₂¹⁶O₂ y H₂¹⁸O₂, cuando se monitorean los productos fenólicos conteniendo ¹⁶O o ¹⁸O, respectivamente (Figura 58). La incorporación de un átomo de ¹⁸O en el producto fenólico implica el ataque del agrupamiento peroxilo (O-O) del peroximonocarbonato en la reacción sobre el átomo de boro, incorporación de un átomo de oxígeno y eliminación del anión carbonato (CO₃²⁻).

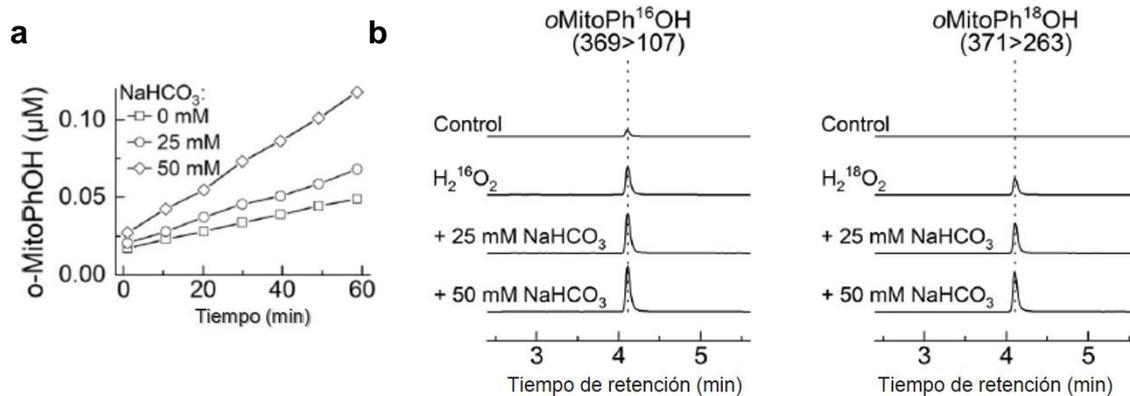


Figura 58. El NaHCO₃ aumenta la oxidación de oMitoPB(OH)₂ por H₂O₂. (a) Formación de oMitoPhOH en ausencia o presencia de NaHCO₃; (b) incorporación de un átomo de oxígeno proveniente de HCO₄⁻ en el producto fenólico. Cromatograma LC-MS/MS del producto fenólico oMitoPhOH conteniendo ¹⁶O (panel izquierdo) u ¹⁸O (panel derecho). Los análisis de LC-MS/MS fueron realizados luego de hacer reaccionar a oMitoPhB(OH)₂ (1 µM) por 1 h en ausencia del oxidante (control), con H₂¹⁶O₂ (50 µM, izquierda), o con H₂¹⁸O₂ (50 µM, derecha), con 0, 25 o 50 mM NaHCO₃. Todas las determinaciones se realizaron en buffer fosfato 100 mM conteniendo 0.1 mM DTPA y ajustándose a un pH final de 7.0.

3. Generación de ácido hipocloroso marcado (H¹⁸OCl) y evidencia de su formación por cloración de hidroetidio.

Los boronatos se oxidan entre 400 a 1000 veces más rápido por HOCl que por H₂O₂ a pH fisiológico (27, 111). El producto de la reacción genera el hidroxilo correspondiente, y en presencia de un exceso de HOCl además se obtiene el producto clorado (196). Para determinar el origen del átomo de oxígeno durante la conversión de oMitoPhB(OH)₂ en oMitoPhOH, se generó H¹⁸OCl, ya que no está disponible comercialmente. El H¹⁶OCl y H¹⁸OCl fueron producidos *in situ* a partir de oxidación de aniones cloruro por H₂¹⁶O₂ o por H₂¹⁸O₂, respectivamente, catalizada por la enzima mieloperoxidasa (MPO).

En primer lugar, para evidenciar la formación de HOCl en nuestro sistema, utilizamos la sonda hidroetidio (HE). Si bien HE es la sonda más utilizada para la detección del radical superóxido como se describe más adelante, en presencia de HOCl se ha identificado el producto clorado en posición 2, rindiendo 2-cloroetidio (2-Cl-E⁺) (197), Figura 59.

La reacción de HE con H¹⁸OCl producido por el sistema H₂¹⁸O₂/KCl/MPO dando 2-Cl-E⁺, coincidió con el pico obtenido al hacer reaccionar HE con HOCl comercial, Figura 62.

Si bien en el producto clorado 2-Cl-E⁺ no hay incorporación de oxígeno, sino de un átomo de cloro, en el cromatograma LC-MS se observaron picos a m/z = 348 (75%) y m/z = 350 (25%), correspondientes a la distribución natural de isótopos de cloro (³⁵Cl 75% y ³⁷Cl 25% de abundancia respectivamente), Figura 59.

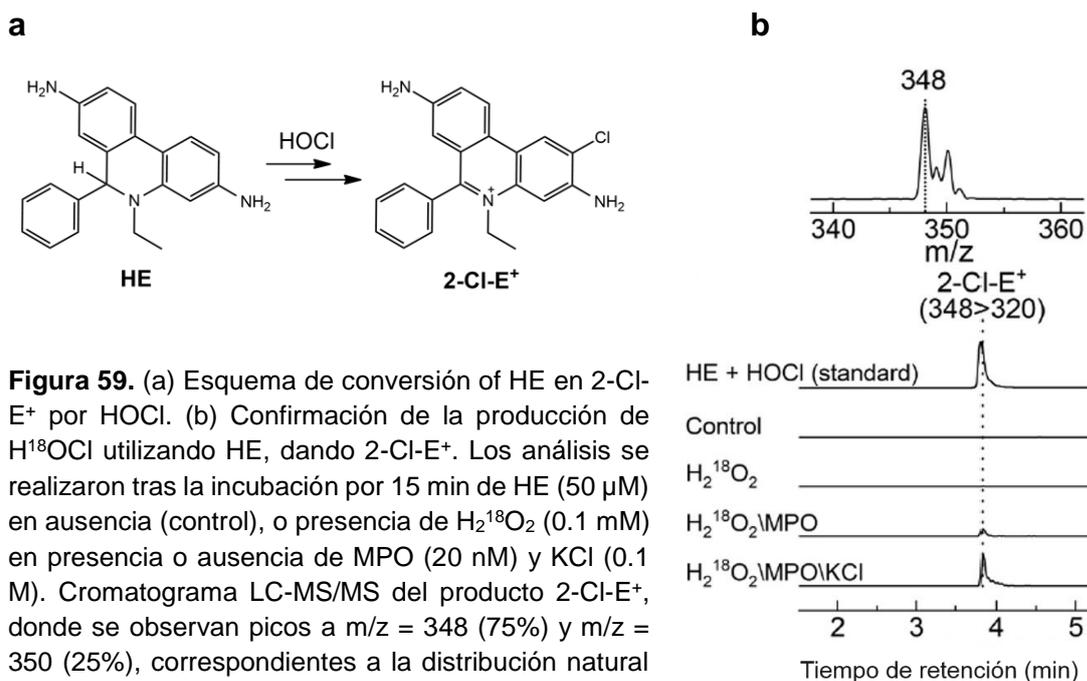


Figura 59. (a) Esquema de conversión of HE en 2-Cl-E⁺ por HOCl. (b) Confirmación de la producción de H¹⁸OCl utilizando HE, dando 2-Cl-E⁺. Los análisis se realizaron tras la incubación por 15 min de HE (50 μM) en ausencia (control), o presencia de H₂¹⁸O₂ (0.1 mM) en presencia o ausencia de MPO (20 nM) y KCl (0.1 M). Cromatograma LC-MS/MS del producto 2-Cl-E⁺, donde se observan picos a m/z = 348 (75%) y m/z = 350 (25%), correspondientes a la distribución natural de isótopos de cloro (³⁵Cl 75% y ³⁷Cl 25% de abundancia). Todas las determinaciones se realizaron en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4, conteniendo 0.1 mM DTPA.

3.1. Oxidación de boronatos por H¹⁸OCl: incorporación de ¹⁸O en el producto fenólico

Una vez optimizada la generación de HOCl mediante la oxidación de aniones cloruro (KCl) por H₂O₂ catalizada por MPO, evidenciado por la formación de 2-Cl-E⁺, continuamos con el análisis del origen del átomo de oxígeno en la sonda oMitoPhB(OH)₂.

Como se observa en el cromatograma de la Figura 60, al incubar oMitoPhB(OH)₂ con el sistema H₂O₂/KCl/MPO hubo un aumento significativo del pico correspondiente al producto fenólico. La ausencia de KCl o MPO resultó en un menor rendimiento del producto. Además, la adición de pequeñas cantidades de dimetilsulfóxido (DMSO), un conocido *scavenger* o atrapador de HOCl (por oxidación del grupo sulfóxido del DMSO a la sulfona correspondiente (163)) condujo a una atenuación significativa de la formación del producto fenólico, Figura 60. Todo lo anterior confirma que HOCl es la especie principal responsable de la oxidación bajo las condiciones ensayadas (Figura 60).

Al reemplazar H₂¹⁶O₂ por H₂¹⁸O₂ en la mezcla de incubación, dió como resultado la obtención de oMitoPh¹⁸OH (Figura 60). En el caso de ambos isótopos, la señal fue máxima en la mezcla que contiene H₂O₂, MPO y KCl y disminuye con la adición de DMSO. Por lo tanto, concluimos que el átomo de oxígeno en el producto de la oxidación de oMitoPhB(OH)₂ por HOCl proviene del oxidante.

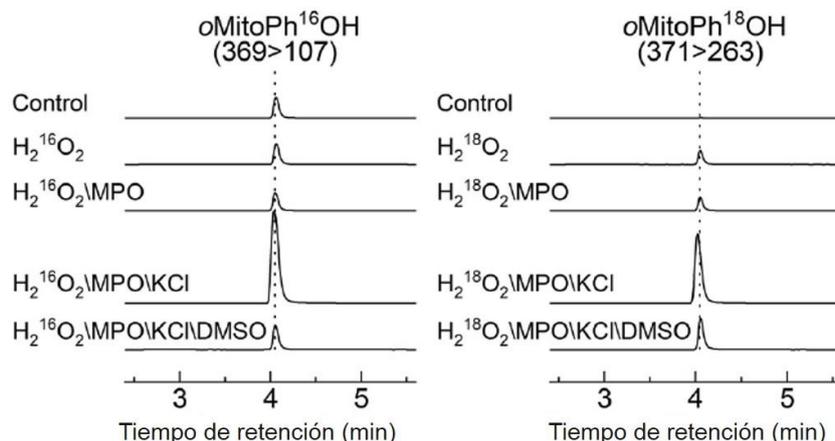
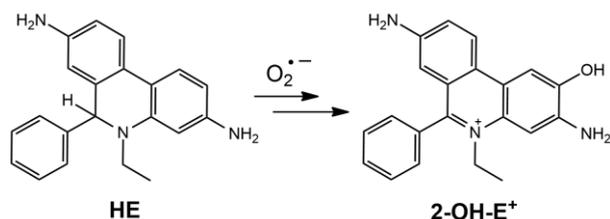


Figura 60. Incorporación de un átomo de oxígeno en el producto fenólico durante la oxidación de *oMitoPhB(OH)₂* por HOCl. Cromatograma LC-MS/MS del producto fenólico *oMitoPhOH* conteniendo ¹⁶O (panel izquierdo) u ¹⁸O (panel derecho). Los análisis de LC-MS/MS fueron realizados luego de hacer reaccionar a *oMitoPhB(OH)₂* (50 μM) por 15 min en ausencia del oxidante (control), con H₂¹⁶O₂ (0.1 mM), o con H₂¹⁸O₂ (0.1 mM) en presencia o ausencia de MPO (20 nM) y KCl (0.1 M). Todas las determinaciones se realizaron en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4, conteniendo 0.1 mM DTPA.

4. Generación de radical superóxido marcado (¹⁸O₂^{•-}) y evidencia de su formación por oxidación de hidroetidio.

Actualmente, el hidroetidio (HE) es la sonda más utilizada para la detección de O₂^{•-} en sistemas biológicos, con aplicación desde cultivos celulares hasta su uso en animales (203, 204). En presencia de O₂^{•-}, HE se oxida a 2-OH-E⁺, un producto característico de la reacción con este radical (Esquema 32) (203, 205-208).



Esquema 32. Conversión of HE en 2-OH-E⁺ por O₂^{•-}.

Se ha propuesto un mecanismo en dos pasos para la conversión de HE a 2-OH-E⁺, que implica la oxidación de HE al radical catiónico HE^{•+}, seguido de la reacción de HE^{•+} con O₂^{•-} para dar 2-OH-E⁺ (203, 209). Datos obtenidos por radiólisis de pulso muestran la formación y la rápida descomposición de HE^{•+} en presencia de O₂^{•-} (210) generado por el pulso, y un aumento en el rendimiento de 2-OH-E⁺ por adición de peroxidasa en la presencia de un flujo constante de O₂^{•-} (209), respaldando el mecanismo propuesto. En este trabajo proporcionamos una prueba directa de la incorporación del átomo de oxígeno de O₂^{•-} durante la oxidación de HE a 2-OH-E⁺.

La oxidación inespecífica de HE genera otro producto fluorescente, etidio (E^+) y productos diméricos (E^+-E^+) no fluorescente, que pueden interferir en la medida si se realizara el seguimiento únicamente por espectroscopía de fluorescencia. Por lo tanto, es importante destacar que los resultados deben verificarse mediante análisis de HPLC para poder discriminar entre 2-OH-E^+ producto de la reacción con superóxido, de E^+ generado por oxidación inespecífica.

Para evidenciar la formación del flujo de superóxido, incubamos HE con $^{16}\text{O}_2^{\cdot-}$ o $^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$ producido durante la oxidación enzimática de hipoxantina (HX) catalizada por la enzima xantina oxidasa (XO) en una atmósfera saturada de $^{16}\text{O}_2$ (g) o de $^{18}\text{O}_2$ (g). Mediante LC-MS/MS se monitorió selectivamente $2\text{-}^{16}\text{OH-E}^+$ y $2\text{-}^{18}\text{OH-E}^+$, Figura 61. En el espectro de masas del producto se observaron valores m/z de 330 y 332 cuando la sonda se incubó con $^{16}\text{O}_2^{\cdot-}$ o $^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$, respectivamente (Figura 61, panel b). El aumento en la masa del producto generado en la reacción con $^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$ es consistente con la incorporación de ^{18}O en la molécula.

Los cromatogramas de LC-MS/MS (Figura 61, panel c) muestran una formación de $2\text{-}^{16}\text{OH-E}^+$ y una formación insignificante de $2\text{-}^{18}\text{OH-E}^+$ en presencia de $^{16}\text{O}_2^{\cdot-}$ (HX/XO/ $^{16}\text{O}_2$) cuando se realizó la reacción en un medio conteniendo 97% de H_2^{18}O . Mientras que en presencia de $^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$ (HX/XO/ $^{18}\text{O}_2$), se observó un pequeño pico de $2\text{-}^{16}\text{OH-E}^+$ y un pico intenso correspondiente a $2\text{-}^{18}\text{OH-E}^+$.

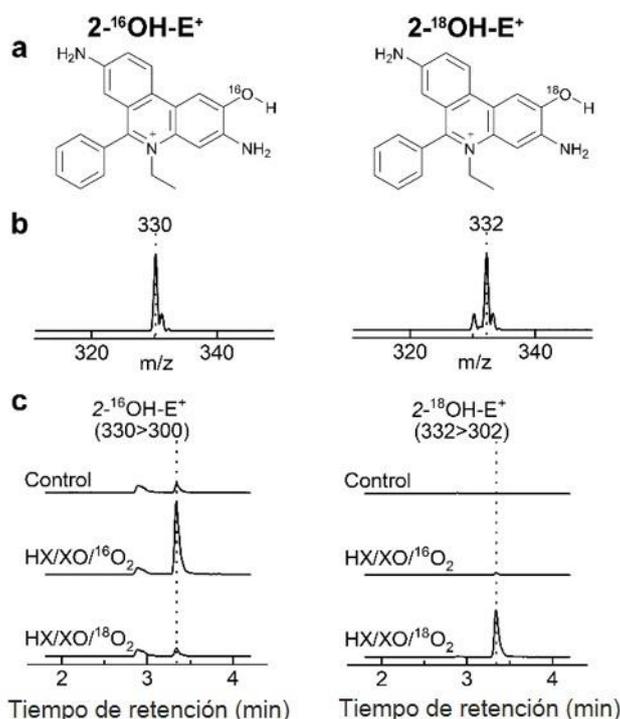
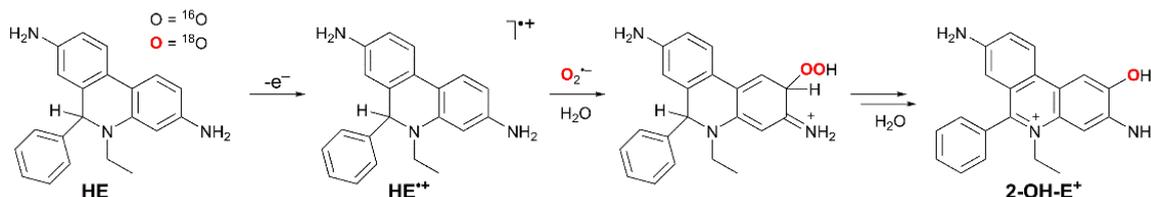


Figura 61. Incorporación de un átomo de oxígeno en el producto hidroxilado 2-OH-E^+ durante la oxidación de HE en presencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$. (a) Estructuras químicas de los productos; (b) espectro de masas de los productos registrados online; (c) cromatograma LC-MS/MS de 2-OH-E^+ conteniendo ^{16}O (panel izquierdo) u ^{18}O (panel derecho). Los análisis de LC-MS/MS fueron realizados luego de hacer reaccionar HE (20 μM) por 30 min, en ausencia del oxidante (control) o presencia de $^{16}\text{O}_2^{\cdot-}$ (0.2 μM $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{min}$, generado a partir de HX/XO y $^{16}\text{O}_2$ (g)) en H_2^{18}O (97%), u $^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$ (0.2 μM $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{min}$, generado a partir de HX/XO y $^{18}\text{O}_2$ (g)) en H_2^{16}O . Todas las muestras disueltas en buffer fosfato (25 mM, pH = 7.4), conteniendo DTPA (0.1 mM), y catalasa (5 kU/mL)

Por lo tanto, fuimos capaces de producir un flujo del superóxido marcado con ^{18}O y además pudimos demostrar por primera vez de manera directa la incorporación de este átomo en el producto de oxidación de HE, 2-OH-E^+ . Los datos obtenidos indican que durante la oxidación e hidroxilación de HE, el átomo de oxígeno en el producto 2-OH-E^+ proviene del $\text{O}_2^{\cdot-}$, consistente con un mecanismo que involucra la reacción de $\text{HE}^{\cdot+}$ con $\text{O}_2^{\cdot-}$ y formación de un hidroperoxilo intermedio (Esquema 33).



Esquema 33. Mecanismo de incorporación del átomo de oxígeno de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en 2-OH-E^+ propuesto durante la oxidación de la sonda de HE.

5. Generación de peroxinitrito marcado ($^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$)

El peroxinitrito marcado ($^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$) debería ser sintetizado ya que tampoco está disponible comercialmente. Una estrategia sintética pudo ser a partir de la reacción de $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ con nitrito de sodio (NaNO_2) en medio ácido (67). Sin embargo, debido al alto costo del $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$, decidimos generarlo *in situ* a partir de flujos de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y superóxido marcado ($^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$).

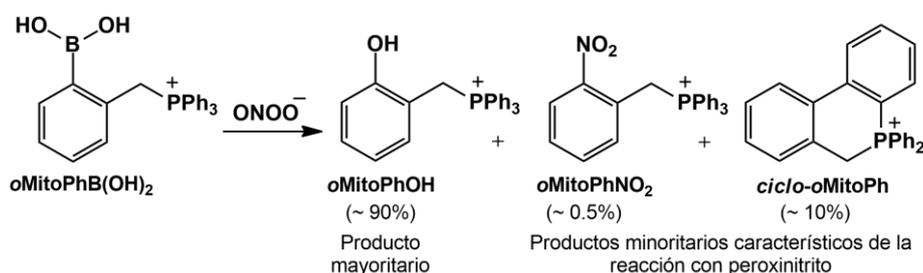
Una vez optimizada la producción de un flujo de $^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$ como se detalló anteriormente, procedimos a sintetizar peroxinitrito marcado para estudiar su reacción con el boronato y así determinar el origen del átomo de O. El $\cdot\text{NO}$ fue producido a partir de la descomposición de dadores de $\cdot\text{NO}$, mientras que el flujo de $^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$ se produjo durante la oxidación de hipoxantina catalizada por la enzima xantin-oxidasa en una atmósfera saturada con $^{18}\text{O}_2$ (g) como se describió anteriormente. La co-generación de $\cdot\text{N}^{16}\text{O}$ y $^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$ conduce a la formación de $^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$.

En este trabajo se exploraron dos dadores de $\cdot\text{NO}$ de la familia de los diolatos de diazenio o NONOatos. Estos compuestos son estables en estado sólido, pero se disocian espontáneamente en un proceso de primer orden dependiente del pH, para liberar 2 moles de $\cdot\text{NO}$ por mol de compuesto, con diferentes vidas medias de descomposición ($t_{1/2}$). Evaluamos un dador de alta velocidad de descomposición como Spermina-NONOato ($t_{1/2} = 230$ min a 25°C , pH 7.4) y otro de menor velocidad de descomposición como DETA-NONOato (dietilentriamina NONOato o NOC-18) $t_{1/2} = 57$ h a 25°C , pH 7.4). (211). Optamos por continuar el estudio utilizando Spermina-NONOato como dador de $\cdot\text{NO}$, ya que con DETA-NONOato de menor velocidad de descomposición se observaron múltiples picos correspondientes a subproductos no deseados.

5.1 Incorporación de ^{18}O en los productos fenólicos y nitrados durante la oxidación de boronatos por peroxinitrito marcado ($^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$)

De manera análoga al peróxido de hidrógeno, el peroxinitrito reacciona con los boronatos dando el correspondiente fenol como producto principal. Sin embargo, la constante de velocidad de la reacción es significativamente más alta ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para ONOO^- y $\sim 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para H_2O_2), y la reacción con peroxinitrito generalmente involucra una vía radicalar minoritaria. Esta vía minoritaria conduce a productos nitrados específicos de la reacción con este oxidante, ya que estos productos no son formados en la reacción con H_2O_2 (212).

En el caso de la oxidación de $\text{oMitoPhB}(\text{OH})_2$ por ONOO^- , los productos minoritarios incluyen *ciclo*- oMitoPh y oMitoPhNO_2 (Esquema 34), formados con rendimientos de 10% y 0.5%, respectivamente (200).



Esquema 34. Estructuras de los productos en la oxidación de la sonda $\text{oMitoPB}(\text{OH})_2$ por peroxinitrito.

Aunque el mecanismo de oxidación de boronatos por peroxinitrito ha sido estudiado tanto experimentalmente como mediante cálculos teóricos (27, 173, 194), no se han realizado estudios de marcaje isotópico hasta el momento. Es así que decidimos completar la elucidación del mecanismo de reacción propuesto, haciendo reaccionar $\text{oMitoPhB}(\text{OH})_2$ con ONOO^- marcado con ^{18}O ($^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$), producido *in situ* a partir de flujos co-generados de $\bullet\text{NO}$ y $^{18}\text{O}_2^{\bullet-}$, y así determinar el origen del átomo de oxígeno en los productos de oxidación y nitración.

El flujo de $\bullet\text{NO}$ se generó a partir de la descomposición espermina-NONOato, mientras que el flujo de $^{18}\text{O}_2^{\bullet-}$ se produjo durante la oxidación de HX catalizada por XO en presencia de $^{18}\text{O}_2$ (g).

La incubación de $\text{oMitoPhB}(\text{OH})_2$ con $^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$ llevó a la formación del producto fenólico principal, con una masa dos unidades mayor ($m/z = 371$), que cuando se hace reaccionar con $^{16}\text{ON}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^-$ ($m/z = 369$, Figura 62, Entrada 4). No se observó formación de $\text{oMitoPh}^{18}\text{OH}$ en presencia de $^{16}\text{ON}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^-$. Además, al realizar la reacción usando H_2^{18}O como medio de reacción no se observó el pico correspondiente al producto $\text{oMitoPh}^{18}\text{OH}$ (Figura 62, Entrada 6). Estos datos indican que la formación del producto fenólico durante la reacción de boronatos con ONOO^- está asociada a la incorporación del átomo de oxígeno de la parte peroxilo del oxidante (O—O).

Respecto a los productos minoritarios, no hubo cambio de masa en el producto cíclico *ciclo*- oMitoPh cuando se utilizó $^{16}\text{ON}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^-$ o $^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$ (Figura 62) ya que no hubo

incorporación de ningún átomo de oxígeno. La intensidad del pico fue similar para $^{16}\text{ON}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^-$ y para $^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$.

Mientras que el producto nitrado oMitoPhNO_2 , se asoció con un aumento en la masa de en dos unidades ($m/z = 400$) en presencia de $^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$ con respecto al producto formado por $^{16}\text{ON}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^-$ ($m/z = 398$). Esto indica que solo un átomo de oxígeno proviene del enlace peroxilo del peroxinitrito marcado. El producto $\text{oMitoPhN}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ únicamente se formó en presencia de $^{16}\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$ (Figura 62), mientras que $\text{oMitoPhN}^{16}\text{O}_2$ fue el producto de la reacción con $^{16}\text{ON}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^-$, incluso cuando la reacción se llevó a cabo en H_2^{18}O como medio de la reacción. (Figura 62). Cabe destacar que todas las muestras analizadas contenían catalasa (5 kU/mL) de manera de descartar cualquier contribución por H_2O_2 a la oxidación de las sondas.

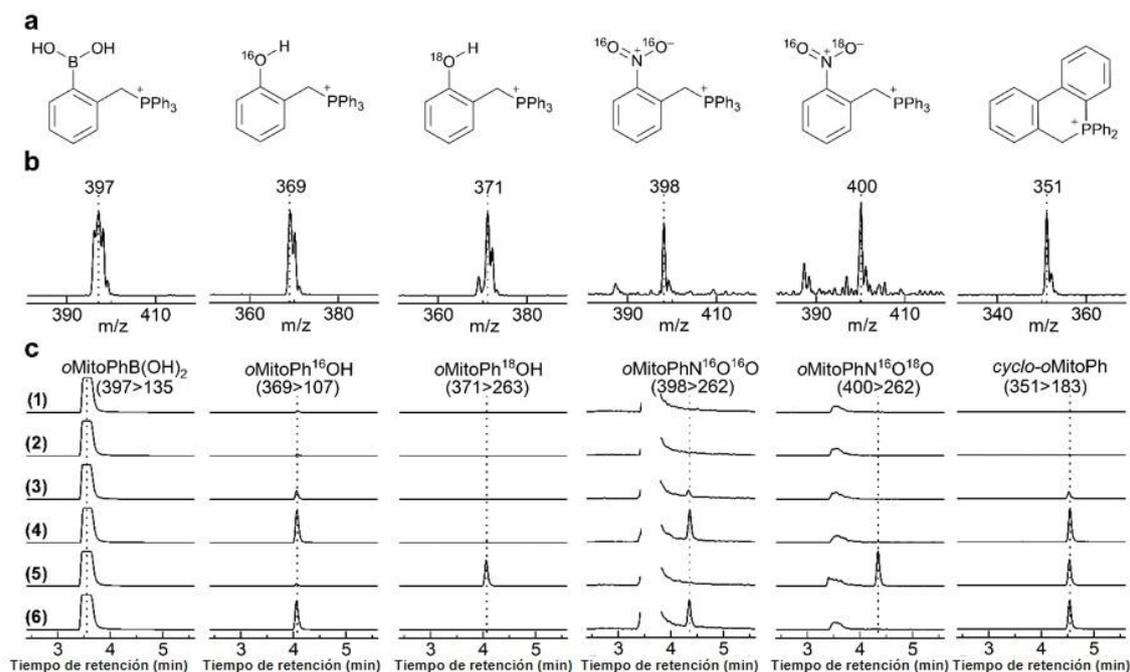


Figura 62. Generación de peroxinitrito e incorporación de oxígeno en el producto fenólico y nitrado durante la oxidación de oMitoPhB(OH)_2 por ONOO^- . (a) Estructuras químicas de los productos; (b) espectro de masas registrados online de los productos; y (c) cromatogramas LC-MS/MS de la sonda y sus productos. Los análisis de LC-MS/MS fueron realizados luego de hacer reaccionar a oMitoPhB(OH)_2 (20 μM) por 30 min en ausencia (1), o (2) presencia de flujos de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (0.2 μM $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{min}$, formado durante la oxidación de HX catalizada por XO en un sistema saturado con O_2), (3) $\cdot\text{NO}$ (0.2 $\mu\text{M}/\text{min}$, formado por la descomposición de spermina-NONOato), (4, 6) $\text{ON}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^-$, (5) $\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$. $\text{ON}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^-$ o $\text{ON}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$ producido por la co-generación de flujos de $\cdot\text{NO}$ y $^{16}\text{O}_2^{\cdot-}$ o $^{18}\text{O}_2^{\cdot-}$. Todas las muestras disueltas en buffer fosfato (25 mM, pH = 7.4), conteniendo DTPA (0.1 mM), y catalasa (5 kU/mL) en H_2^{16}O (muestras 1-5) o en H_2^{18}O (6), en atmósfera saturada con $^{16}\text{O}_2$ (g) (1-4, 6) o $^{18}\text{O}_2$ (g) (5).

Los datos obtenidos sobre la oxidación de oMitoPhB(OH)_2 por peroxinitrito marcado, indican que los átomos de oxígeno introducidos en los productos se originan del oxidante y no del disolvente del medio de la reacción. Estos datos son consistentes con dos vías en el mecanismo de reacción: ruptura heterolítica y ruptura homolítica del enlace peroxilo en el aducto de ONOO^- con el boronato (Esquema 35). La vía principal, que implica una escisión heterolítica, conduce a la formación del producto fenólico, con

el átomo de oxígeno incorporado desde el resto peroxilo del oxidante, similar a la reacción con peróxido de hidrógeno. La vía minoritaria, que implica la escisión homolítica del enlace peroxilo, conduce a la formación de $\bullet\text{NO}_2$ y un radical fenilo, que se recombina para formar un producto nitrobenceno (*o*MitoPhNO₂, Esquema 35). La adición intramolecular del radical fenilo a uno de los fenilos del resto PPh₃⁺ produce el producto cíclico (*ciclo-o*MitoPh), sin incorporar ningún átomo de oxígeno del oxidante.

Conclusiones parciales

En este capítulo, hemos descrito la investigación del origen del átomo de oxígeno en los productos de la reacción del aril-boronato (*o*MitoPhB(OH)₂) con cuatro oxidantes nucleofílicos de relevancia biológica como peróxido de hidrógeno, peroximonocarbonato, ácido hipocloroso y peroxinitrito. Además, trabajamos con la sonda hidroetidio (HE) para evidenciar la producción superóxido marcado y de ácido hipocloroso marcado. Teníamos el desafío de generar tres de estos oxidantes marcados ya que no están disponibles comercialmente. Generamos con éxito H¹⁸OCl a partir de la oxidación de aniones cloruro (KCl) por H₂¹⁸O₂ catalizada por la enzima mieloperoxidasa (MPO), evidenciado por la formación del producto 2-Cl-E⁺, Figura 59. Fuimos capaces de generar radical superóxido marcado (¹⁸O₂^{•-}) a partir de la oxidación de hipoxantina catalizada por la enzima xantina-oxidasa en una atmósfera saturada con ¹⁸O₂ (g) evidenciado por la formación de 2-¹⁸OH-E⁺, Figura 61. También fuimos capaces de producir peroxinitrito marcado (¹⁶ON¹⁸O¹⁸O⁻) a partir de la co-generación de ¹⁸O₂^{•-} y $\bullet\text{NO}$.

Se estudió a nivel atómico el mecanismo de reacción de las sondas con oxidantes marcados generados y así se completa la elucidación del mecanismo de oxidación de aril-boronatos con oxidantes de relevancia biológica. Hasta el momento, este es el primer estudio sobre el mecanismo de la oxidación de las sondas redox derivadas de etidio y boronato usando oxidantes marcados isotópicamente. Existen reportes previos utilizando agua marcada con ¹⁸O para estudiar el mecanismo de oxidación de HE, donde muestran que la reacción de hidroxilación implica la incorporación de oxígeno del oxidante. Sin embargo, este fue un experimento indirecto, con conclusiones basadas sobre la falta de incorporación de un átomo de oxígeno del disolvente (213). Mientras que, en el presente trabajo, utilizamos oxidantes marcados isotópicamente, para demostrar inequívocamente el origen de los átomos de oxígeno en los productos formados.

Respecto a la oxidación de aril-boronatos con oxidantes marcados, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que durante la oxidación de boronatos por oxidantes de relevancia biológica como H₂O₂, HCO₄⁻, HOCl, o ONOO⁻, el átomo de oxígeno en el producto fenólico deriva del oxidante utilizado, y no del agua del medio de la reacción. La incorporación de átomos de oxígeno provenientes del oxidante elimina cualquier tipo de ambigüedad sobre la identidad de la especie que se va a detectar.

La oxidación de aril-boronatos implica una adición nucleofílica del oxidante desprotonado (HOO⁻, ClO⁻, CO₄²⁻, ONOO⁻) sobre el átomo de boro electrofílico dando un intermedio aniónico cuaternario, posterior alargamiento del enlace B—O y ruptura

ruta principal y la ruta radicalar minoritaria de la reacción de *o*MitoPhB(OH)₂ con peroxinitrito. Para oxidantes como HOCl y HCO₄⁻, el mecanismo de reacción es análogo al mostrado para H₂O₂, donde la especie que se adicionaría nucleofílicamente sería ClO⁻ y CO₄²⁻, sobre el átomo de boro, eliminándose como grupo saliente Cl⁻ y CO₃²⁻ respectivamente.

Conocer el mecanismo de reacción completo de sondas moleculares como herramientas reporteras de analitos en sistemas biológicos es fundamental. Con todo lo anterior, junto con un adecuado diseño experimental y modulación farmacológica se tiene una base sólida para asegurar que al utilizar aril-boronatos en la detección de oxidantes nucleofílicos en sistemas biológicos, lo que se está midiendo es efectivamente la especie oxidante de interés y no un artefacto del medio. La incorporación de átomos del oxidante en la sonda elimina cualquier ambigüedad sobre la identidad del oxidante, a diferencia de otras sondas como DCFH₂, Amplex Red, DHR, donde no hay incorporación de átomos del oxidante en el producto formado.

El trabajo descrito en este capítulo fue realizado en el marco de una pasantía de investigación en el Free Radical Research Center del Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos, y dio origen a la publicación de un artículo original en una revista arbitrada como primer autor como se detalla en el apartado Publicaciones.

Materiales y Métodos

Reactivos

La sonda hidroetidio (HE) se adquirió de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Se preparó una solución stock de HE (20 mM) en DMSO bajo atmósfera de argón y se almacena a -80°C. Los patrones de sus productos oxidados fueron sintetizados como se describió previamente (205, 214). *o*MitoPhB(OH)₂ y sus productos de oxidación y nitración fueron sintetizados como se describe previamente (198-200). Se preparó una solución stock de *o*MitoPhB(OH)₂ (0.1 M) en DMSO y se almacena a -20°C.

En los experimentos con HOCl, ambas sondas HE y *o*MitoPhB(OH)₂ se disolvieron en etanol absoluto para evitar la oxidación del DMSO por HOCl (162, 163).

H₂¹⁸O (97% O-18), H₂¹⁸O₂ (90% O-18), ¹⁸O₂ (g) (97% O-18), hipoxantina (HX), xantina oxidasa (XO), superóxido dismutasa (SOD), y catalasa fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). MPO se adquirió de Calbiochem.

1. Determinación del flujo de O₂^{•-}

El radical superóxido se generó a partir de la oxidación de hipoxantina (HX) catalizada por la enzima xantina oxidasa (XO) en buffer fosfato 25 mM, pH 7.4 conteniendo DTPA 0.1 mM. El flujo de O₂^{•-} se determinó siguiendo la de reducción de citocromo c (Fe⁺³) mediante aumento en la absorbancia a 550 nm ($\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante 2 h. La adición de superóxido-dismutasa (SOD) inhibió la reducción del citocromo c. (215)

2. Determinación del flujo de •NO

El óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) se generó a partir de la descomposición en solución acuosa del NONOato correspondiente en buffer fosfato (25 mM, pH = 7.4) conteniendo DTPA 0.1 mM. El flujo de $\bullet\text{NO}$ se determinó a partir de la velocidad de descomposición del NONOato, siguiendo la disminución en la absorbancia a 252 nm ($\epsilon = 8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). En los cálculos se considera la liberación de dos moles de $\bullet\text{NO}$ por cada mol de NONOato consumido (110, 216).

3. Oxidación de hidroetidio (HE) por $\text{O}_2^{\bullet-}$

La conversión de HE en 2-hidroetidio (2-OH-E⁺) se estudió por reacción de HE (20 μM) con HX (200 μM) y XO (0.1 mU/mL, 0.2 $\mu\text{M}/\text{min}$) en una solución de buffer fosfato 25 mM, pH = 7.4) que contiene DTPA 0.1 mM y catalasa 5 kU/mL, saturada con O_2 (g). Para esto las soluciones stock de todos los componentes fueron previamente desoxigenadas mediante barboteo de Ar (g). Luego en cámara hipóxica se mezclaron los componentes de la reacción (volumen final: 200 μL). La reacción se inicia con el pasaje de O_2 (g) ($^{16}\text{O}_2$ o $^{18}\text{O}_2$) a través de la solución durante 10 minutos, seguido de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Para detener la reacción, se añadió SOD (concentración final: 0.1 mg/mL) e inmediatamente se analiza por LC-MS/MS. La adición de SOD al comienzo de la incubación inhibe completamente la formación de 2-OH-E⁺.

Al realizarse la oxidación con $^{16}\text{O}_2^{\bullet-}$ se utilizó agua marcada como el medio de reacción (H_2^{18}O 97% vol.).

4. Cloración de HE por HOCl

La reacción de HE con H^{18}OCl para dar 2-cloroetidio (2-Cl-E⁺), se estudió al hacer reaccionar HE (50 μM , disuelta en EtOH), con una mezcla conteniendo $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (0.1 mM), KCl (0.1 M) y MPO (20 nM) por 15 minutos a 25°C en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4.

5. Oxidación de oMitoPhB(OH)₂ por H_2O_2

Se hizo reaccionar oMitoPhB(OH)₂ (20 μM) con $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ comercial (10 mM) en buffer fosfato 25 mM, pH 7.4 conteniendo 0.1 mM DTPA por 20 minutos. La reacción con H_2O_2 (10 mM) se llevó a cabo en agua marcada (H_2^{18}O 97% vol.).

6. Oxidación de oMitoPhB(OH)₂ por HCO_4^-

Se hizo reaccionar a oMitoPhB(OH)₂ (1 μM) con $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (50 μM) en presencia de NaHCO_3 (25 y 50 mM), en buffer fosfato 100 mM conteniendo 0.1 mM DTPA, se ajusta el pH a 7.0. Para maximizar la participación de HCO_4^- en la oxidación de la sonda, la concentración de la sonda se redujo al mínimo.

7. Oxidación de oMitoPhB(OH)₂ por HOCl

Se hizo reaccionar a oMitoPhB(OH)₂ (50 μM , disuelta en EtOH), con una mezcla $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (0.1 mM), KCl (0.1 M) y MPO (20 nM) por 15 minutos a 25°C en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4. Cuando se indica el DMSO se agregó 0.2 % v/v para atrapar al HOCl.

8. Oxidación de oMitoPhB(OH)₂ por peroxinitrito

Para hacer reaccionar a $o\text{MitoPhB}(\text{OH})_2$ con peroxinitrito generado *in situ*, se incubó $o\text{MitoPhB}(\text{OH})_2$ (20 μM) con espermina-NONOato (200 μM , 0.2 $\mu\text{M}/\text{min}$ de $\bullet\text{NO}$), HX (200 μM) y XO (0.1 mU/mL, 0.2 $\mu\text{M}/\text{min}$ de $\text{O}_2^{\bullet-}$) en buffer fosfato (25 mM, pH = 7.4) conteniendo DTPA 0.1 mM y 5 kU/mL de catalasa, en un sistema saturado con O_2 (g). Para esto las soluciones stock de todos los componentes fueron previamente desoxigenadas mediante barboteo de Ar (g). Luego en cámara hipóxica se mezclaron los componentes de la reacción (volumen final: 200 μL). La reacción se inicia con el pasaje de O_2 (g) ($^{16}\text{O}_2$ o $^{18}\text{O}_2$) a través de la solución durante 10 minutos, seguido de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente.

La reacción con peroxinitrito sin marcar se realizó en H_2^{18}O 97% vol. como medio de la reacción.

9. Análisis de los productos de oxidación de HE por LC-MS/MS

La detección de los productos de oxidación del HE, incluyendo el 2-OH-E⁺ y 2-Cl-E⁺ se realizó mediante UHPLC Shimadzu Nexera2 equipado con detectores de absorción UV-Vis y detectores de espectrometría de masas LC-MS8030 (Columbia, MD, USA). La mezcla de reacción se inyecta en una columna Raptor Biphenyl (Restek, 100 mm X 2.1 mm, 2.7 μm) equilibrada con fase móvil (90% H_2O , 10% CH_3CN , conteniendo 0.1% ácido fórmico). Los productos fueron eluidos aumentando la fracción orgánica de la fase móvil (CH_3CN) de 10% a 65% en un período de 4.5 min a un flujo de 0.4 mL/min. Detección mediante escaneo continuo del espectro del eluido, así como detección de productos específicos de oxidación mediante el modo MRM (Multiple Reaction Monitoring). Las transiciones MRM para 2-Cl-E⁺, 2- ^{16}OH -E⁺ and 2- ^{18}OH -E⁺ fueron 348>320, 330>300 y 332>302, respectivamente. Las transiciones MRM para otros productos de oxidación fueron las reportadas previamente (217-220).

10. Análisis de los productos de oxidación de $o\text{MitoPhB}(\text{OH})_2$ por LC-MS/MS

Los productos de oxidación de $o\text{MitoPhB}(\text{OH})_2$ fueron analizados mediante UHPLC Shimadzu Nexera2 equipado con detectores de absorción UV-Vis y detectores de espectrometría de masas LC-MS8030 (Columbia, MD, USA). La mezcla de reacción se inyecta en una columna Raptor Biphenyl (Restek, 100 mm X 2.1 mm, 2.7 μm) equilibrada con fase móvil 80% H_2O , 20% CH_3CN , conteniendo 0.1% ácido fórmico). Los productos fueron eluidos aumentando la fracción orgánica de la fase móvil (CH_3CN) de 20% a 60% en un período de 5.5 min a un flujo de 0.5 mL/min. Detección mediante escaneo continuo del espectro del eluido, así como detección de productos específicos de oxidación mediante el modo MRM (Multiple Reaction Monitoring). Las transiciones MRM fueron las siguientes: 397>135 para $o\text{MitoPhB}(\text{OH})_2$, 369>107 para $o\text{MitoPh}^{16}\text{OH}$, 371>263 para $o\text{MitoPh}^{18}\text{OH}$, 398>262 para $o\text{MitoPhN}^{16}\text{O}_2$, 400>262 para $o\text{MitoPhN}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, y 351>183 para *ciclo*- $o\text{MitoPh}$. Las transiciones MRM para otros productos de oxidación fueron las reportadas previamente (199, 200, 218).

Capítulo 3

Diseño y síntesis de nuevos compuestos derivados de boronatos de tocoferoles y análogos para la modulación del daño nitrooxidativo

El trabajo descrito en este capítulo fue codirigido con el Dr. Gonzalo Peluffo.

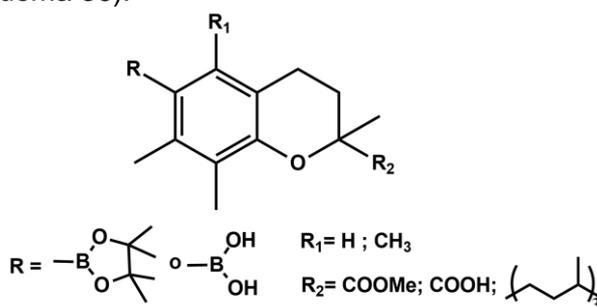
3. Diseño y síntesis de nuevos compuestos derivados de boronatos de tocoferoles y análogos para la modulación del daño nitroxidativo

Introducción y estrategia experimental

Hemos demostrado que los ésteres borónicos reaccionan rápida ($k \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y estequiométricamente con peroxinitrito dando el correspondiente compuesto hidroxilado como el producto principal (111, 221). Esta propiedad puede ser utilizada para el diseño de una nueva clase de compuestos con una mejor capacidad antioxidante que actúen previniendo o modulando el daño nitroxidativo, permitiendo el estudio y tratamiento de disfunciones redox. En este sentido, se trabajó en el desarrollo y aplicaciones de nuevos compuestos basados en sustitución borónica para la detoxificación de peroxinitrito. Si bien la vitamina E es uno de los principales antioxidantes liposolubles del organismo, los resultados negativos de los ensayos clínicos sobre la suplementación con α -tocoferol son motivo de debate (124). Sin embargo, varios autores reportan la capacidad del γ -tocoferol en atrapar radicales $\bullet\text{NO}_2$ dando 5-nitro- γ -tocoferol (132), y además se ha visto que es capaz de reaccionar con este radical en fase lipídica dando $\bullet\text{NO}$ (133), lo que sugiere un posible rol del γ -tocoferol en la detoxificación de especies derivadas del nitrógeno con alta capacidad nitrante. Esta capacidad del γ -tocoferol a diferencia del α -tocoferol, es debida a la estructura química del primero donde la posición 5 de anillo cromano está libre a diferencia del α -tocoferol donde está ocupada por un metilo. En este capítulo se describe la generación de análogos del γ -tocoferol soportando el agrupamiento éster borónico, y también análogos del α -tocoferol para comparar sus propiedades antioxidantes. Las nuevas moléculas serían capaces de reaccionar con peroxinitrito, disminuyendo el estrés nitroxidativo y a la vez, liberando al medio derivados de tocoferoles, como protección antioxidante adicional.

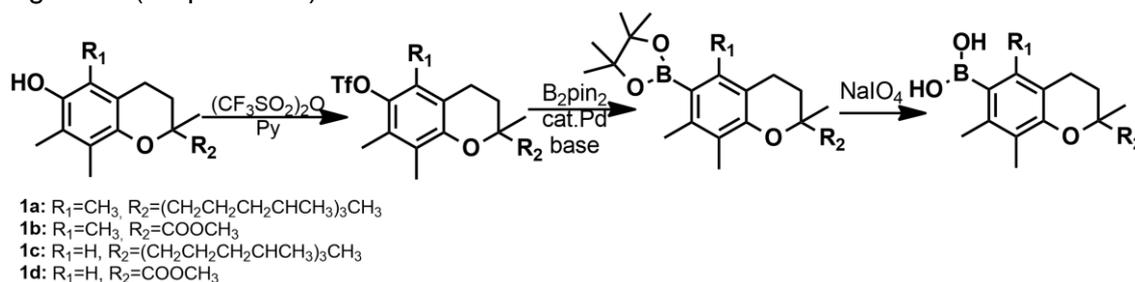
Metodología propuesta

1. Se propone trabajar en el diseño, síntesis y caracterización espectroscópica de derivados boronados de α y γ -tocoferol y sus análogos de cadena corta y análogos hidrosolubles. (Esquema 36).



Esquema 36. Derivados boronados de α y γ -tocoferol y sus análogos hidrosolubles.

La ruta sintética general diseñada para la obtención de los compuestos de interés es la siguiente (Esquema 37):



Esquema 37. Ruta sintética general para la obtención de arilboronatos.

Brevemente, para la preparación de los derivados arilboronatos se genera inicialmente el derivado correspondiente trifluorometanosulfonato. Posteriormente, este derivado es tratado con *bis*(pinacolato)diboro en presencia de catalizador de Pd y base, en un disolvente adecuado (reacción de borilación de Suzuki-Miyaura) para formar el correspondiente éster de ácido borónico, el cual es transformado en el respectivo ácido borónico mediante ruptura oxidativa con NaIO₄.

2. Evaluación de los nuevos compuestos borónicos en la modulación del daño nitrooxidativo *in vitro* (en sistemas modelos de membrana) y sistemas celulares (células endoteliales disfuncionales). Se plantea evaluar la capacidad de los derivados boronados de tocoferoles y análogos de disminuir la generación de 3-NO₂-BTBE y 3,3'-diBTBE como huellas de daño nitrooxidativo en sistemas hidrofóbicos.

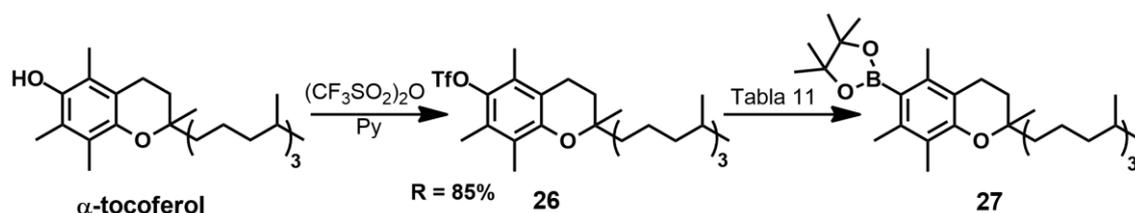
Resultados y Discusión

1. Diseño y síntesis de derivados boronados de tocoferoles

1. Síntesis del éster borónico de α -tocoferol

La primera etapa en la síntesis del éster borónico del α -tocoferol, involucra la incorporación del grupo funcional trifluorometansulfonato en posición 6 del anillo cromano, Esquema 38. Para ello, se hace reaccionar al α -tocoferol comercial con anhídrido trifluorometansulfónico en presencia de piridina obteniéndose el derivado correspondiente **26**, con muy buen rendimiento (R = 85%) (222).

Posteriormente, este derivado es tratado con *bis*(pinacolato)diboro en presencia de catalizador de Pd y base en un disolvente adecuado según la reacción de borilación de Suzuki-Miyaura. En la Tabla 14 se muestra un resumen de las condiciones de reacción ensayadas.



Esquema 38

Tabla 14. Condiciones de reacción ensayadas para la borilación del éster borónico del α -tocoferol **27**.

Entrada	Reactivos	Disolvente	Calentamiento/ tiempo	Observaciones	Ref.
1	1.15 eq B ₂ pin ₂ 1.5 eq KOAc Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ 1.15 eq B ₂ pin ₂	Dioxano	80-85°C 8h y 30min T.A. 12 h	Se recupera 80% del reactivo 26 sin reaccionar	(223)
2	1.5 eq KOAc Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂	DMF	Δ , 11 h T.A. 9 h	No hay reacción	(223)**
3	1.15eq B ₂ pin ₂ 1.5eq KOAc Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂	Dioxano	MW P=300W t= 1 h T ~ 60°C	No hay reacción	(134)**
4	1.1 eq B ₂ pin ₂ 3 eq KOAc Pd(dppf)Cl ₂ dppf	Dioxano	MW P=200-300W t= 1h T=80°C	No hay reacción	(134)
5	1.1 eq B ₂ pin ₂ 2 eq KOAc triciclohexilfosfina Pd(OAc) ₂	CH ₃ CN	Δ , 15 h T.A. 12 h	Se obtiene 27 R< 1%	(*)
6	1.1 eq B ₂ pin ₂ 2 eq KOAc triciclohexilfosfina Pd(OAc) ₂	CH ₃ CN	MW P=200-300W t= 30 min T= 80°C	No hay reacción	(*)
7	1.1eq B ₂ pin ₂ 2 eq KOAc triciclohexilfosfina Pd(OAc) ₂	Dioxano	80°C 13 h Δ , 16 h MW: P=200- 300W; t=1h; T= 80-120°C	A las 16h de Δ se agrega una nueva porción de catalizadores No hay reacción	(*)**

(*) Patente WO2009/048864PCT/US2008/079042

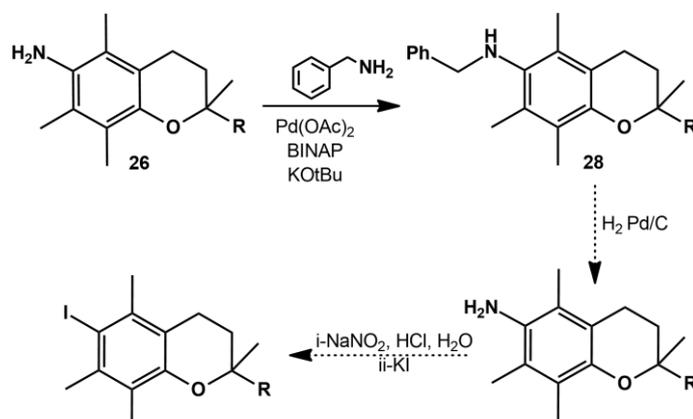
(**) Con modificaciones

Como se describe en la Tabla 14, no fue posible obtener el éster borónico del α -tocoferol **27** con un rendimiento aceptable, a pesar de que se ensayaron varias condiciones de borilación cambiando disolventes, tiempo de reacción, forma de calentamiento y catalizadores. Sin embargo, en las condiciones detalladas en la Entrada 5, se observó una pequeña mancha en la TLC, la cual no coincidía con ningún reactivo, por lo que se decide aislarla. Luego de una purificación por cromatografía en columna y

posteriormente una TLC preparativa se pudo aislar ~ 1 mg el cual fue caracterizado por espectrometría de masas, revelando que era el compuesto de interés. En estas condiciones el rendimiento fue sumamente bajo $R < 1\%$. Se intentó aumentar el rendimiento modificando el disolvente de la reacción ya que el triflato de α -tocoferol **26** es mas soluble en dioxano que en acetonitrilo, o modificar tiempo y forma de calentamiento (Entradas 6 y 7), pero lamentablemente tampoco fue posible obtener el éster borónico del α -tocoferol **27**.

Miyaura y colaboradores sostienen que el acoplamiento con triflatos a veces podría no proceder debido a la descomposición de los catalizadores, precipitando paladio elemental en una etapa temprana de la reacción (136). Según estos autores la adición de 1 equivalente de LiBr o KBr podría ser efectivo previniendo la descomposición del catalizador. Sin embargo, esta hipótesis puede no ser relevante dado el éxito en la borilación bajo las condiciones de Suzuki-Miyaura en los derivados boronados de cumarinas (CBE, CBA capítulo 1, parte 1) y derivados boronados de fluoresceína (FI-B capítulo 1, parte 2).

Se intentó buscar una ruta sintética alternativa, en donde se podría sustituir el agrupamiento triflato del α -tocoferol por iodo, el cual según Miyaura y colaboradores es el más reactivo en el paso limitante de la reacción. De esta manera, para la preparación del ioduro de arilo se hizo reaccionar en primera instancia el triflato **26** con bencilamina para dar **28** y posterior hidrogenación. Una vez obtenida la amina aromática primaria obtener la sal de arildiazonio con nitrito de sodio en medio ácido acuoso, para finalmente hacer reaccionar esta sal con ioduro de potasio, obteniendo así el ioduro de arilo, Esquema 39.



Esquema 39

Sin embargo, esta ruta no se pudo completar debido a que la bencilación para obtener **28** fue difícil desde el punto de vista práctico y el producto se obtuvo en muy bajo rendimiento y sumamente impuro.

Una causa posible de que no se haya dado la reacción de borilación podría ser por impedimento estérico, ya que el agrupamiento triflato es voluminoso y tiene dos metilos en posición *orto* en el α -tocoferol, además el boronato también es un agrupamiento voluminoso.

Otra causa posible, desde el punto de vista del impedimento estérico, es la larga cola alifática isoprenoide de 13 átomos de carbono, la cual podría plegarse alrededor del anillo cromano como describe el modelo de la Figura 63, de manera que dificulte el

acceso al grupo triflato. Para evaluar esta hipótesis se realizó la reacción con un análogo de cadena corta, Trolox®.

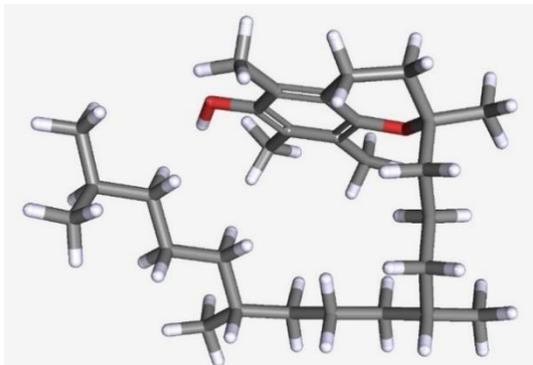
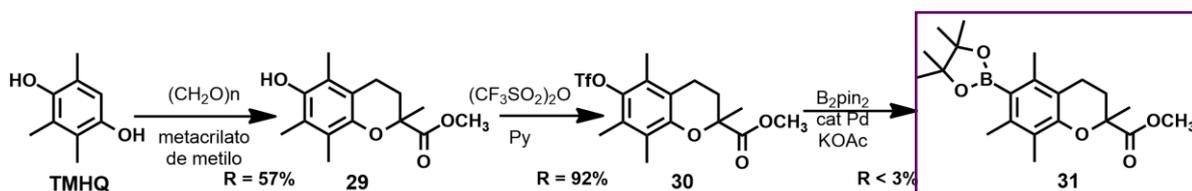


Figura 63. Modelo de la estructura del α -tocoferol en la disposición espacial más estable, obtenido de National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=14985, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14985>

2. Síntesis del éster borónico del éster metílico de Trolox®

Para estudiar este último efecto se realizó la misma ruta sintética, pero con el análogo de cadena corta, el éster metílico del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxílico (Trolox®) **29**, el cual sustituye la cola isoprenoide de 13 C por un éster metílico, (Esquema 40).



Esquema 40. Ruta sintética para la obtención del éster metílico de Trolox boronado **31**.

Primeramente, se sintetizó el éster metílico de Trolox® **29** a partir trimetilhidroquinona (TMHQ) y metacrilato de metilo en un reactor a alta presión, con rendimiento aceptable ($R = 57\%$) (224). A continuación, se hizo reaccionar con anhídrido trifluorometansulfónico, generándose el correspondiente producto **30** con el grupo trifluorometansulfonato en posición 6, con excelente rendimiento ($R = 92\%$). Posterior borilación con *bis*(pinacolato)diboro en medio básico y catalizador de Pd rindió el derivado boronado del éster metílico de Trolox **31** con muy bajo rendimiento ($R < 3\%$). Esto sugiere que la larga cadena alifática no influiría en la reacción, sino que posiblemente, no se estaría dando debido al impedimento estérico de los metilos adyacentes.

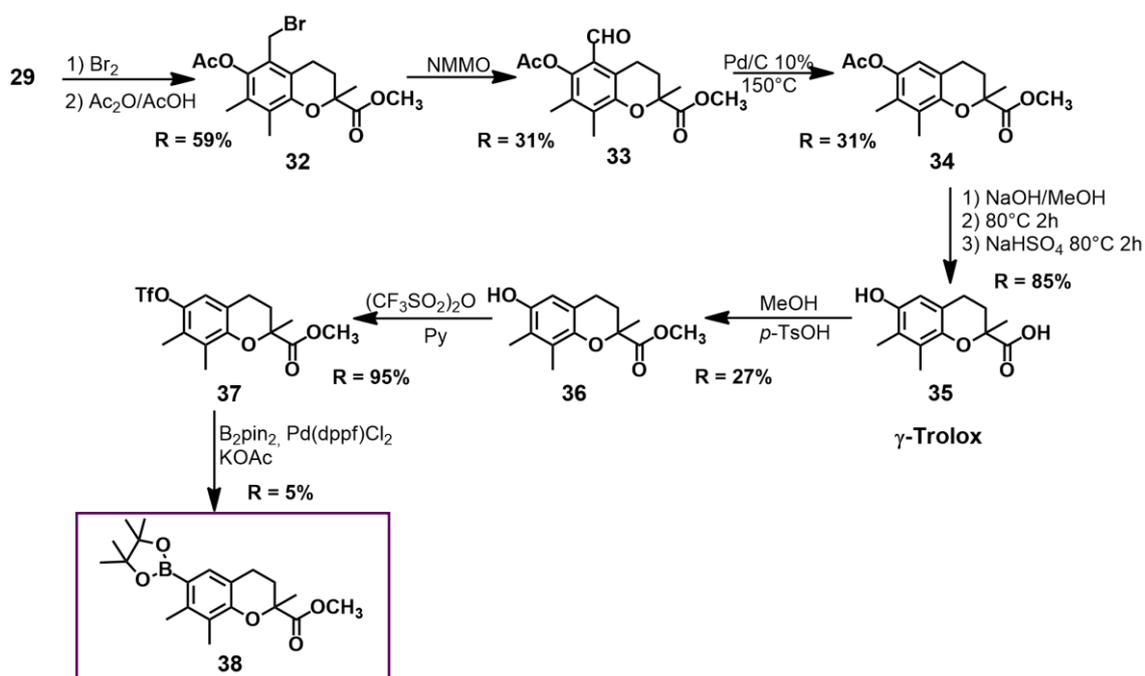
Para intentar resolver los problemas sintéticos, trabajamos a continuación en un nuevo derivado contemplando los dos posibles impedimentos estéricos: los metilos adyacentes y la cola isoprenoide.

Por lo tanto, se diseña una nueva estructura careciendo del metilo en posición 5 adyacente a la posición 6 donde se incorpora el agrupamiento triflato, y además sin la cola isoprenoide (trabajando con el análogo de cadena corta).

Además, como se explicaba anteriormente, la posición sin sustituir en el C5 da la posibilidad de ser sustituida por especies nitrantes, lo que le da la propiedad de actuar como atrapador de especies reactivas del nitrógeno como $\bullet\text{NO}_2$.

3. Síntesis del éster borónico del γ -Trolox

A continuación, se muestra la ruta de sintética diseñada para la obtención del éster borónico del análogo de cadena corta del γ -tocoferol **38**, la cual involucra una desmetilación selectiva del éster metílico de Trolox, Esquema 41.



Esquema 41.

Se hizo reaccionar en una primera etapa el éster metílico de Trolox **29**, sintetizado previamente (Esquema 41), con una solución de bromo (Br_2) en diclorometano y posteriormente con anhídrido acético para evitar la dimerización, obteniéndose el bromoacetato **32** con buen rendimiento ($R = 59\%$). Una posterior oxidación con *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (NMMO) en acetonitrilo generó el producto **33** con moderado rendimiento ($R = 31\%$). Se sometió a este producto a una descarbonilación con catalizador Pd/C 10% a alta temperatura obteniéndose el producto **34** ($R = 31\%$) (225). Luego se llevó a cabo la hidrólisis de los grupos éster para dar el ácido 6-hidroxi 2,7,8-trimetilcroman carboxílico (**35**, γ -Trolox) con muy buen rendimiento ($R = 85\%$) (224). A continuación, se ensayó la incorporación del agrupamiento trifluorometansulfonato en posición 6 sin protección del ácido carboxílico sin éxito. Por tanto, se realizó la esterificación del ácido carboxílico en condiciones clásicas para obtener el intermedio **36** con moderado rendimiento ($R = 27\%$). El cual en un paso posterior se transformó en el triflato **37** con excelente rendimiento ($R = 95\%$). Finalmente se realizó la borilación para la obtención del derivado boronado **38** con bajo rendimiento ($R = 5\%$).

Conclusiones parciales

Si bien los objetivos de esta tesis estaban centrados en el desarrollo de compuestos para la detección de peroxinitrito, aprovechando la propiedad de los boronatos como centros electrofílicos, es que diseñamos una nueva clase de compuestos que actúen previniendo o modulando el daño nitroxidativo. En este sentido, trabajamos en la optimización de las rutas sintéticas de los nuevos compuestos basados en sustitución borónica de derivados de tocoferoles para la detoxificación de peroxinitrito.

Sin embargo, hasta el momento no fue posible la obtención del derivado de α -tocoferol soportando un agrupamiento éster borónico a partir del triflato correspondiente, se estudiaron las posibles causas de ello. Posiblemente, los grupos metilos en posición *orto* respecto al triflato en el C6, limiten el acceso al agrupamiento éster borónico también voluminoso.

Se obtuvo el derivado boronado de cadena corta del α -tocoferol **31** mediante tres pasos de reacción con muy bajo rendimiento.

Optimizamos la ruta sintética para la obtención del derivado boronado de cadena corta del γ -tocoferol **38**, mediante ocho pasos de reacción.

Si bien no hubo un buen avance de la reacción de borilación en ningún caso, queda como perspectiva la determinación del poder antioxidante del éster borónico del éster metílico de Trolox **31**, comparándose con el éster borónico del éster metílico del γ -Trolox **38**, en liposomas como modelo de membranas biológicas frente a nucleófilos, en particular peroxinitrito (226).

Brevemente, se incorporará el compuesto a evaluar dos tipos de liposomas multilaminares, uno conteniendo ácidos grasos saturados (DLPC: 1,2-dilauril-*sn*-glicero-3-fosfolina) y el otro conteniendo ácidos grasos insaturados (EYPC : egg chicken yolk L- α -fosfatidilcolina). A cada mezcla se incorpora BTBE (éster *tert*-butílico de *N*-t-BOC-L-tirosina) y peroxinitrito. Luego se estudia por HPLC fase reversa para determinar si el compuesto fue capaz de disminuir la formación de 3-nitro-BTBE y de 3,3'-di-BTBE como marcadores de nitración y dimerización producido por peroxinitrito. Se podría utilizar como control el éster metílico de Trolox a las mismas concentraciones, para determinar si el agrupamiento boronato tiene efecto sobre la oxidación.

Materiales y Métodos

Reactivos

Todas las reacciones que involucran reactivos sensibles a la humedad o aire se realizan bajo atmósfera de nitrógeno o de argón (N_2 (g), Ar (g)).

Todos los productos químicos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y utilizados sin purificación posterior. El grado de avance de las reacciones se monitorea por cromatografía en capa fina (TLC) en placas sílica gel TLC-PET (Fluka). Visualización con luz UV ($\lambda = 254$ nm) y Revelador Anisaldehído. La cromatografía de columna (CC)

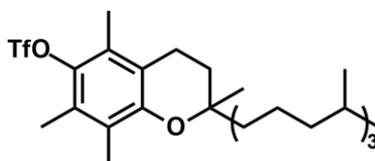
se realizó en sílica flash (60 Å, 230–400 mesh, 40–63 µm, Fluka) como fase estacionaria.

Los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los compuestos se realizan en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz). Utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de partes por millón (ppm) en relación con el TMS y las multiplicidades según s: singulete, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete, br: señal ancha (del inglés *broad signal*). La completa caracterización es realizada con la combinación de experimentos bidimensionales COSY, HMQC o HSQC y HMBC.

Los espectros de masa por impacto electrónico (EI) se realizan en un equipo Shimadzu GC/MS QP 1100 EX a un potencial de ionización de 70 eV por inyección directa (ID).

Síntesis y caracterización espectroscópica de derivados de tocoferoles

2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)croman-6-il trifluorometansulfonato (26) : (222)

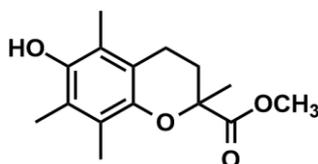


En un balón de dos bocas bajo atmósfera de N_2 (g) se disuelve el α -tocoferol (5.9 g, 13.7 mmol) en 50 mL de CH_2Cl_2 seco, y se agrega piridina (2.4 mL, 29.5 mmol). Se coloca el sistema en un baño agua-hielo a 0°C y se agrega gota a gota anhídrido trifluorometansulfónico (3.0 mL, 18 mmol) por medio de un ecualizador. Luego de finalizado el agregado se retira el baño y se deja llegar a temperatura ambiente. Se deja agitando a T.A. siempre bajo atmósfera inerte. Se monitorea por TLC: fase estacionaria sílica gel, fase móvil Hexano: CH_2Cl_2 (10:1). Revelador: Anisaldehído. Luego de 1 hora y 45 minutos se observa desaparición total del reactivo de partida y se detiene la reacción. Se agrega solución saturada de NaHCO_3 (aq) fría (50 mL) y se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 25mL). La capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , filtra y se destila a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: hexano. Aceite incoloro. R = 85%. (6.5 g).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 0.86-0.90 (m, 12H), 1.0-1.20 (m, 6H), 1.20-1.35 (m, 12H), 1.35-1.48 (m, 3H), 1.50-1.65 (s+m, 3H), 1.73-1.90 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.60-2.64 (t, $J = 6,9$ 2H).

MS (EI): m/z (%) = 562 (M^+ , 5), 429(100), 165(47)

6-hidroxi-2,7,8-tetrametilcromancarboxilato de metilo (29): (227)

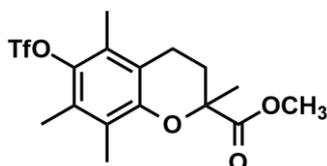


En un reactor de alta presión de acero inoxidable Anton Paar se coloca el 1,4-dihidroxi-2,3,5-trimetilbenceno (10 g, 65.7 mmol), paraformaldehído (4 g, 133 mol) y agua (3 mL). La mezcla se deja reaccionar por 3 h a 180°C. Luego de completada la reacción, la mezcla se enfría a temperatura ambiente y se agrega metanol donde precipitan cristales. Se filtran los cristales a vacío con lavados de metanol.

Se recristaliza de metanol. Sólido blanco. R = 57%. (9.8 g)

Por TLC EP:AcOEt (7:3), revelador anisaldehído, R_f = 0.5, coincide con el patrón de referencia ampliamente caracterizado.

6-trifluorometilsulfoniloxi-2,5,7,8-tetrametil-cromancarboxilato de metilo (30): (222)



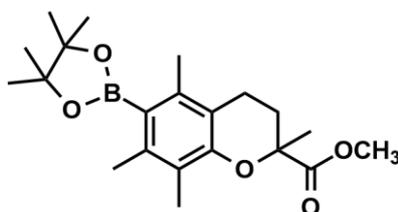
En un balón de dos bocas bajo atmósfera de Ar (g) se suspende el éster metílico de Trolox **29** (500 mg, 1.9 mmol) en 8 mL de CH₂Cl₂ seco y luego se agrega piridina (0.3 mL, 4 mmol). Se coloca el sistema en un baño agua-hielo a 0°C y se agrega gota a gota anhídrido trifluorometansulfónico (0.4 mL, 2.5 mmol). Se retira el baño de agua-hielo y se deja llegar a temperatura ambiente con agitación magnética. A los 60 minutos de comenzada la reacción se observa mediante TLC desaparición total del reactivo de partida y aparición de un único producto, por lo que se detiene la reacción. Se agrega 10 mL de solución saturada de NaHCO₃ fría y se hace un reparto con CH₂Cl₂ (4 x 5 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄, filtra y el disolvente se destila a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad Hexano:Et₂O (9:1) hasta (8:2). Aceite incoloro. R = 92%. (692 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.65 (s, 3H), 1.88-1.90 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.45-2.51 (m, 2H), 2.65-2.70 (m, 1H), 3.72 (s, 3H)

¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) 173.7, 150.7, 140.3, 128.6, 126.7, 124.4, 120.2, 118.2, 117.0, 52.6, 30.0, 25.4, 20.9, 13.2, 12.1

MS (EI): *m/z* (%) = 396 (M⁺, 17), 263 (100), 231 (61), 203 (44)

2,5,7,8-tetrametil-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)cromancarboxilato de metilo (31): (134)



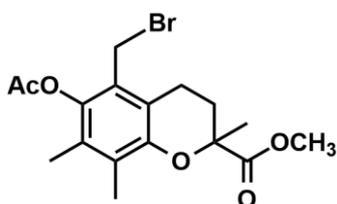
En un balón de dos bocas bajo atmósfera de Ar (g) se disuelve *bis*(pinacolato)diboro (203 mg, 0.8 mmol), *bis*(difenilfosfino)ferroceno (24 mg, 0.04 mmol), 1,1'-*bis*(difenilfosfino)ferroceno-dicloropaladio(II) (31 mg, 0.04 mmol), y acetato de potasio (214 mg, 2.2 mmol) en 8 mL de dioxano. Luego se agrega el triflato **30** (300 mg, 0.7 mmol) y se calienta a 80°C en baño de aceite. La reacción se monitorea por TLC. Luego de 6 horas de calentamiento a 80°C se lleva el sistema a reflujo por 4 horas más. Se apaga el calentamiento y se deja agitando a temperatura ambiente por 48 horas. Se detiene la reacción, se agrega Et₂O (3 x 10 mL) y se hace un reparto con solución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, filtra y el disolvente se destila a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria: sílica flash, fase móvil: gradiente de polaridad Hexano, hasta Hexano:AcOEt(9:1). Sólido blanco. R < 3%. (7 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.29 (s, 12H), 1.65 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.49-2.54 (m, 2H), 2.62-2.70 (m, 2H), 3.71 (s, 3H)

No fue posible su caracterización por ¹³C-RMN debido a la poca masa obtenida.

MS (EI): *m/z* (%) = 313 (4), 256 (21), 213 (16), 129 (56), 73 (100)

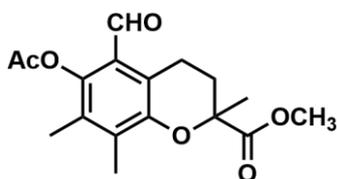
6-acetoxi-5-bromometil-2,7,8-trimetil-cromancarboxilato de metilo (**32**): (225)



Se sintetiza según se describe en la literatura (225) con pequeñas modificaciones, partiendo del éster metílico de Trolox **29** (9.5 g, 36 mmol) y utilizando únicamente CH₂Cl₂ seco como disolvente. El producto obtenido fue purificado por cromatografía en columna fase estacionaria sílica flash, fase móvil gradiente de polaridad partiendo de Hexano:Et₂O(9:1) hasta (1:1). Sólido blanco crema. R=59%. (8.0 g).

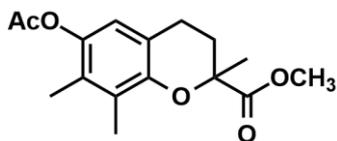
La caracterización espectroscópica y propiedades físicas coinciden con las de referencia.

6-acetoxi-5-formil-2,7,8-trimetil-cromancarboxilato de metilo (**33**): (225)



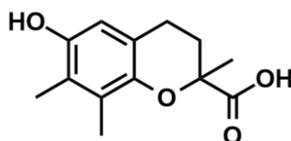
Se sintetiza según se describe en la literatura (225) con pequeñas modificaciones partiendo del compuesto **32** (1.6 g, 4.2 mmol). El producto obtenido fue purificado por cromatografía en columna fase estacionaria sílica flash, fase móvil gradiente de polaridad partiendo de Hexano:Et₂O (95:5) hasta (9:1). Sólido amarillo. R=31%.

La caracterización espectroscópica y propiedades físicas coinciden con las de referencia.

Síntesis de 6-acetoxi-2,7,8-trimetil-cromancarboxilato de metilo (34): (225)

Se sintetiza según se describe en la literatura (225) con pequeñas modificaciones partiendo del aldehído **33** (190 mg, 0.6 mmol). Se purifica por cromatografía en columna fase estacionaria sílica flash, fase móvil Hexano:Et₂O (9:1). Aceite amarillo. R=31%. (54 mg).

La caracterización espectroscópica y propiedades físicas coinciden con las de referencia.

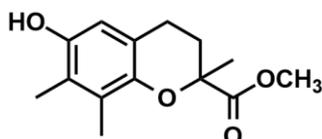
γ-Trolox (35): (227)

En un balón se disuelve el compuesto **34** (600 mg, 2 mmol) en 3 mL de MeOH, mediante el uso de un ecualizador se agrega gota a gota una solución de NaOH concentrada (1.5 mL, 0.1 g/mL). Una vez finalizado el agregado se coloca el sistema en un baño de aceite y se calienta a 80°C por 2 h. Cumplido ese tiempo se agrega una solución de NaHSO₄ (1.5 mL, 0.34 g/mL) y se deja calentando a 80°C por 2 h más. Una vez completada la reacción, evidenciado por TLC, es enfriada a temperatura ambiente y se agrega AcOEt (3 x 10 mL) y agua (aprox. 20 mL) para hacer un reparto. Se combinan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, filtra y destila a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna, fase estacionaria sílica flash, fase móvil gradiente de polaridad partiendo de AcOEt:Hexano (8:2) hasta (9:1). Aceite anaranjado. R=85%. (411 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.64 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.19-2.25 (m, 2H), 2.34-2.71 (m, 2H), 6.36 (s, 1H), 11.34 (s, 1H) –COOH parcialmente intercambiado con H₂O

¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) 147.4, 125.7, 122.3, 118.0, 112.1, 30.0, 24.8, 22.3, 12.0, 11.9

MS (EI): *m/z* (%) = 236 (M⁺, 92), 191 (70), 175 (18), 150 (100)

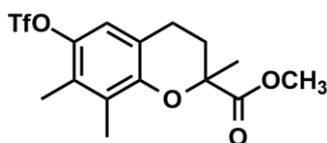
6-hidroxi-2,7,8-trimetil-cromancarboxilato de metilo (36): (228)

En un balón bajo atmósfera de Ar (g) se disuelve el γ -Trolox **35** (150 mg, 0.6 mmol) en 3.5 mL de una mezcla MeOH:CH₂Cl₂ (10:2) y se agrega el ácido *p*-toluensulfónico (33 mg, 0.2 mmol). Luego se coloca el sistema a reflujo en baño de aceite. A las 5 h se detiene la reacción debido a la desaparición del reactivo de partida evidenciado por TLC. Una vez enfriada se destila a presión reducida para concentrar el crudo. Se agrega AcOEt (10 mL) y se lava con solución saturada de NaHCO₃ (2 x 10 mL) y solución saturada de NaCl (1 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secan con Na₂SO₄, se filtran y se destilan a presión reducida. Purificación por cromatografía en columna, fase estacionaria sílica flash, fase móvil gradiente de polaridad Hexano:AcOEt (9:1) hasta (8:2). Aceite claro. R= 27%. (42 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.62 (s, 3H), 1.86-1.91 (m, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.36-2.39 (m, 1H), 2.63-2.65 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 6.34 (s, 1H)
¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) 207.0, 174.5, 146.9, 145.6, 125.7, 121.9, 117.8, 111.9, 52.4, 30.9, 30.5, 25.5, 22.6, 11.9, 11.8

MS (EI): *m/z* (%) = 250 (M⁺, 72), 191 (100), 150 (48), 69 (42)

6-trifluorometansulfoniloxi-2,7,8-trimetil-cromancarboxilato de metilo (37): (222)

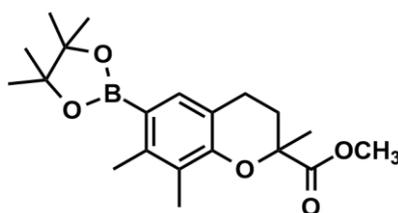


Se sintetiza a partir del éster metílico **36** (40 mg, 0.2 mmol) siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la síntesis del triflato **30**. El producto crudo se purifica por cromatografía en columna, sílica flash, gradiente de polaridad Hexano:AcOEt (9:1) hasta (7:3). Aceite incoloro. R= 66%. (40 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.66 (s, 3H), 1.86-1.91 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.40-2.43 (m, 1H), 2.68-2.73 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 6.79 (s, 1H)
¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) 173.7, 150.9, 141.6, 128.3, 127.1, 120.2, 118.8, 118.5, 117.1, 113.9, 52.6, 30.1, 25.4, 22.6, 13.1, 12.1

MS (EI): *m/z* (%) = 382 (M⁺, 1), 81 (59), 69 (100), 55 (25)

6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2,7,8-trimetil-cromancarboxilato de metilo (38): (134)



Se sintetiza a partir de **37** (40 mg, 0.1 mmol) siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la síntesis del boronato **31**, pero aumentando el tiempo de reacción a 36 h de calentamiento a reflujo. El crudo se purifica por cromatografía en capa fina preparativa fase estacionaria sílica gel, y fase móvil EP:Et₂O (95:5). Aceite claro. R = 5%. (2 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.34 (s, 12H), 1.64 (s, 3H), 1.83-1.90 (m, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.36-2.41 (m, 1H), 2.48 (s, 3H), 2.65-2.7 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 7.35 (s, 1H)

No fue posible su caracterización por ¹³C-RMN debido a la poca masa obtenida.

MS (EI): *m/z* (%) = 360 (M⁺, 51), 301 (100), 201 (26), 83 (14).

Conclusiones generales y perspectivas

Este trabajo de Tesis Doctoral se centró en el desarrollo, síntesis y caracterización de compuestos boronados diseñados como sondas moleculares fluorescentes para la detección y cuantificación de peroxinitrito en sistemas celulares.

En el desarrollo del trabajo se exploraron diferentes fluoróforos derivados de fluoresceína y de cumarina soportando ácidos o ésteres borónicos como centro electrofílico capaz de reaccionar con oxidantes nucleofílicos de relevancia biológica. Se exploraron diferentes modificaciones estructurales de los derivados boronados de cumarinas, permitiendo modular sus propiedades espectroscópicas e incluso direccionarlas a un sitio subcelular específico.

- Optimizamos la técnica sintética del éster del ácido borónico de cumarina (CBE) ($R_{\text{global}} \sim 77\%$), y del ácido borónico de cumarina (CBA) ($R_{\text{global}} \sim 29\%$). Demostramos que ambos compuestos reaccionan de manera extremadamente rápida con peroxinitrito $k_{\text{CBE/ONOO}^-} = 1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_{\text{CBA/ONOO}^-} = 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y presentan idéntico comportamiento. Por lo tanto, centramos el trabajo en el éster borónico, como el agrupamiento electrofílico capaz de reaccionar con oxidantes nucleofílicos.
- Posteriormente, evaluamos modificaciones estructurales de los derivados de cumarinas, donde trabajamos intensamente en diferentes rutas sintéticas para su obtención. Si bien con el fluoróforo MitoCT-ii oxidado ($\lambda_{\text{exc}} = 395 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$) se mejoraron las propiedades espectroscópicas en más de 60 nm respecto a la 7-hidroxycumarina ($\lambda_{\text{exc}} = 332 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$), la excitación con láseres en el rango visible puede ser poco eficiente. Queda como perspectiva la incorporación sobre el derivado de cumarina de anillos aromáticos condensados como naftalenos o pirenos soportando grupos haloalquilos para la obtención de la sal de fosfonio.
- Se desarrolló FI-B (fluoresceína-boronato) y mediante su caracterización *in vitro*, análisis cinéticos, ensayos de citotoxicidad y aplicación en sistemas celulares, se validó a FI-B como una sonda sensible para la detección directa de peroxinitrito producido endógenamente. Además, se exploró la reactividad de FI-B con hidroperóxidos aminoácidos o proteicos, desarrollándose un método cinético para cuantificar hidroperóxidos aminoácidos por velocidades iniciales utilizando a FI-B como sonda de detección. Si bien inicialmente se había reportado en la literatura que las sondas derivadas de boronato era *específicas* para H_2O_2 (115), en este trabajo demostramos ampliamente que también responden a otros oxidantes nucleofílicos biológicamente relevantes, incluido HCO_4^- , HOCl , ONOO^- e hidroperóxidos de aminoácidos. Además, demostramos que en un sistema donde podrían co-existir más de una especie, los aril-boronato son cinéticamente selectivos hacia peroxinitrito, debido su cinética mucho más favorable ($k_{\text{ONOO}^-} \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{HOCl}} \sim 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{HCO}_4^-} \sim 100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{H}_2\text{O}_2} \sim 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (27, 111, 229).

- Estudiamos la reactividad hacia peroxinitrito de una sonda comercial MitoPY1, reportada para la detección de H_2O_2 intramitocondrial. Si bien reacciona con peroxinitrito, presenta varios inconvenientes debido a problemas de inestabilidad y autoxidación. Por lo tanto, como perspectivas se continuará el desarrollo de sondas dirigidas a la mitocondria derivadas de cumarinas modificadas, debido que al variar el *scaffold* de la molécula de una fluoresceína a una cumarina modificada como MitoCT-i y MitoCT-ii, se evitan los problemas de inestabilidad y autoxidación.
- Estudiamos el mecanismo de reacción de boronatos con oxidantes de relevancia biológica, utilizando la estrategia de marcaje isotópico de oxidantes. Se demostró inequívocamente el origen de los átomos de oxígeno en los productos formados, siendo que la oxidación de boronatos se acompaña de la incorporación de átomos de oxígeno provenientes de los oxidantes, y no del medio de reacción. La incorporación de átomos de oxígeno provenientes del oxidante elimina cualquier tipo de ambigüedad sobre la identidad de la especie que se va a detectar.
- Por último, se trabajó en el diseño de una nueva clase de compuestos con una mejor capacidad antioxidante que actuarían previniendo o modulando el daño nitroxidativo, permitiendo el estudio y tratamiento de disfunciones redox. En este sentido, se desarrollaron nuevos compuestos basados en sustitución borónica como el éster borónico del éster metílico del γ -Trolox para la detoxificación de peroxinitrito. Como perspectivas, se estudiará su capacidad de modular el daño oxidativo en un modelo de membranas biológicas expuesta a peroxinitrito.

Publicaciones

Trabajos publicados en revistas arbitradas a partir de los resultados obtenidos en el marco de esta Tesis de Doctorado:

1. *Tracking isotopically labeled oxidants using boronate-based redox probes.* **Natalia Rios**, Rafael Radi, Balaraman Kalyanaraman, Jacek Zielonka. *Journal of Biological Chemistry* (2020) 295 (19) 6665–6676. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA120.013402>
2. *Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxynitrite fluxes using fluorescein-boronate.* **Natalia Rios**, Lucía Piacenza, Madia Trujillo, Alejandra Martínez, Verónica Demicheli, Carolina Prolo, María Noel Álvarez, Gloria V. López, Rafael Radi. *Free Radical Biology and Medicine* 101 (2016) 284–295. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.033>

Artículos de revisión y Capítulos de Libro publicados vinculados a la temática de la Tesis:

1. *Detection and quantification of nitric oxide–derived oxidants in biological systems.* Matías Möller, **Natalia Rios**, Madia Trujillo, Rafael Radi, Ana Denicola, Beatriz Alvarez. *Journal of Biological Chemistry* (2019) 294 (40) 14776–14802. Artículo de Revisión (Review). <http://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006136>
2. *Fluorescence and chemiluminescence approaches for peroxynitrite detection.* **Natalia Rios**, Carolina Prolo, Lucia Piacenza, Maria Noel Alvarez, Rafael Radi. *Free Radical Biology & Medicine* 128, (2018) 59-68. Artículo de Revisión (Review). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.017>
3. *Peroxynitrite Formation and Detection in Living Cells.* **Natalia Rios**, Carolina Prolo, Maria Noel Alvarez, Lucia Piacenza, Rafael Radi. *Nitric Oxide 3rd Edition, Edited by Louis J. Ignarro* 271-288 21 Elsevier (2017). Capítulo de Libro. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804273-1.00021-1>

Artículos publicados en colaboración que utilizaron las sondas sintetizadas en esta Tesis para la detección de peroxinitrito en diferentes modelos:

Las sondas generadas en esta tesis son utilizadas por otros integrantes de nuestro grupo con excelentes resultados, permitiéndoles avanzar en sus investigaciones y aportando al desarrollo de otras tesis. Además, permitieron la colaboración con diferentes grupos de investigación nacionales, de la región e internacionales.

1. En este Artículo en colaboración con el grupo liderado por la Dra. Heike Beck del Walter Brendel Centre of Experimental Medicine, Biomedical Center Munich, Munich Heart Alliance, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Alemania. Se reporta por primera vez la aplicación FI-B en tejido de mamíferos. Ratones con delección del gen que codifica para la tiorredoxina reductasa endotelial (TrxR2), una enzima del sistema de tiorredoxinas mitocondriales que mantienen la homeostasis redox. Estos animales muestran hipertrofia de la pared vascular, sufren anomalías de la vasculatura renal y alteraciones funcionales. FI-B se utilizó con éxito en la emisión de fluorescencia y

visualización en imágenes, observándose que la pérdida de TrxrR2 da como resultado altos niveles de peroxinitrito tanto en células endoteliales vasculares como en vasos endotelio mesentéricos.

Mitochondrial thioredoxin reductase (TrxR2) in vascular endothelium controls peroxynitrite levels and tissue integrity. Petra Kameritsch, Miriam Singer, Christoph Nuernbergk, **Natalia Rios**, Anibal M Reyes, Julian Kirsch, Susanna Müller, Kristin Pogoda, Ruicen Cui, Thomas Kirchner, Bärbel Lange-Sperandio, Ulrich Pohl, Marcus Conrad, Rafael Radi, Heike Beck. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, (2020). En preparación.

2. En este trabajo se describe la estandarización de un protocolo para analizar por la técnica de citometría de flujo multiparamétrico el grado de estrés nitroxidativo en espermatozoides humanos, debido a que altos niveles de especies reactivas del nitrógeno (RNS) están asociados con una fertilidad masculina deteriorada. Entre los parámetros que se miden, incluyendo viabilidad, potencial de membranas mitocondriales, oxidación de tioles, se mide producción de peroxinitrito utilizando FI-B.

Multiparameter Flow Cytometry Assay for Analysis of Nitrosative Stress Status in Human Spermatozoa. Pamela Uribe, Juan Meriño, Emilio Manquemilla, Camila Villagrán, Etelinda Vega, Fabiola Zambrano, Mabel Schulz, Felipe Pezo, Juana V. Villegas, Rodrigo Boguen, Raúl Sánchez. *Journal of Quantitative Cell Science, Cytometry Part A* (2020). <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24170>

3. En un trabajo reciente, se analizó el rol de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (Fe-SODB) de *Trypanosoma cruzi* como un factor de virulencia de la Enfermedad de Chagas. Se compararon parásitos salvajes o sobreexpresantes de Fe-SODB, pre-cargaron con FI-B para evaluar la capacidad de la enzima Fe-SODB en prevenir la formación de peroxinitrito debido a detoxificación de $O_2^{\cdot-}$, tanto agregado externamente con SIN-1, como en el interior del fagosoma de macrófagos inmunoestimulados.

Cytosolic Fe-superoxide dismutase safeguards Trypanosoma cruzi from macrophage-derived superoxide radical. Alejandra Martínez, Carolina Prolo, Damián Estrada, **Natalia Rios**, María Noel Alvarez, María Dolores Piñeyro, Carlos Robello, Rafael Radi, Lucía Piacenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, (2019) 116 (18) 8879-8888. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1821487116.

4. En este trabajo se estudió el efecto antioxidante de porfirinas de manganeso (MnP). FI-B fue utilizada para evidenciar la formación de peroxinitrito intra-mitocondrial en células endoteliales, y así posteriormente evaluar la capacidad citoprotectora de MnP exponiendo las células endoteliales al estrés nitroxidativo inducido por peroxinitrito.

Manganese porphyrin redox state in endothelial cells: Resonance Raman studies and implications for antioxidant protection towards peroxynitrite. Sebastián Carbballal, Valeria Valez, Damián Alvarez-Paggid, Artak Tovmasyan, Ines Batinic-Haberle, Gerardo Ferrer-Sueta, Daniel H. Murgida, Rafael Radi. *Free Radical Biology and Medicine* 126 (2018) 379–392. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.023>

5. En este trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Carsten Berndt del Department of Neurology, Medical Faculty, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, Alemania,

estudiaron en un modelo de neuroinflamación, cómo la glutaredoxina Grx2 (una tiol oxidorreductasa) protege contra el daño proteico oxidativo y nitrosativo al detoxificar $\bullet\text{NO}$ en oligodendrocitos a través de la formación de complejos de dinitrosil-hierro. Esto inhibe la formación de peroxinitrito (evidenciado por oxidación de FI-B) evitando un daño oligodendroglial posterior.

Iron-sulfur glutaredoxin 2 protects oligodendrocytes against damage induced by nitric oxide release from activated microglia. Klaudia Lepka, Katrin Volbracht, Eckhard Bill, Reiner Schneider, **Natalia Ríos**, Thomas Hildebrandt, Jens Ingwersen, Timur Prozorovski, Christopher Horst Lillig, Jack van Horssen, Lawrence Steinman, Hans-Peter Hartung, Rafael Radi, Arne Holmgren, Orhan Aktas, Carsten Berndt. *Glia* 65, (2017) 1521-1534. <https://doi.org/10.1002/glia.23178>

6. En otro trabajo se estudió el mecanismo de reacción de la enzima antioxidante superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) con peroxinitrito, el cual es capaz de nitrarla e inactivarla. Se utilizó al CBA para confirmar el valor de la constante de velocidad de la MnSOD con este oxidante por un ensayo de competencia como un método cinético indirecto.

Mechanism of the Reaction of Human Manganese Superoxide Dismutase with Peroxynitrite: Nitration of Critical Tyrosine 34. Verónica Demicheli, Diego Moreno, Gabriel Jara, Analía Lima, Sebastián Carballal, **Natalia Ríos**, Carlos Batthyany, Gerardo Ferrer-Sueta, Celia Quijano, Darío Estrin, Marcelo Martí, Rafael Radi. *Biochemistry* (2016), 55, 3403–3417. <http://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00045>

7. En otro trabajo FI-B se utilizó con éxito en la determinación de la producción de peroxinitrito en un modelo de daño renal, en el que células tubulares proximales renales (HK-2) se trataron con angiotensina II produciendo disfunción mitocondrial y por lo tanto una mayor producción de peroxinitrito. Posteriormente se evaluó como el agregado de ácido nitro-araquidónico inhibe la producción de este oxidante.

Nitro-Arachidonic Acid Prevents Angiotensin II-Induced Mitochondrial Dysfunction in a Cell Line of Kidney Proximal Tubular Cells. Beatriz Sánchez-Calvo, Adriana Cassina, **Natalia Ríos**, Gonzalo Peluffo, José Boggia, Rafael Radi, Homero Rubbo, Andres Trostchansky. *PLoS ONE* 11(3) (2016) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150459>

8. En el trabajo realizado por integrantes de nuestro grupo de investigación, se evaluó cómo el grado de difusión de $\bullet\text{NO}$ hacia los glóbulos rojos, podría competir con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ producido por macrófagos, afectando los rendimientos de formación de peroxinitrito en un contexto inflamatorio medido por CBA. Otra estrategia utilizada en el trabajo, fue unir a la FI-B a beads (perlas) de látex y tras su fagocitosis por macrófagos se evaluó la producción de peroxinitrito intrafagosomal, en presencia o ausencia de glóbulos rojos.

Nitric oxide diffusion to red blood cells limits extracellular, but not intraphagosomal, peroxynitrite formation by macrophages. Carolina Prolo, María Noel Álvarez, **Natalia Ríos**, Gonzalo Peluffo, Rafael Radi, Natalia Romero. *Free Radical Biology and Medicine* 87 (2015) 346–355. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.027>

Colaboraciones

Otras colaboraciones generadas en el transcurso de esta tesis:

- Dr. Jacek Zielonka, Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos.
- Dra. Ohara Augusto, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, San Pablo, Brasil
- Dr. Pablo Evelson, Universidad de Buenos Aires, CONICET, Instituto de Bioquímica Medicina Molecular (IBIMOL), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina.
- Dr. Alfredo Cruz, Molecular and Developmental Complexity Group, Unidad de Genómica Avanzada, Langebio-Cinvestav, Irapuato, Mexico.
- Dr. Daniel Peluffo, Grupo de Biofisiocoquímica, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay
- Dra. Heike Beck, Walter Brendel Centre of Experimental Medicine, Biomedical Center Munich, Munich Heart Alliance, Ludwig-Maximilians-University, Alemania.
- Dra. Louisa Forbes, Centre for Free Radical Research, University of Otago Christchurch, Christchurch, Nueva Zelanda.
- Dr. Malcolm J. Jackson, MRC-Arthritis Research UK Centre for Integrated Research Into Musculoskeletal Ageing (CIMA), Department of Musculoskeletal Biology, Institute of Ageing and Chronic Disease, University of Liverpool, Inglaterra.
- Dra. Pamela Uribe y Dr. Raúl Sanchez Gutierrez, Center of Excellence in Translational Medicine - Scientific and Technological Bioresource Nucleus (CEMT – BIOREN), Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.
- Dr. Carsten Berndt Department of Neurology, Medical Faculty, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, Alemania.
- Dr. Alain P. Gobert Division of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Department of Medicine, and Center for Mucosal Inflammation and Cancer, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Estados Unidos.

Agradecimientos

Quiero agradecer a las entidades que apoyaron económicamente este proyecto de Tesis de Doctorado:

- A la ANII por las Becas de Maestría y Doctorado, y a la CAP por la Beca de Finalización de Estudios de Posgrado.
- A PEDECIBA Química por el apoyo brindado con las alícuotas de estudiantes y Movilidad para pasantías; y a CSIC por la financiación del Proyecto de Iniciación a la Investigación, y Movilidad como apoyo para asistir a congresos.
- Al CEINBIO, Espacio Interdisciplinario, Facultad de Química y Facultad de Medicina por el apoyo económico.



Además expresar mis agradecimientos a todas las personas que me ayudaron a realizar este Trabajo:

A mis directores de Tesis Dra. Gloria V. López y Dr. Rafel Radi, a Rafa por integrarme al grupo del CEINBIO del cual es un orgullo formar parte, por su apoyo constante, sus valiosas discusiones y sugerencias, por enseñarnos a todos a pensar con rigor científico; a Vicky por su generosidad, apoyo, por estar siempre y por todas las charlas y consejos con una mirada crítica, positiva y alentadora.

Al Dr. Gonzalo Peluffo por dirigirme en el Practicantado de Q.F, e integrarme inmediatamente a su proyecto boronatos de tocoferoles arrancando con los estudios de posgrado y enseñarme a diseñar experimentos, te extrañamos Gonza!

A la Dra. Lucía Piacenza, un pilar fundamental de esta tesis y del laboratorio! Gracias por ayudarme en todo y enseñarme cultivo celular, enseñarme bioquímica y ayudarme en el diseño y realización de experimentos, discusión de resultados y muchísimo más.

A la Dra. Madia Trujillo por enseñarme muchísimo sobre cinética, ayudarme en el diseño y realización de experimentos y en varias discusiones de resultados.

Al Dr. Jacek Zielonka y al Dr. Balaraman Kalyanaraman, referentes en el área de detección de especies oxidantes, por darme la oportunidad de poder trabajar en su laboratorio en el Medical College de Wisconsin en Estados Unidos. En particular a Jacek quien me enseñó muchísimo trabajando a la par en lo experimental y discutiendo resultados.

A la Dra. Alicia Merlino por ayudarme con las simulaciones de los espectros de absorción en el LQTC de Facultad de Ciencias, Ali te extrañamos!

A la Dra. Verónica Demicheli por todas las simulaciones en Gepasi y gran compañera de congresos.

A Horacio Pezaroglio por la realización de los espectros de RMN.

A Msc. Mauricio Mastrogiovanni por la realización de los espectros de MS y varias discusiones de resultados.

A los Dres. Williams Porcal, José M. Souza y la Dra. Ohara Augusto por aceptar formar parte del Tribunal y su gran disposición para evaluar este trabajo.

A mis amigos de *Muchos Problemas* Carito, Lu, Ceci, Bea, Vale, Pao, Ale, Adrián, Demon y Aníbal que son lo máximo!!! Todos me han enseñado muchísimo y participado en cada parte del trabajo de tesis, además compartir todos los días con uds hicieron de esta etapa una de las más lindas y divertidas ☺!

A todos los compañeros del Departamento de Bioquímica de Facultad de Medicina y del CEINBIO, todos han aportado de una manera u otra a este trabajo, y me han ayudado y enseñado muchísima bioquímica.

A todos los compañeros de Química Orgánica Medicinal de Facultad de Ciencias y Química Orgánica de Facultad de Química, donde se sentaron las bases para poder hacer Síntesis Orgánica de manera fluída, en especial a Willy un gran químico que me enseñó muchísimo sobre síntesis y espectroscopía.

A mis amigas del alma Vir, Nati Alvarez, Nati Espino que siempre me han apoyado y acompañado en todas las etapas de la vida.

A Mamita por el ejemplo de siempre meterle para adelante pase lo que pase, a mi padre por el apoyo y amor incondicional, que lamento tanto no haber podido compartir esta etapa con él, su gran sabiduría, inteligencia y cultura hubiesen aportado muchísimo, te extraño siempre!

A Gastón el mejor compañero de vida que me ha apoyado infinito en mi carrera de grado y posgrado, y en todos los aspectos de nuestra vida, te amo infinito!

A Máximo que me acompaña desde la panza en toda la etapa de escritura de esta tesis y me hace sentir emociones y sentimientos únicos.

Abreviaturas

Δ – calentamiento a reflujo

A

Ac₂O – anhídrido acético

AcOEt – acetato de etilo

AcOH – ácido acético

A.R. – Adición Reversa

B

BHT – Butilhidroxitolueno

BSA – del inglés bovine serum albumin (seroalbúmina bovina)

C

¹³C RMN – Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

CBA – del inglés coumarin-7-boronic acid (ácido cumarin-7-borónico)

CBE – del inglés coumarin-7-boronic acid, pinacolate ester (éster pinacolínico del ácido cumarin-7-borónico)

COSY – Espectroscopia de Correlación (Correlation Spectroscopy)

D

DETA-NONOato – (*Z*)-1-[*N*-(2-aminoethyl)-*N*-(2-ammonioethyl)amino]diazén-1-ium-1,2-diolate, dietilentriamina-NONOato, NOC-18

dppf – 1,1'-Ferrocenediyl-bis(diphenylphosphine)

DFT – del inglés Density Functional Theory

DMF – *N,N*-dimetilformamida

DMAP – 4-dimetilaminopiridina

DTPA – del inglés diethylenetriamine pentaacetic acid (ácido dietilentriamina pentacético)

DMSO – dimetilsulfóxido

DIPEA – *N,N*-diisopropiletilamina

E

EP – éter de petróleo (fracción 60-70°C)

EPR – Resonancia Paramagnética Electrónica del inglés Electron Paramagnetic Resonance

Et₂O – éter etílico

EtOH – etanol

F

FI-B –Fluoresceína-boronato

FI – Fluoresceína

H

¹H RMN - Resonancia Magnética Nuclear de protón

HMBC – Correlación de enlace múltiple heteronuclear (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

HMQC – Correlación cuántica múltiple heteronuclear (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)

HSQC – Correlación cuántica simple heteronuclear (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

I

INF-γ – Interferón gamma

L

LPS – Lipopolisacárico

M

MS (EI) – Espectroscopía de Masas por Impacto Electrónico

MW – Microondas

MeOH – metanol

MS – Espectrometría de Masas

N

NBS – *N*-bromosuccinimida

P

PBS – del inglés Phosphate buffered saline (solución tampón fosfato salino)

Pd(dppf)Cl₂-CH₂Cl₂ -complejo [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II)-CH₂Cl₂

Pd(dppf)Cl₂ - complejo [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II)

P.F. – Punto de Fusión

PPh₃ – trifenilfosfina

***p*-TsOH** – ácido *p*-toluensulfónico

Py – Piridina

R

RFU – del inglés Relative Fluorescence Units, Unidades Relativas de Fluorescencia

RMN – Resonancia Magnética Nuclear

S

SFB – del inglés fetal bovine serum, suero fetal bovino

Spermina-NONOato - (Z)-1-[N-[3-aminopropil]-N-[4-(3-aminopropilamonio)butil]-amino]diazen-1-ium-1,2-diolato

T

T.A. – temperatura ambiente

THF – tetrahidrofurano

TLC – del inglés Thin Layer Chromatography (cromatografía en capa fina)

TFA – Ácido trifluoroacético

TMS – tetrametilsilano

U

UHPLC – del inglés Ultra High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de ultra alto rendimiento)

V

Vero Cells – Células VERO Células epiteliales de riñón de mono

Referencias

1. Decker H & Van Holde KE (2010) *Oxygen and the Evolution of Life* (Springer Science & Business Media).
2. Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141(2):312-322.
3. Wiedenheft B, *et al.* (2005) An archaeal antioxidant: characterization of a Dps-like protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(30):10551-10556.
4. Nelson DL & Cox MM (2015) *Lehninger: principios de bioquímica*.
5. Davies KJ (2016) The oxygen paradox, oxidative stress, and ageing. *Archives of biochemistry and biophysics* 595:28-32.
6. Brown TL, LeMay Jr HE, Bursten BE, & Burdge JR (2004) *Química: la ciencia central* (Pearson educación).
7. Shriver D, Atkins P, & Langford C (1998) *Química Inorgánica* (volumen 1 y 2). Editorial Reverté SA Barcelona-España.
8. Davies MJ (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical research communications* 305(3):761-770.
9. Baynes J & Dominiczak M (2011) *Bioquímica Médica*. 3ra. Barcelona. Elsevier Mosby.
10. Imlay JA (2003) Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology* 57(1):395-418.
11. Pauling L (1979) The discovery of the superoxide radical. *Trends in Biochemical Sciences* 4(11):N270-N271.
12. Bielski BH & Allen AO (1977) Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals. *The Journal of Physical Chemistry* 81(11):1048-1050.
13. McCord JM & Fridovich I (1969) Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244(22):6049-6055.
14. Behar D, Czapski G, Rabani J, Dorfman LM, & Schwarz HA (1970) Acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl radical. *The Journal of Physical Chemistry* 74(17):3209-3213.
15. Koppenol WH, Stanbury DM, & Bounds PL (2010) Electrode potentials of partially reduced oxygen species, from dioxygen to water. *Free Radical Biology and Medicine* 49(3):317-322.
16. Butler J, Jayson G, & Swallow AJ (1975) The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 408(3):215-222.
17. Hausladen A & Fridovich I (1994) Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *Journal of Biological Chemistry* 269(47):29405-29408.
18. Winterbourn CC & Kettle AJ (2003) Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochemical and biophysical research communications* 305(3):729-736.
19. Ríos N, Prolo C, Álvarez MN, Piacenza L, & Radi R (2017) Peroxynitrite Formation and Detection in Living Cells. *Nitric Oxide*, (Elsevier), pp 271-288.
20. McCord JM & Fridovich I (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 243(21):5753-5760.
21. Lambeth JD & Neish AS (2014) Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 9:119-145.
22. Babior BM (1994) Activation of the respiratory burst oxidase. *Environmental health perspectives* 102(suppl 10):53-56.

23. Baldrige C & Gerard R (1933) The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol* 103(1):235-236.
24. Sbarra AJ & Karnovsky M (1959) The biochemical basis of phagocytosis. *J Biol Chem* 234:1355-1362.
25. Iyer G, Islam M, & Quastel J (1961) Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature* 192(4802):535-541.
26. Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG, & Koppenol WH (1997) Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chemical research in toxicology* 10(11):1285-1292.
27. Sikora A, Zielonka J, Lopez M, Joseph J, & Kalyanaraman B (2009) Direct oxidation of boronates by peroxynitrite: mechanism and implications in fluorescence imaging of peroxynitrite. *Free Radical Biology and Medicine* 47(10):1401-1407.
28. Winterbourn CC (2013) The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods in enzymology*, (Elsevier), Vol 528, pp 3-25.
29. Sies H (2014) Role of metabolic H₂O₂ generation Redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 289(13):8735-8741.
30. Bienert GP, *et al.* (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry* 282(2):1183-1192.
31. Nathan C, Nogueira N, Juangbhanich C, Ellis J, & Cohn Z (1979) Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of experimental medicine* 149(5):1056-1068.
32. Koppenol W (1993) The centennial of the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine* 15(6):645-651.
33. Halliwell B (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine* 91(3):S14-S22.
34. Koppenol W & Butler J (1985) Energetics of interconversion reactions of oxyradicals. *Advances in Free Radical Biology & Medicine* 1(1):91-131.
35. Zacharia IG & Deen WM (2005) Diffusivity and solubility of nitric oxide in water and saline. *Annals of biomedical engineering* 33(2):214-222.
36. Denicola A, Souza JM, Radi R, & Lissi E (1996) Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching. *Archives of biochemistry and biophysics* 328(1):208-212.
37. Subczynski WK, Lomnicka M, & Hyde JS (1996) Permeability of nitric oxide through lipid bilayer membranes. *Free radical research* 24(5):343-349.
38. Möller M, *et al.* (2005) Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 280(10):8850-8854.
39. Henry YA, Guissani A, & Ducastel B (2012) *Nitric oxide research from chemistry to biology: EPR spectroscopy of nitrosylated compounds* (Springer Science & Business Media).
40. Rubbo H, *et al.* (1995) Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 324(1):15-25.
41. Kharitonov VG, Sundquist AR, & Sharma VS (1994) Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. *Journal of Biological Chemistry* 269(8):5881-5883.
42. Möller MN, *et al.* (2019) Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *Journal of Biological Chemistry* 294(40):14776-14802.
43. Möller MN, Li Q, Lancaster Jr JR, & Denicola A (2007) Acceleration of nitric oxide autoxidation and nitrosation by membranes. *IUBMB life* 59(4-5):243-248.

44. Furchgott RF & Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *nature* 288(5789):373-376.
45. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, & Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(24):9265-9269.
46. Palmer RM, Ferrige A, & Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122):524-526.
47. Cohen RA, *et al.* (1999) Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circulation research* 84(2):210-219.
48. Mellion B, *et al.* (1981) Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate. *Blood* 57(5).
49. Kubes P, Suzuki M, & Granger D (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(11):4651-4655.
50. Dubey RK, Jackson EK, & Lüscher T (1995) Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors. *The Journal of clinical investigation* 96(1):141-149.
51. Ross R (1999) Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England journal of medicine* 340(2):115-126.
52. Radi R, Cassina A, & Hodara R (2002) Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biological chemistry* 383(3-4):401-409.
53. Radi R, Peluffo G, Alvarez MaN, Naviliat M, & Cayota A (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine* 30(5):463-488.
54. Stein B, Frank P, Schmitz W, Scholz H, & Thoenes M (1996) Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *Journal of molecular and cellular cardiology* 28(8):1631-1639.
55. Alvarez MN, Piacenza L, Irigoín F, Peluffo G, & Radi R (2004) Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 432(2):222-232.
56. Alvarez MN, Peluffo G, Piacenza L, & Radi R (2011) Intraphagosomal Peroxynitrite as a Macrophage-derived Cytotoxin against Internalized *Trypanosoma cruzi* CONSEQUENCES FOR OXIDATIVE KILLING AND ROLE OF MICROBIAL PEROXIREDOXINS IN INFECTIVITY. *Journal of Biological Chemistry* 286(8):6627-6640.
57. Hickman-Davis J, Gibbs-Erwin J, Lindsey JR, & Matalon S (1999) Surfactant protein A mediates mycoplasmacidal activity of alveolar macrophages by production of peroxynitrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(9):4953-4958.
58. Bose M, *et al.* (2012) Protection against peroxynitrite by pseudoperoxidase from *Leishmania major*. *Free Radical Biology and Medicine* 53(10):1819-1828.
59. Moncada S & Higgs E (2006) Nitric oxide and the vascular endothelium. *The vascular endothelium I*, (Springer), pp 213-254.
60. Ríos N, Prolo C, Álvarez MN, Piacenza L, & Radi R (2017) Peroxynitrite Formation and Detection in Living Cells. *Nitric Oxide (Third Edition)*, (Elsevier), pp 271-288.
61. Peluffo G, Calcerrada P, Piacenza L, Pizzano N, & Radi R (2009) Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 296(6):H1781-H1792.
62. Augusto O, *et al.* (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radical Biology and Medicine* 32(9):841-859.
63. Koppenol W, Moreno J, Pryor WA, Ischiropoulos H, & Beckman J (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chemical research in toxicology* 5(6):834-842.

64. Radi R (2013) Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Accounts of chemical research* 46(2):550-559.
65. Goldstein S & Czapski G (1995) The reaction of NO· with O₂⁻ and HO₂⁻: A pulse radiolysis study. *Free Radical Biology and Medicine* 19(4):505-510.
66. Radi R (2013) Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *Journal of Biological Chemistry* 288(37):26464-26472.
67. Radi R, Beckman JS, Bush KM, & Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 266(7):4244-4250.
68. Marla SS, Lee J, & Groves JT (1997) Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(26):14243-14248.
69. Koppenol W (1998) The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free radical biology and medicine* 25(4):385-391.
70. Tsai J-HM, *et al.* (1994) Role of conformation of peroxynitrite anion (ONOO⁻) with its stability and toxicity. *Journal of the American Chemical Society* 116(9):4115-4116.
71. Koppenol WH & Kissner R (1998) Can O⁻NOOH Undergo Homolysis? *Chemical research in toxicology* 11(2):87-90.
72. Koppenol WH (1998) Peroxynitrite uncloaked? *Chemical research in toxicology* 11(7):716.
73. Mahoney LR (1970) Evidence for the formation of hydroxyl radicals in the isomerization of pernitrous acid to nitric acid in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* 92(17):5262-5263.
74. Halfpenny E & Robinson P (1952) 169. The nitration and hydroxylation of aromatic compounds by pernitrous acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*:939-946.
75. Blough NV & Zafiriou OC (1985) Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. *Inorganic Chemistry* 24(22):3502-3504.
76. Ferrer-Sueta G & Radi R (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS chemical biology* 4(3):161-177.
77. Hughes M & Nicklin H (1968) The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical*:450-452.
78. Moncada S, Palmer RM, & Higgs E (1988) The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12(4):365-372.
79. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, & Chaudhuri G (1988) Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 244(1):181-189.
80. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, & Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(4):1620-1624.
81. Radi R, Beckman JS, Bush KM, & Freeman BA (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of biochemistry and biophysics* 288(2):481-487.
82. Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, & Radi R (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 333(1):49-58.
83. Lymar SV & Hurst JK (1995) Rapid reaction between peroxonitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity. *Journal of the American Chemical Society* 117(34):8867-8868.

84. Goldstein S & Czapski G (1997) The effect of bicarbonate on oxidation by peroxyxynitrite: implication for its biological activity. *Inorganic Chemistry* 36(22):5113-5117.
85. Ferrer-Sueta G, *et al.* (2018) Biochemistry of peroxyxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chemical reviews* 118(3):1338-1408.
86. Radi R (1998) Peroxyxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chemical research in toxicology* 11(7):720-721.
87. MacMillan-Crow L, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, & Thompson JA (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(21):11853-11858.
88. Demicheli V, *et al.* (2016) Mechanism of the reaction of human manganese superoxide dismutase with peroxyxynitrite: Nitration of critical tyrosine 34. *Biochemistry* 55(24):3403-3417.
89. Hannibal L, *et al.* (2016) Alternative conformations of cytochrome c: structure, function, and detection. *Biochemistry* 55(3):407-428.
90. Franco MC, *et al.* (2013) Nitration of Hsp90 induces cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(12):E1102-E1111.
91. Yermilov V, Rubio J, & Ohshima H (1995) Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxyxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS letters* 376(3):207-210.
92. Rubbo H, *et al.* (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxyxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry* 269(42):26066-26075.
93. Trostchansky A & Rubbo H (2008) Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Radical Biology and Medicine* 44(11):1887-1896.
94. Sies H (1985) Introductory remarks in Oxidative stress. (London: Academic Press).
95. Sies H & Jones D (2007) Encyclopedia of Stress, Fink G (ed). 2nd edn, vol. 3. (Elsevier, Amsterdam).
96. Sies H (2018) On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology* 7:122-126.
97. Peluffo G & Radi R (2007) Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovascular Research* 75(2):291-302.
98. Radi R, Cosgrove T, Beckman J, & Freeman B (1993) Peroxyxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochemical Journal* 290(1):51-57.
99. Prolo C, Rios N, Piacenza L, Álvarez MN, & Radi R (2018) Fluorescence and chemiluminescence approaches for peroxyxynitrite detection. *Free Radical Biology and Medicine* 128:59-68.
100. Wrona M, Patel K, & Wardman P (2005) Reactivity of 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrohodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine* 38(2):262-270.
101. Wrona M, Patel KB, & Wardman P (2008) The roles of thiol-derived radicals in the use of 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein as a probe for oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 44(1):56-62.
102. Yang D, Wang H-L, Sun Z-N, Chung N-W, & Shen J-G (2006) A highly selective fluorescent probe for the detection and imaging of peroxyxynitrite in living cells. *Journal of the American Chemical Society* 128(18):6004-6005.
103. Sun Z-N, *et al.* (2009) BODIPY-based fluorescent probe for peroxyxynitrite detection and imaging in living cells. *Organic letters* 11(9):1887-1890.
104. Peng T & Yang D (2010) HKGreen-3: a rhodol-based fluorescent probe for peroxyxynitrite. *Organic letters* 12(21):4932-4935.
105. Peng T, *et al.* (2014) Molecular imaging of peroxyxynitrite with HKGreen-4 in live cells and tissues. *Journal of the American Chemical Society* 136(33):11728-11734.

106. Hall DG (2006) *Structure, properties, and preparation of boronic acid derivatives. Overview of their reactions and applications* (John Wiley & Sons: Weinheim, Germany).
107. Hall DG (2019) Boronic acid catalysis. *Chemical Society Reviews* 48(13):3475-3496.
108. Keith W & Powell R (1969) Kinetics of decomposition of peroxyxynitrous acid. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical*:90-90.
109. Zielonka J, *et al.* (2012) Global profiling of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems high-throughput real-time analyses. *Journal of Biological Chemistry* 287(5):2984-2995.
110. Zielonka J, Sikora A, Joseph J, & Kalyanaraman B (2010) Peroxyxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide direct reaction with boronate-based fluorescent probe. *Journal of Biological Chemistry* 285(19):14210-14216.
111. Rios N, *et al.* (2016) Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxyxynitrite fluxes using fluorescein-boronate. *Free Radical Biology and Medicine* 101:284-295.
112. Kuivila HG & Wiles RA (1955) Electrophilic displacement reactions. VII. Catalysis by chelating agents in the reaction between hydrogen peroxide and benzeneboronic acid 1, 2, 3. *Journal of the American Chemical Society* 77(18):4830-4834.
113. Kuivila HG & Armour AG (1957) Electrophilic displacement reactions. IX. Effects of substituents on rates of reactions between hydrogen peroxide and benzeneboronic acid 1-3. *Journal of the American Chemical Society* 79(21):5659-5662.
114. Du Y L, Li M, & Wang B (2010) A fluorescent hydrogen peroxide probe based on a 'click' modified coumarin fluorophore. *Tetrahedron letters* 51(8):1152-1154.
115. Dickinson BC, Huynh C, & Chang CJ (2010) A palette of fluorescent probes with varying emission colors for imaging hydrogen peroxide signaling in living cells. *Journal of the American Chemical Society* 132(16):5906-5915.
116. Debowska K, *et al.* (2016) Characterization of fluorescein-based monoboronate probe and its application to the detection of peroxyxynitrite in endothelial cells treated with doxorubicin. *Chemical Research in Toxicology*.
117. Lin VS, Dickinson BC, & Chang CJ (2013) Boronate-based fluorescent probes: imaging hydrogen peroxide in living systems. *Methods in enzymology* 526:19.
118. Yu F, Song P, Li P, Wang B, & Han K (2012) A fluorescent probe directly detect peroxyxynitrite based on boronate oxidation and its applications for fluorescence imaging in living cells. *Analyst* 137(16):3740-3749.
119. Szabó C, Ischiropoulos H, & Radi R (2007) Peroxyxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 6(8):662-680.
120. Goss SP, Hogg N, & Kalyanaraman B (1999) The effect of α -tocopherol on the nitration of γ -tocopherol by peroxyxynitrite. *Archives of biochemistry and biophysics* 363(2):333-340.
121. Bartesaghi S, *et al.* (2017) Tyrosine oxidation and nitration in transmembrane peptides is connected to lipid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics* 622:9-25.
122. Brigelius-Flohé R, *et al.* (2002) The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *The American journal of clinical nutrition* 76(4):703-716.
123. Burton G & Ingold K (1981) Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of the American Chemical Society* 103(21):6472-6477.
124. Thompson MD & Cooney RV (2020) The Potential Physiological Role of γ -Tocopherol in Human Health: A Qualitative Review. *Nutrition and Cancer* 72(5):808-825.
125. Group ACPS (1994) The alpha-tocopherol, beta-carotene lung cancer prevention study: design, methods, participant characteristics, and compliance. *Annals of epidemiology* 4(1):1-10.

126. Klein EA, *et al.* (2011) Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama* 306(14):1549-1556.
127. Huang H-Y & Appel LJ (2003) Supplementation of diets with α -tocopherol reduces serum concentrations of γ - and δ -tocopherol in humans. *The Journal of nutrition* 133(10):3137-3140.
128. Lonn E, *et al.* (2005) Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *Jama* 293(11):1338-1347.
129. Devaraj S & Jialal I (2005) Failure of vitamin E in clinical trials: is gamma-tocopherol the answer? *Nutrition reviews* 63(8):290-293.
130. Devaraj S, Leonard S, Traber MG, & Jialal I (2008) Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. *Free Radical Biology and Medicine* 44(6):1203-1208.
131. Singh I, Turner A, Sinclair A, Li D, & Hawley J (2007) Effects of gamma-tocopherol supplementation on thrombotic risk factors. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 16(3):422-428.
132. Christen S, *et al.* (1997) γ -Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO_x and complements α -tocopherol: physiological implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(7):3217-3222.
133. Cooney RV, *et al.* (1995) Products of γ -tocopherol reaction with NO₂ and their formation in rat insulinoma (RINm5F) cells. *Free Radical Biology and Medicine* 19(3):259-269.
134. Du L, Li M, Zheng S, & Wang B (2008) Rational design of a fluorescent hydrogen peroxide probe based on the umbelliferone fluorophore. *Tetrahedron letters* 49(19):3045-3048.
135. Murphy MP & Smith RA (2007) Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47:629-656.
136. Miyaura N & Suzuki A (1995) Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. *Chemical reviews* 95(7):2457-2483.
137. Thompson AL, Kabalka GW, Akula MR, & Huffman JW (2005) The conversion of phenols to the corresponding aryl halides under mild conditions. *Synthesis* (4):547-550.
138. Cochemé HM, *et al.* (2011) Measurement of H₂O₂ within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell metabolism* 13(3):340-350.
139. Podgoršek A, Stavber S, Zupan M, & Iskra J (2006) Visible light induced 'on water' benzylic bromination with N-bromosuccinimide. *Tetrahedron letters* 47(7):1097-1099.
140. Zhang Y-K, *et al.* (2012) Benzoxaborole antimalarial agents. Part 2: Discovery of fluoro-substituted 7-(2-carboxyethyl)-1, 3-dihydro-1-hydroxy-2, 1-benzoxaboroles. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 22(3):1299-1307.
141. Li JJ (2006) Blanc chloromethylation. *Name Reactions: A Collection of Detailed Reaction Mechanisms*:61-62.
142. Arnáiz FJ (1995) A convenient way to generate hydrogen chloride in the freshman lab. *Journal of chemical education* 72(12):1139.
143. Li JJ (2010) *Name reactions: a collection of detailed mechanisms and synthetic applications* (Springer Science & Business Media).
144. Jeon M-K, Kang M-K, & Park KH (2012) 7-Triazolylcoumarin-based fluorescent tag system for stepwise, comparative assessment of small molecule microarrays. *Tetrahedron* 68(30):6038-6053.
145. Fonseca AS, Gonçalves MST, & Costa SP (2012) Phenacyl ester derivatives bearing heterocycles as models for photocleavable linkers: synthesis and photolysis studies. *Tetrahedron* 68(38):8024-8032.

146. Zak J, *et al.* (2012) Establishing a Flow Process to Coumarin-8-Carbaldehydes as Important Synthetic Scaffolds. *Chemistry—A European Journal* 18(32):9901-9910.
147. Saha A, Goldstein S, Cabelli D, & Czapski G (1998) Determination of optimal conditions for synthesis of peroxyxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite. *Free Radical Biology and Medicine* 24(4):653-659.
148. Crawford AG, *et al.* (2012) Synthesis of 2- and 7-Functionalized Pyrene Derivatives: An Application of Selective C-H Borylation. *Chemistry-A European Journal* 18(16):5022-5035.
149. Yang W, He H, & Drueckhammer DG (2001) Computer-guided design in molecular recognition: design and synthesis of a glucopyranose receptor. *Angewandte Chemie International Edition* 40(9):1714-1718.
150. Sivakumar K, *et al.* (2004) A fluorogenic 1, 3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes. *Organic letters* 6(24):4603-4606.
151. Himo F, *et al.* (2005) Copper (I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society* 127(1):210-216.
152. Kobayashi Y, Morita M, Ogawa N, Kondo D, & Tojo T (2016) Asymmetric synthesis of 12-hydroxyheptadecatrienoic acid and its 5, 6-dihydro- and 14, 15-dehydro-derivatives. *Organic & biomolecular chemistry* 14(45):10667-10673.
153. Mukherjee A & Liu R-S (2011) Chemoselectivities in the platinum-catalyzed hydrative carbocyclizations of oxo-alkyne-nitrile functionalities. *Organic letters* 13(4):660-663.
154. Tian WQ & Wang YA (2004) Mechanisms of Staudinger reactions within density functional theory. *The Journal of organic chemistry* 69(13):4299-4308.
155. Pathigoolla A, Pola RP, & Sureshan KM (2013) A versatile solvent-free azide-alkyne click reaction catalyzed by in situ generated copper nanoparticles. *Applied Catalysis A: General* 453:151-158.
156. Patente (2013).
157. Nieves I, Abad J-L, Montes LR, Goñi FM, & Delgado A (2016) Approaches to polyunsaturated sphingolipids: new conformationally restrained analogs with minimal structural modifications. *Tetrahedron* 72(5):605-612.
158. Darses B, *et al.* (2012) Expedient construction of the [7-5-5] all-carbon tricyclic core of the Daphniphyllum alkaloids daphnilongeranin B and daphniyunnine D. *Organic letters* 14(7):1684-1687.
159. Sjöback R, Nygren J, & Kubista M (1995) Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 51(6):L7-L21.
160. Heldt JR, Heldt J, Stoń M, & Diehl HA (1995) Photophysical properties of 4-alkyl- and 7-alkoxycoumarin derivatives. Absorption and emission spectra, fluorescence quantum yield and decay time. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 51(9):1549-1563.
161. Song W, *et al.* (2010) Inhibition of lung fluid clearance and epithelial Na⁺ channels by chlorine, hypochlorous acid, and chloramines. *Journal of Biological Chemistry* 285(13):9716-9728.
162. Dalcanale E & Montanari F (1986) Selective oxidation of aldehydes to carboxylic acids with sodium chlorite-hydrogen peroxide. *The Journal of Organic Chemistry* 51(4):567-569.
163. Kabeya LM, *et al.* (2013) 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine in hypochlorous acid and taurine chloramine scavenging assays: interference of dimethyl sulfoxide and other vehicles. *Analytical biochemistry* 437(2):130-132.
164. Mendes P (1993) GEPASI: a software package for modelling the dynamics, steady states and control of biochemical and other systems. *Computer applications in the biosciences: CABIOS* 9(5):563-571.

165. Mendes P (1997) Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends in biochemical sciences* 22(9):361-363.
166. Fiuzza B, *et al.* (2015) Impact of SIN-1-derived peroxyxynitrite flux on endothelial cell redox homeostasis and bioenergetics: protective role of diphenyl diselenide via induction of peroxiredoxins. *Free radical research* 49(2):122-132.
167. Turrens JF & Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J* 191:421-427.
168. Cassina A & Radi R (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxyxynitrite on mitochondrial electron transport. *Archives of biochemistry and biophysics* 328(2):309-316.
169. Brown GC (2001) Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1504(1):46-57.
170. Rassi A & Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *The Lancet* 375(9723):1388-1402.
171. Behmanesh S & Kempski O (2000) Mechanisms of endothelial cell swelling from lactacidosis studied in vitro. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 279(4):H1512-H1517.
172. Carballal S, Bartesaghi S, & Radi R (2014) Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxyxynitrite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1840(2):768-780.
173. Sikora A, *et al.* (2011) Reaction between peroxyxynitrite and boronates: EPR spin-trapping, HPLC analyses, and quantum mechanical study of the free radical pathway. *Chemical research in toxicology* 24(5):687-697.
174. Wardman P (2008) Chapter Fourteen-Methods to Measure the Reactivity of Peroxyxynitrite-Derived Oxidants Toward Reduced Fluoresceins and Rhodamines. *Methods in enzymology* 441:261-282.
175. Winterbourn CC (2014) The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1840(2):730-738.
176. Alvarez MN, Trujillo M, & Radi R (2002) Peroxyxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods in enzymology* 359:353-366.
177. Alvarez B, Ferrer-Sueta G, & Radi R (1998) Slowing of peroxyxynitrite decomposition in the presence of mannitol and ethanol. *Free Radical Biology and Medicine* 24(7):1331-1337.
178. Bertelli M & Brener Z (1980) Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of parasitology*:992-997.
179. Michalski R, *et al.* (2014) Real-time Measurements of Amino Acid and Protein Hydroperoxides Using Coumarin Boronic Acid. *Journal of Biological Chemistry* 289(32):22536-22553.
180. Otomo M (1965) Composition of the xylenol orange complexes of Fe⁺⁺⁺ and their application to the determination of iron or xylenol orange. *Bunseki Kagaku* 14(8):677-682.
181. Gay C, Collins J, & Gebicki JM (1999) Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Analytical biochemistry* 273(2):149-155.
182. Jessup W, Dean RT, & Gebicki JM (1994) [29] Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins. *Methods in Enzymology*, (Elsevier), Vol 233, pp 289-303.
183. Halliwell B & Gutteridge JM (2015) *Free radicals in biology and medicine* (Oxford University Press, USA).
184. Wright A, Bubb WA, Hawkins CL, & Davies MJ (2002) Singlet Oxygen-mediated Protein Oxidation: Evidence for the Formation of Reactive Side Chain Peroxides on Tyrosine Residues¶. *Photochemistry and photobiology* 76(1):35-46.

185. Kato Si, Ishihara T, & Mashio F (1970) Structure and Property of Hydroperoxide in Solution. *Bulletin of The Japan Petroleum Institute* 12:117-122.
186. Winterbourn CC, Parsons-Mair HN, Gebicki S, Gebicki JM, & Davies MJ (2004) Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides. *Biochemical Journal* 381(1):241-248.
187. Reyes AM, *et al.* (2011) Oxidizing substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 51(2):464-473.
188. Dickinson BC & Chang CJ (2008) A targetable fluorescent probe for imaging hydrogen peroxide in the mitochondria of living cells. *Journal of the American Chemical Society* 130(30):9638-9639.
189. Sikora A, Zielonka J, Lopez M, Joseph J, & Kalyanaraman B (2009) Direct oxidation of boronates by peroxyxynitrite: mechanism and implications in fluorescence imaging of peroxyxynitrite. *Free radical biology & medicine* 47(10):1401-1407.
190. Zielonka J, Sikora A, Joseph J, & Kalyanaraman B (2010) Peroxyxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe. *The Journal of biological chemistry* 285(19):14210-14216.
191. Rios N, *et al.* (2016) Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxyxynitrite fluxes using fluorescein-boronate. *Free radical biology & medicine* 101:284-295.
192. Espenson JH (1995) *Chemical kinetics and reaction mechanisms*.
193. Trujillo M, Ferrer-Sueta G, & Radi R (2008) Kinetic studies on peroxyxynitrite reduction by peroxiredoxins. *Methods in enzymology*, (Elsevier), Vol 441, pp 173-196.
194. Sikora A, *et al.* (2013) Reaction between peroxyxynitrite and triphenylphosphonium-substituted arylboronic acid isomers: identification of diagnostic marker products and biological implications. *Chemical research in toxicology* 26(6):856-867.
195. Zielonka J, Joseph J, Sikora A, & Kalyanaraman B (2013) Real-time monitoring of reactive oxygen and nitrogen species in a multiwell plate using the diagnostic marker products of specific probes. *Methods in enzymology*, (Elsevier), Vol 526, pp 145-157.
196. Zielonka J, *et al.* (2016) Mitigation of NADPH oxidase 2 activity as a strategy to inhibit peroxyxynitrite formation. *Journal of Biological Chemistry* 291(13):7029-7044.
197. Maghzal GJ, *et al.* (2014) Assessment of myeloperoxidase activity by the conversion of hydroethidine to 2-chloroethidium. *Journal of Biological Chemistry* 289(9):5580-5595.
198. Zielonka J, Joseph J, Sikora A, & Kalyanaraman B (2013) Real-time monitoring of reactive oxygen and nitrogen species in a multiwell plate using the diagnostic marker products of specific probes. in *Methods in enzymology*, pp 145-157.
199. Zielonka J, Sikora A, Adamus J, & Kalyanaraman B (2015) Detection and differentiation between peroxyxynitrite and hydroperoxides using mitochondria-targeted arylboronic acid. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1264:171-181.
200. Zielonka J, *et al.* (2016) Mitigation of NADPH Oxidase 2 Activity as a Strategy to Inhibit Peroxyxynitrite Formation. *J Biol Chem* 291(13):7029-7044.
201. Bakhmutova-Albert EV, Yao H, Denevan DE, & Richardson DE (2010) Kinetics and mechanism of peroxyxynitrite formation. *Inorganic chemistry* 49(24):11287-11296.
202. Truzzi DR & Augusto O (2017) Influence of CO₂ on hydroperoxide metabolism. *Hydrogen peroxide metabolism in health and disease*:81-99.
203. Zielonka J & Kalyanaraman B (2010) Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free radical biology & medicine* 48(8):983-1001.
204. Zielonka J, *et al.* (2017) Recent Developments in the Probes and Assays for Measurement of the Activity of NADPH Oxidases. *Cell Biochem Biophys* 75(3-4):335-349.

205. Zielonka J, Vasquez-Vivar J, & Kalyanaraman B (2008) Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: A unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nature Protocols* 3(1):8-21.
206. Kalyanaraman B, Dranka BP, Hardy M, Michalski R, & Zielonka J (2014) HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes--the ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection. *Biochim Biophys Acta - General Subjects* 1840(2):739-744.
207. Zhao H, *et al.* (2005) Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(16):5727-5732.
208. Zhao H, *et al.* (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free radical biology & medicine* 34(11):1359-1368.
209. Michalski R, Michalowski B, Sikora A, Zielonka J, & Kalyanaraman B (2014) On the use of fluorescence lifetime imaging and dihydroethidium to detect superoxide in intact animals and ex vivo tissues: a reassessment. *Free radical biology & medicine* 67:278-284.
210. Zielonka J, Sarna T, Roberts JE, Wishart JF, & Kalyanaraman B (2006) Pulse radiolysis and steady-state analyses of the reaction between hydroethidine and superoxide and other oxidants. *Archives of biochemistry and biophysics* 456(1):39-47.
211. Keefer LK, Nims RW, Davies KM, & Wink DA (1996) "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1, 2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods in enzymology*, (Elsevier), Vol 268, pp 281-293.
212. Hardy M, *et al.* (2018) Detection and characterization of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems by monitoring species-specific products. *Antioxidants & redox signaling* 28(15):1416-1432.
213. Zielonka J, Zhao H, Xu Y, & Kalyanaraman B (2005) Mechanistic similarities between oxidation of hydroethidine by Fremy's salt and superoxide: stopped-flow optical and EPR studies. *Free Radical Biology and Medicine* 39(7):853-863.
214. Zielonka J, Hardy M, & Kalyanaraman B (2009) HPLC study of oxidation products of hydroethidine in chemical and biological systems: ramifications in superoxide measurements. *Free Radical Biology and Medicine* 46(3):329-338.
215. Van Gelder B & Slater E (1962) The extinction coefficient of cytochrome c. *Biochimica et biophysica acta* 58(3):593-595.
216. Alvarez MN, Trujillo M, & Radi R (2002) Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods in enzymology* 359:353-366.
217. Koto T, Michalski R, Zielonka J, Joseph J, & Kalyanaraman B (2014) Detection and identification of oxidants formed during •NO/ O₂•- reaction: A multi-well plate CW-EPR spectroscopy combined with HPLC analyses. *Free Radical Research* 48(4):478-486.
218. Cheng G, *et al.* (2018) Detection of mitochondria-generated reactive oxygen species in cells using multiple probes and methods: Potentials, pitfalls, and the future. *J Biol Chem* 293(26):10363-10380.
219. Talib J, Maghzal GJ, Cheng D, & Stocker R (2016) Detailed protocol to assess in vivo and ex vivo myeloperoxidase activity in mouse models of vascular inflammation and disease using hydroethidine. *Free radical biology & medicine* 97:124-135.
220. Maghzal GJ, *et al.* (2014) Assessment of myeloperoxidase activity by the conversion of hydroethidine to 2-chloroethidium. *J Biol Chem* 289(9):5580-5595.
221. Rios N, Radi R, Kalyanaraman B, & Zielonka J (2020) Tracking isotopically labeled oxidants using boronate-based redox probes. *Journal of Biological Chemistry* 295(19):6665-6676.

222. Mahdavian E, Sangsura S, Landry G, Eytina J, & Salvatore BA (2009) A novel synthesis of tocopheryl amines and amides. *Tetrahedron Letters* 50(1):19-21.
223. Ahmed V, Liu Y, Silvestro C, & Taylor SD (2006) Boronic acids as inhibitors of steroid sulfatase. *Bioorganic & medicinal chemistry* 14(24):8564-8573.
224. Patent (2006) 1710239A1 E.
225. Hyatt JA (2007) Convenient Preparation of 2, 7, 8-Trimethyl-6-hydroxychroman-2-carboxylic Acid (γ -Trolox). *Synthetic Communications* 38(1):8-14.
226. Bartesaghi S, *et al.* (2006) Mechanistic studies of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration in membranes using the hydrophobic probe Nt-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester. *Biochemistry* 45(22):6813-6825.
227. Hidaka AIYKT (2006).
228. Chen W, *et al.* (2012) Synthesis and screening of novel vitamin E derivatives for anticancer functions. *European journal of medicinal chemistry* 58:72-83.
229. Zielonka J, *et al.* (2012) Boronate probes as diagnostic tools for real time monitoring of peroxynitrite and hydroperoxides. *Chemical research in toxicology* 25(9):1793-1799.