

Estudio de variables experimentales en la cuantificación de especies reactivas de oxígeno mediante el empleo de sondas fluorescentes

Alejandra Ruiz Parrado. Clara Torralbo Rodríguez.

Licenciatura de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
aruizparrado@gmail.com

Víctor González-Ruiz. Ana I Olives. M Antonia Martín.

S. D. de Química Analítica, Facultad de Farmacia de la UCM.
mantonia@farm.ucm.es

Resumen: En el metabolismo aeróbico de las células se producen especies reactivas del oxígeno (ROS, **R**eadive **O**xigen **S**pecies) que juegan papeles clave tanto en su funcionamiento normal como en el desarrollo de procesos patológicos. Por ello, la búsqueda de métodos analíticos que permitan su cuantificación es un campo de creciente interés. Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de la influencia de distintas variables experimentales que afectan a la detección de ROS mediante el empleo de sensores fluorescentes. Como primera etapa, se han optimizado las condiciones instrumentales y de reacción para la cuantificación de glucosa mediada por ROS.

Palabras clave: Especies reactivas de oxígeno. Sensores fluorescentes. Técnicas de cribado de alto rendimiento.

INTRODUCCIÓN

Significación biológica de las especies reactivas de oxígeno

Los ROS se caracterizan por su alta capacidad oxidante⁽¹⁾ y entre ellos se encuentran radicales hidroxilos, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, generados principalmente en la respiración celular y la actividad de enzimas como el citocromo P-450, la flavoprotein-oxidasa y enzimas⁽²⁾. La presencia de estas ROS en el organismo cumple funciones fisiológicas, ya que intervienen en la proliferación celular como segundos mensajeros y pueden activar el receptor para el factor de crecimiento epitelial. Además, pueden inducir o reprimir factores de transcripción en función de su concentración e intervienen en la respuesta inmunitaria y la apoptosis⁽²⁾. Igualmente ejercen una acción importante a nivel de los endotelios vasculares en el control de la presión sanguínea⁽³⁾.

Sin embargo, cuando los niveles de estas especies en el organismo son excesivos, se llega a un estado celular de estrés oxidativo, que puede desencadenar distintos procesos patológicos⁽²⁾ relacionados con el envejecimiento, mutaciones, carcinogénesis, procesos degenerativos como el Alzheimer⁽⁴⁾ o enfermedades cardiovasculares como la arterioesclerosis⁽¹⁾. Para regular sus concentraciones y mantener el equilibrio homeostático, el organismo dispone de distintos mecanismos de eliminación de ROS tanto enzimáticos (catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) como no enzimáticos (metales; tioles como el péptido glutatión; algunas vitaminas y compuestos fitoquímicos como isoflavonas, polifenoles y flavonoides).

Como consecuencia de todo ello, existe un interés creciente por el desarrollo de métodos que permitan cuantificar los niveles de ROS en tejidos y compartimentos celulares para poder correlacionarlos con la aparición de determinadas patologías, así como en estudios que demuestren la eficacia de xenobióticos antioxidantes en la prevención de las patologías asociadas al estrés oxidativo.

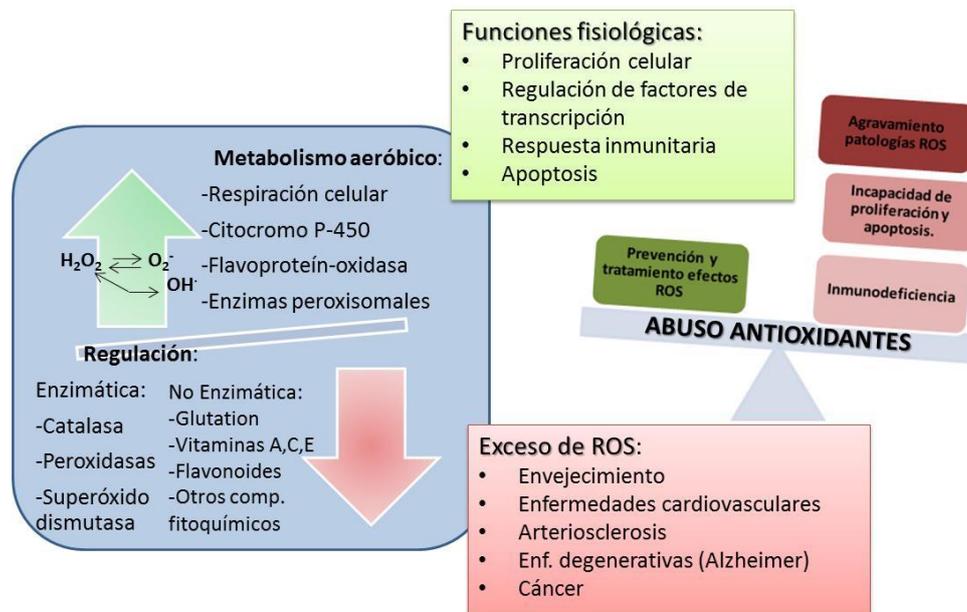


Figura 1. Esquema de los mecanismos de producción, regulación y eliminación de las ROS.

Metodologías para la determinación analítica de los niveles de ROS

La mayoría de las metodologías empleadas para la determinación de ROS implican el empleo de sensores fluorescentes debido a su gran sensibilidad⁽⁵⁾. Estos compuestos son capaces de detectar actividad oxidativa en células y tejidos, pero en mayoría de los casos es difícil establecer cuál es la especie oxidante responsable de la oxidación del sensor. Otro aspecto a considerar es que los sensores presenten un adecuado balance hidrofilia/lipofilia como para que les sea posible solubilizarse en el entorno celular y atravesar las membranas celulares para así llegar al interior citoplasmático y/o a determinados orgánulos celulares.

Algunos sensores son productos comerciales. La detección y cuantificación de ROS se basa en la utilización de compuestos no fluorescentes fácilmente oxidables por acción de los ROS dando lugar a los correspondientes derivados oxidados que presentan fluorescencia. Por ejemplo, el dihidroetidio, la dihidrorodamina, diclorodihidrofluoresceína⁽⁶⁾ y dihidroxifenoxazina originan sus correspondientes derivados oxidados por medio de ROS (Fig. 2).

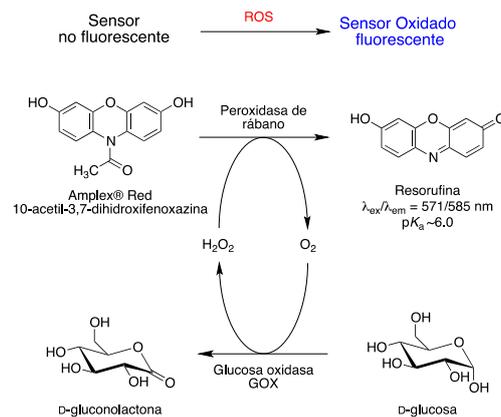


Figura 2. Esquema de reacción del Amplex Red.

La utilización de boronatos aromáticos se ha propuesto más recientemente. Se caracterizan por la unión de un fluoróforo a un resto de ácido borónico. Estos derivados en presencia de las ROS pierden el resto de ácido borónico y forman el correspondiente derivado fenólico que exhibe fluorescencia^(7,8,9). El rendimiento de la reacción es elevado, pero las constantes de reacción son bajas⁽¹⁰⁾. Otra alternativa son las reacciones quimioluminiscentes. En éstas es posible su cuantificación de las ROS a través de la quimioluminiscencia desarrollada. Los derivados de *N*-metilacridinio se oxidan enzimáticamente a *N*-metilacridona en estado excitado que se desactivará emitiendo quimioluminiscencia⁽¹¹⁾ (Fig. 3)

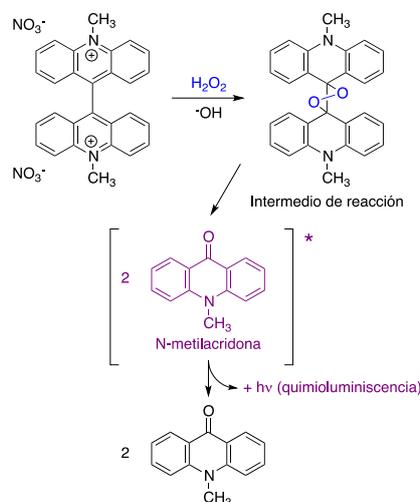


Figura 3. Esquema de reacción quimioluminiscente de la lucigenina.

OBJETIVOS

Nos hemos propuesto desarrollar metodologías analíticas que permitan la detección sensible de los ROS en medios biológicos. Nos valdremos de la espectrofluorimetría para la determinación de peróxido de hidrógeno como ROS modelo en el entorno intra- y extracelular. En combinación con las ventajas analíticas que ofrecen las metodologías de alto rendimiento (**High Throughput Screening**, HTS), proponemos la aplicación de este tipo de técnicas para la cuantificación de glucosa y otros compuestos de interés biológico.

PARTE EXPERIMENTAL

Se ha utilizado un kit comercial que comprende el tampón de reacción, la glucosa, el sensor de ROS (Amplex Red), y las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 30 min, al menos un control negativo sin glucosa y otro positivo de peróxido de hidrógeno. La fluorescencia ha sido determinada con un fluorímetro Fluoromax 4P (Horiba Jobin Yvon) equipado con un lector de placas multipocillo MicroMax. Las medidas se llevaron a cabo $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 571/585 nm, correspondientes a los máximos de fluorescencia de la resorufina, el producto de oxidación del Amplex Red. Se estudió la influencia de diversas variables experimentales, tales como tiempo de reacción, anchura de rendija del monocromador y tiempo de integración del detector, con la finalidad de optimizar las condiciones instrumentales para mejorar la sensibilidad analítica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Amplex Red es un compuesto incoloro fácilmente oxidable en presencia de peróxido de hidrógeno que da lugar a la resorufina, en una reacción catalizada por la peroxidasa (Figura 2).

La espectrofluorimetría es una técnica muy sensible, y combinada con un sistema de lectura de alto rendimiento (HTS, Fig. 4) permite analizar numerosas muestras en poco tiempo. Además supone un considerable ahorro, ya que se utilizan volúmenes de muestra muy reducidos. Por otra parte, el equipo puede funcionar de manera autónoma reduciendo los errores experimentales y con un considerable ahorro de tiempo y de mano de obra.

Se estudió la evolución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de incubación de los medios de reacción. En la Figura 5, se observa un incremento paulatino en la intensidad de fluorescencia hasta alcanzarse la zona “meseta” para un

tiempo de reacción de 80-90 minutos; sin embargo, pueden obtenerse medidas de fluorescencia altamente reproducibles a tiempos de reacción inferiores, por ello para los análisis cuantitativos se seleccionó un tiempo de medida de 30 minutos.

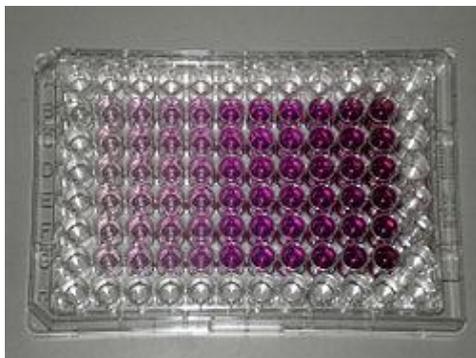


Figura 4. Placa con 96 pocillos conteniendo los medios de reacción.

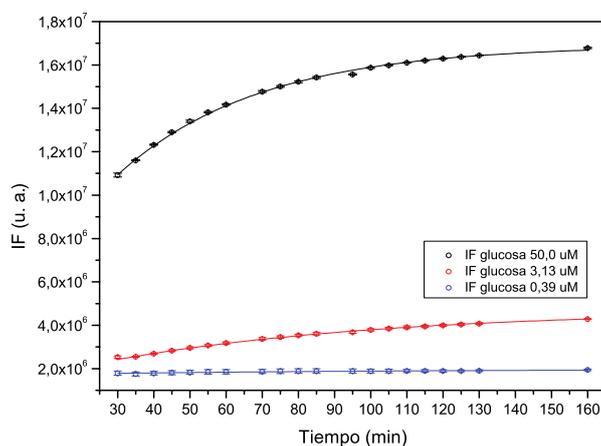


Figura 5. Cinética de la reacción del Amplex Red con glucosa.

Para mejorar la sensibilidad se puede incrementar el ancho de la rendija del monocromador. Para estudiar la influencia de este parámetro instrumental se ensayaron 3 valores de anchura de rendija. Como se puede apreciar en la Fig. 6 a mayor valor de anchura de rendija se incrementa la IF medida dado que la potencia radiante que recoge la sonda de fibra óptica es considerablemente mayor. Para el mayor valor de anchura de rendija (7 nm) la IF desarrollada es tan elevada que satura el fotomultiplicador. Finalmente, las condiciones de medida optimizadas se aplicaron a la determinación cuantitativa de glucosa. En la Figura 7 se presenta las curvas de calibrado obtenidas para el intervalo de concentraciones de 0-3 μ M.

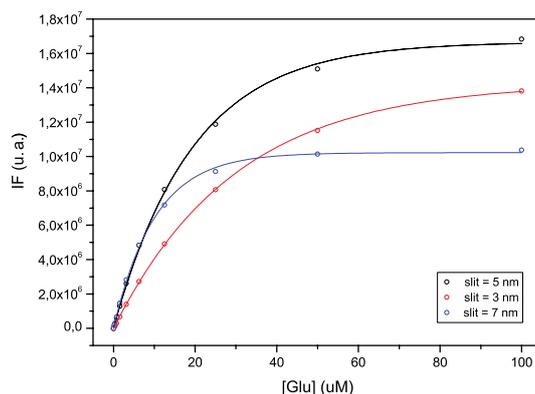


Figura 6. Efecto de la anchura de rendija del monocromador en la intensidad de fluorescencia.

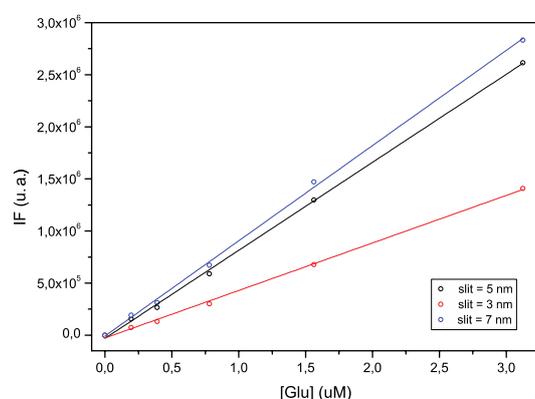


Figura 7. Rectas de calibrado obtenidas en la cuantificación de glucosa mediada por ROS.

CONCLUSIONES

Se han optimizado las condiciones experimentales para la detección de ROS en muestras biológicas mediante el empleo de Amplex Red como sensor fluorescente. Se ha obtenido una respuesta analítica con buenos valores de sensibilidad y linealidad. El tiempo de reacción es adecuado (30 min) y el empleo de formato de placas multipocillo para llevar a cabo los ensayos permite el análisis de un elevado número de muestras con un reducido consumo de tiempo y reactivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kohen R, Nyska, A. Toxicologic Pathology. 2002; 30: 620-650.
2. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. Journal of Nutritional Biochemistry. 2007; 18:567-579.

3. Touyz RM. Reactive Oxygen Species, Vascular oxidative stress and redox signaling in Hypertension: what is the clinical significance?. *Journal of the American Heart Association*. 2004; 44:248-252.
4. Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B. Redox-optimized ROS balance: A unifying hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1797:865-877.
5. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJA, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts II LJ, Ischiropoulos H, *Free Radical Biology and Medicine*. 2012; 52:1-6.
6. Yang D, Wang HL, Sun ZN, Chung NW, Shen JG. *Journal of the American Chemical Society*. 2006; 128:6004-6005.
7. Chang MCY, Pralle A, Isacoff EY, Chang CJ. *Journal of the American Chemical Society*. 2004; 126, 15392-15393.
8. EW Miller, Albers AE, Pralle A, Isacoff EY, Chang CJ. *Journal of the American Chemical Society*, 2005; 127, 16652-16659.
9. Albers E, Okreglak VS, Chang CJ. *Journal of the American Chemical Society*. 2006; 128, 9640-9641.
10. Srikun D, Miller EW, Domaille DW, Chang CJ, *Journal of the American Chemical Society*. 2008; 130, 4596-4597.
11. Uy B, McGlashan SR, Shaikh SB, *Journal of Biomolecular Techniques*. 2011; 22, 95-107.
12. Li X, Zhang G, Ma H, Zhang D, Li J, Zhu D. *Journal of the American Chemical Society*, 2004; 126, 11543-11548.

Recibido: 16 marzo 2012.

Aceptado: 16 diciembre 2013.