

Informe final publicable de proyecto

Desarrollo de una sonda fluorescente roja con aplicación en bioimagenología de procesos redox

Código de proyecto ANII: FMV_3_2022_1_172574

Fecha de cierre de proyecto: 01/11/2025

RÍOS CRESSERI, Natalia Ruth (Responsable Técnico - Científico)

CRUZ RAMIREZ, Luis Alfredo (Investigador)

PEREYRA DOMENECH, Josefina (Investigador)

PIACENZA BENGOCHEA, María Lucía (Investigador)

PROLO BUZZALINO, Carolina (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\\

MOLECULAR AND DEVELOPMENTAL COMPLEXITY GROUP, UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA (LANGE BIO) \\\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA

Resumen del proyecto

Las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno son producidas como consecuencia del metabolismo aeróbico normal, interviniendo en diferentes procesos como la regulación del metabolismo y en la respuesta inmune frente a patógenos, sin embargo, la formación y acumulación de productos oxidados en biomoléculas como proteínas y lípidos se observa en varios estados patológicos. El peroxinitrito producto de la reacción entre los radicales superóxido y óxido nítrico, es una especie altamente reactiva que puede conducir a eventos citotóxicos y muerte celular. Desde el reconocimiento de su formación, en organismos vivos y su relevancia como mediador en procesos patológicos, se han desarrollado una variedad de técnicas para su detección. Sin embargo, la mayoría de las sondas reportadas e incluso comercializadas actualmente, carecen de una apropiada validación fisicoquímica y biológica, además de presentar limitantes debido a la falta de especificidad. Existe una alta demanda en el área de la biomedicina de contar con métodos sensibles y confiables para la detección y cuantificación de especies oxidantes en sistemas biológicos.

Este trabajo se centró en el desarrollo de una sonda molecular fluorescente (Red-BI), con posibilidad de transferencia tecnológica, diseñada como una herramienta para la detección de especies reactivas de relevancia biológica con óptimas propiedades espectroscópicas tales que permiten su utilización en bioimagenología de procesos redox in vitro, in cellula, e in vivo. Esto permitirá establecer el rol de las especies oxidantes durante procesos de gran importancia en biomedicina, como la regeneración de tejidos, donde se conoce que en etapas tempranas del proceso de regeneración hay un aumento en la producción de óxido nítrico. Esta herramienta de detección será de gran utilidad para el avance del conocimiento en biomedicina.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Medicina Química / Química médica

Palabras clave: Sondas / Fluorescencia / Detección /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Desde los años 80s se comienza 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, carcinogénesis, enfermedades neurodegenerativas y muchos otros (1). Está bien establecido que las especies reactivas del oxígeno intervienen en la regulación del metabolismo y en la respuesta inmune frente a patógenos, sin embargo, 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. El peroxinitrito ($\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$), es una especie altamente reactiva, producto de la reacción radicalaria controlada por difusión entre superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), formando al anión no radicalar (ONOO^-) (2). Es un potente oxidante y un nucleófilo fuerte, con una química intrincada, la cual depende del pH, pudiendo seguir vías radicalares, o participar en reacciones directas generando oxidaciones a múltiples blancos biológicos, lo que puede conducir a eventos citotóxicos y provocar la muerte celular (3). A su vez, genera especies radicalarias secundarias que actúan como potentes oxidantes, como los radicales $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{NO}_2$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$ que pueden dañar proteínas, lípidos y ADN mediante reacciones de hidroxilación, oxidación y nitración (4). Desde el reconocimiento de su formación en organismos vivos y su relevancia como mediador en procesos patológicos, se han desarrollado varias estrategias para su detección y cuantificación basadas en diferentes principios. Algunos ejemplos incluyen, immuno-spin trapping, sondas quimioluminiscentes y fluorescentes, sensores electroquímicos e incluso sondas codificadas genéticamente. 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. La mayoría de las sondas fluorescentes reportadas para la medición de peroxinitrito dependen de la reacción con sus radicales secundarios derivados ($\text{CO}_3^{\bullet-}$, $\bullet\text{NO}_2$, $\bullet\text{OH}$), siendo la falta de especificidad la mayor limitante (5). Sin embargo, en estos últimos 10 años se ha desarrollado un nuevo conjunto de sondas electrofílicas que reaccionan directamente con peroxinitrito (ONOO^-), haciendo que el proceso de detección sea directo y selectivo, lo que posibilita su cuantificación. Su mecanismo de reacción en la detección de peroxinitrito y otros oxidantes nucleofílicos presentes en medios 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. Los grupos funcionales electrofílicos que se han destacado ampliamente, son los boronatos (ácidos o ésteres fenilborónicos) (6-8), estudios realizados por nuestro grupo y otros, han demostrado que la reacción con peroxinitrito es extremadamente rápida ($k = 1\text{E}6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) rindiendo el correspondiente producto hidroxilado fluorescente (6-9).

En sistemas celulares donde coexisten varias especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, los boronatos son cinéticamente selectivos para la reacción con peroxinitrito, debido a que reaccionan un millón de veces más rápido con este oxidante que con H_2O_2 a pH fisiológico, y ~ 2500 veces más rápido con peroxinitrito que con HOCl ($k_{\text{ONOO}^-} \sim 1\text{E}6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{HOCl}} \sim 400\text{--}600 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{H}_2\text{O}_2} \sim 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (21-24).

Anteriormente realizamos un estudio mecanístico a nivel atómico con oxidantes marcados isotópicamente (O^{18}) para completar la elucidación del mecanismo de reacción de boronatos con oxidantes de relevancia biológica (9). Como resultado demostramos inequívocamente que la incorporación de átomos de oxígeno proviene del oxidante, eliminando así cualquier tipo de ambigüedad sobre la identidad de la especie que se va a detectar.

La gran mayoría de las sondas reportadas e incluso comercializadas actualmente, carecen de una apropiada validación fisicoquímica y biológica, principalmente respecto a la detección de peroxinitrito en sistemas celulares. Además existe una alta demanda en el área de la biomedicina de contar con métodos sensibles, conocidos y confiables para la detección y cuantificación de especies oxidantes en sistemas biológicos.

Previamente, hemos trabajado en el desarrollo y validación una sonda fluorescente derivada del fluoróforo fluoresceína con sustitución borónica (fluoresceína-boronato, FI-B) para la detección de peroxinitrito (7). Contar con la sonda FI-B como herramienta de detección es una gran ventaja siendo 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, e internacionales, dando lugar varias publicaciones arbitradas en revistas internacionales (7), (9- 16), presentaciones en eventos científicos y premios de organismos nacionales e internacionales.

Todo el trabajo previo, el análisis del estado del arte, y atendiendo a la alta demanda del área, nos permite avanzar hacia el diseño de nuevas sondas derivadas de boronatos que permitan visualizar fenómenos biológicos en sistemas vivos en tiempo real. Las ventajas de la bioimagenología fluorescente incluyen la detección altamente sensible con precisión temporal y resolución espacial bajo observación en el microscopio de epifluorescencia. Debido a la fluorescencia intrínseca de varios componentes celulares (autofluorescencia) es deseable que el fluoróforo posea una longitud de onda de excitación mayor. Es así que hemos seleccionado derivados de xanteno como fluoróforo, con longitudes de onda de excitación mayores a 500 nm de manera de no solaparse con la autofluorescencia (17).

En el presente proyecto nos planteamos el desarrollo de Red-B, como una nueva sonda fluorescente con propiedades espectroscópicas óptimas para la detección de peroxinitrito in vitro, in cellula, e in vivo. Red-B

mejorará las limitantes que posee la FI-B debido al efecto batocrómico del primero hacia mayores longitudes de onda respecto al fluoróforo de fluoresceína. Se trabajará en el diseño, síntesis y caracterización de dos sondas fluorescentes Red-B I y su análogo con elongación del sistema conjugado Red-B II. Dichas sondas derivadas de xanteno acoplan un ácido o éster borónico capaz de reaccionar rápidamente con peroxinitrito dando el correspondiente producto hidroxilado fluorescente con emisión a longitudes de onda mayores a 500 nm. Se hará una caracterización completa de ambas moléculas y la que cumpla con las propiedades deseadas será la candidata para continuar con los estudios in vivo. El desarrollo de la nueva sonda para peroxinitrito contribuirá al avance de varias líneas de investigación de nuestro laboratorio (interacción hospedero-patógeno, disfunción mitocondrial, enfermedades neurodegenerativas, entre otras). En colaboración con el Grupo de Complejidad Molecular y Desarrollo de la Unidad de Genómica Avanzada del CINVESTAV, México, se utilizará la sonda seleccionada Red-B I o Red-B II para su aplicación en un organismo modelo de regeneración de tejidos como el *Ambystoma mexicanum*, o ajolote. Dicho organismo es uno de los modelos en el estudio de la regeneración de extremidades más usado en el mundo, dada su alta capacidad regenerativa. El trabajo en colaboración permitió conocer que en etapas tempranas del proceso de regeneración hay un aumento en la producción de •NO utilizando la sonda comercial DAR-2. Si bien DAR-2 reacciona con •NO, no se descarta la posibilidad que también reaccione con peroxinitrito y otros peróxidos como ya fue reportado para la sonda análoga DAF (18). Debido a esto, y de manera de poder profundizar en los mecanismos sobre la producción y el rol de los oxidantes durante la regeneración de tejidos, es fundamental la síntesis de sondas específicas y sensibles que permitan discriminar entre éstos oxidantes. Los esfuerzos para el desarrollo de éstas sondas son esenciales y permitirán establecer el rol de los oxidantes producidos durante el proceso de regeneración de tejidos, órganos y extremidades de gran importancia en biomedicina.

Existen numerosos ejemplos exitosos de transferencia tecnológica del desarrollo de sondas de detección generadas en la academia, que actualmente son comercializadas por fabricantes multinacionales. Debido a la gran utilidad de los boronatos, recientemente estos compuestos se han incorporado a los catálogos de productos químicos de empresas líderes tales como Cayman Chemicals. Por ejemplo, el ácido cumarin-7-borónico (CBA) descrito como una sonda fluorescente para la detección de peroxinitrito por el grupo del Dr. Kalyanaraman (Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, EEUU), es actualmente comercializada por Cayman Chemicals (<https://www.caymanchem.com/product/14051/coumarin-boronic-acid>).

Otros ejemplos de boronatos desarrollados en la academia para la detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y actualmente comercializadas por Cayman Chemicals son: FBBBE (<https://www.caymanchem.com/product/14606>) descrita por el grupo de investigación del Dr. Cohen (Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, EEUU), o MitoB reportada para la detección intramitocondrial de H_2O_2 por el Dr. Murphy (Medical Research Council Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK) (<https://www.caymanchem.com/product/17116>). Red-B podría ser candidata a una potencial patente de invención nacional dada su novedad y útil aplicación en el estudio de fenómenos biológicos de gran importancia biomédica. Asociarse desde la academia con empresas líderes en venta de productos químicos nos permitiría poder comercializar esta herramienta y hacer que sea accesible a un mayor número de usuarios que puedan aplicar esta tecnología para el avance del conocimiento en biomedicina.

Existe una alta demanda en el área de la biomedicina de contar con métodos sensibles, conocidos y confiables para un correcto y riguroso entendimiento del sistema en estudio tanto in vitro como in vivo. En este contexto, dada la relevancia del desarrollo de técnicas de detección, y la generación de moléculas nuevas como herramientas que nos permiten visualizar fenómenos biológicos, el presente proyecto se

enfoca en abordar este tema.

Este trabajo se centrará en el desarrollo de una sonda molecular fluorescente derivada de boronatos (Red-B), diseñada como una herramienta para la detección de especies reactivas de relevancia biológica con óptimas propiedades espectroscópicas tales que permitan su utilización en bioimagenología de procesos redox en sistemas vivos.

Esta herramienta tendrá alcance y aplicación desde las Ciencias Básicas, para en el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en diferentes procesos redox, hasta la Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa, los que aplicarán de manera directa los conocimientos técnicos generados. Será de suma utilidad para los integrantes de nuestro grupo, permitiéndoles avanzar en sus investigaciones y aportando al desarrollo de otras tesis. Además, permitirá la colaboración con diferentes grupos de investigación nacionales, de la región e internacionales. Asimismo, Red-B podría ser candidata a una patente de invención nacional dada su novedad y útil aplicación en el estudio de fenómenos biológicos. Potenciar la transferencia tecnológica desde la academia hacia empresas líderes en venta de productos químicos nos permitiría poder comercializar esta herramienta y hacer que sea accesible a un mayor número de usuarios que puedan aplicar esta tecnología para el avance del conocimiento en biomedicina.

Por lo tanto el Objetivo general del presente proyecto es: Desarrollo de una sonda molecular fluorescente derivada de boronatos (Red-B), diseñada como una herramienta para la detección de especies reactivas de relevancia biológica, con óptimas propiedades espectroscópicas, tales que permitan su utilización en bioimagenología de procesos redox en sistemas vivos.

Metodología/Diseño del estudio

Actividad 1.

Diseño, síntesis y elucidación estructural

Serie I.

La ruta sintética diseñada para la obtención de Red-B I involucra 5 pasos de reacción. En primer lugar, partiendo de 3-N,N-dietilaminofenol se hace reaccionar con bis(2,4,6-tricloro)malonato dando 7-dietilamino-4-hidroxycumarina (19), la cual se somete a hidrólisis en medio ácido para obtener acetofenona (17). Tratamiento de la acetofenona con resorcinol en medio ácido rinde el compuesto derivado de xanteno (17). Para la obtención del monotriflato se utiliza N-fenil-bis(trifluorometansulfonimida) como agente triflante y DIPEA (N,N-diisopropiletilamina) como base (7), posteriormente se somete a borilación bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki-Miyaura con bis(pinacolato)diboro, en medio básico con catalizador de Pd para dar el compuesto de interés Red-B I (20).

Alternativamente, se trabajará en la Serie II para obtener el derivado Red-B II.

Serie II.

En primera instancia se parte del ácido (2-bromometil)fenil borónico comercial para obtener el correspondiente benzaldehído del ácido fenilborónico utilizando nitrato de sodio como oxidante en medio básico (21). Posteriormente, se hace reaccionar el con el ácido formil-fenilborónico en anhídrido acético rinde para dar Red-B II (17).

Cada uno de los compuestos intermedios y los compuestos finales de interés, serán caracterizados estructuralmente mediante técnicas de espectroscopía de RMN (¹H, ¹³C, COSY, HSBC, HSQC) y espectrometría de masas (IE).

Actividad 2. Caracterización fisicoquímica y cinética

2.1 Evaluación de las propiedades espectroscópicas

Una vez obtenidos los compuestos de interés Red-B I y II evaluaremos sus propiedades espectroscópicas (longitud de onda de excitación/emisión, y rendimiento cuántico), y la reactividad frente a peroxinitrito. Para

ello se determina la emisión de fluorescencia tras la oxidación de Red-B por adiciones sucesivas de peroxinitrito (0-500 μM), evaluando el aumento de la fluorescencia emitida utilizando un espectrofluorímetro. Los rendimientos de oxidación serán obtenidos utilizando curvas de calibración de concentraciones conocidas de los productos oxidados fluorescentes Red-OH I o Red-OH II respectivamente.

2.2 Oxidación de Red-B por oxidantes de relevancia biológica: Análisis cinético

Se determinarán las constantes cinéticas (k) de la reacción de Red-B I y II con peroxinitrito y otros oxidantes nucleofílicos presentes en medios biológicos (HOCl , H_2O_2) bajo condiciones de pseudo-primer orden (exceso de 10 veces de sonda sobre el oxidante), a 25°C y 37°C a pH 7.4. Se realizará la técnica de cinética rápida de flujo detenido para la determinación la k de peroxinitrito con Red-B I y II (7).

Para cada concentración de compuesto se mide la fluorescencia en función del tiempo y se ajusta a una exponencial simple, obteniendo una constante cinética observada k_{obs} para cada concentración de compuesto. Las k_{obs} obtenidas, se grafican en función de la concentración ajustándose a una recta cuya pendiente es la k cinética de la reacción.

2.3. Efecto del oxígeno sobre la fluorescencia y estabilidad con pH.

Se estudiará la estabilidad de los fluoróforos sintetizados frente al oxígeno, midiendo la respuesta de fluorescencia frente a distintas presiones parciales de oxígeno. Además, se estudiará la respuesta fluorescente y su estabilidad frente a cambios de pH.

Actividad 3. Caracterización biológica

3.1 Ensayo de Citotoxicidad

Antes de evaluar la utilidad de Red-B I y II en la detección de peroxinitrito en modelos celulares, se realizarán ensayos de citotoxicidad en macrófagos. Se incuban a las células con diferentes concentraciones de los compuesto (1-1000 μM) por 24 h y posterior evaluación de: i) morfología celular; ii) incorporación de yoduro de propidio (pérdida de la integridad de la membrana plasmática) por citometría de flujo y iii) por determinación de la actividad de deshidrogenasas dependientes de flavinas mediante la reducción de la sal de tetrazolium MTT (bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) midiendo la absorbancia a 570 nm (22).

3.2 Detección de peroxinitrito en un modelos celulares.

Se evaluará la capacidad de Red-B I y II para la detección de peroxinitrito producido endógenamente en un modelo de macrófagos de línea celular J774A-1 estudiado en nuestro laboratorio (23). Los macrófagos serán activados con IFN- γ /LPS para la producción de $\bullet\text{NO}$ dependiente de la iNOS (400 unidades mL^{-1} y 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente) durante 5 horas y luego con un éster de forbol (PMA 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para la formación de $\text{O}_2\bullet^-$ a través de la NADPH oxidasa, en presencia de la sondas sondas Red-B I y II (concentración a definir en los ensayos de citotoxicidad). Se medirá la oxidación de la sonda en un fluorímetro de placas a 37°C durante 1 hora. Como controles se utilizaran los macrófagos sin activar, o estimulados para producir uno solo de los precursores de peroxinitrito ($\text{O}_2\bullet^-$ o $\bullet\text{NO}$), así como también macrófagos tratados con el inhibidor de la síntesis de $\bullet\text{NO}$, L-NAME (10 mM).

Por otro lado se evaluará la oxidación de Red-B en un modelo de infección por Trypanosoma cruzi, ya que los parásitos desencadenan una respuesta oxidativa en los macrófagos (24). Brevemente, los macrófagos serán inmunoestimulados para la inducción de la iNOS, y posteriormente infectados con tripomastigotas de T. cruzi (forma infectiva) precargados con la sonda durante 30 min en dPBS, a la vez. El curso temporal de la oxidación Red-B se seguirá en el lector de placas de fluorescencia a 37°C . También se analizará y cuantificará la fluorescencia obtenida por citometría de flujo. Por último, los macrófagos se analizarán por microscopía de epi-fluorescencia para evaluar la fluorescencia obtenida en las diferentes condiciones a nivel del parásito internalizado.

3.3 Bioimagenología en un modelo in vivo de regeneración de tejidos.

En colaboración con el Grupo de Complejidad Molecular y Desarrollo de la Unidad de Genómica Avanzada del CINVESTAV, México se evaluará la sonda seleccionada Red-BI o Red-B II para su aplicación en un modelo animal. Se utilizarán ajolotes de 2 a 3 cm de longitud los que se incubarán durante toda la noche en presencia la sonda Red-B, posteriormente, los animales se anestesian con benzocaína al 0,001%, y analizados por microscopía de fluorescencia confocal para evaluar la oxidación de la sonda in vivo, donde se toman registros a diferentes tiempos antes y después de la amputación de la cola (25, 26). Como control se incubará previamente a los animales con inhibidores de la NOS (L-NAME) para inhibir la síntesis de •NO.

Resultados, análisis y discusión

Actividad 1. Síntesis y elucidación estructural de Red-B I y Red-Ox I

La sonda Red-B I fue sintetizada siguiendo la ruta sintética mostrada en el Esquema 1 (ANEXO). En primer lugar se hace reaccionar 3-N,N-dietilaminofenol con bis(2,4,6-tricloro)malonato dando 7-dietilamino-4-hidroxycumarina 1 (R = 50%). Este último se hidroliza en medio ácido para obtener el derivado acetofenona 2 con rendimiento cuantitativo (R >99%). Luego se hace reaccionar a 2 con resorcinol para dar el derivado de xanteno 3, el cual se precipita como sal de perclorato (R = 17%). La incorporación del agrupamiento triflato sobre el derivado 3 no fue posible a partir de la sal, como se describe más adelante, por lo que a este derivado se le agrega bicarbonato de sodio para obtenerlo como amina libre. Posteriormente se realiza la reacción de incorporación del agrupamiento triflato utilizando N-fenil-bis-(trifluorometansulfonimida) como agente triflante dando el derivado 5 (R = 29%). Posteriormente, se somete a borilación con bis(pinacolato)diboro, dando así el compuesto de interés Red-B I (R = 18%).

El fluróforo Red-OxI (el correspondiente producto hidroxilado del éster borónico Red-B I) se sintetizó para su posterior caracterización. Para esto se lleva a pH básico al derivado 3, utilizando bicarbonato de sodio como base obteniendo la amina libre, la cual precipita como un sólido rojo llamado Red-OxI, Esquema 2 (ANEXO).

Cada uno de los compuestos intermedios y los compuestos finales de interés , fueron caracterizados estructuralmente mediante técnicas de espectroscopía de RMN (¹H, ¹³C, COSY, HSBC, HSQC) y espectrometría de masas (IE). En la Figura 1 (ANEXO) se muestra el espectro obtenido de ¹H-RMN de Red-B I y Red-OxI.

Si bien Red-B I fue sintetizado con éxito, la masa obtenida (unos pocos miligramos) se utilizó en su totalidad para la caracterización inicial incluyendo los ensayos in vitro (como se detalla mas adelante). Por este motivo, fue necesario sintetizar un nuevo lote, escalando a mayores cantidades, con el fin de disponer de suficiente masa para los análisis in cellula e in vivo previstos. Para lograr este escalado, se exploraron nuevas condiciones de reacción de manera de mejorar los rendimientos finales. En primer lugar, exploramos la posibilidad de armar el heterociclo de xanteno a partir de 1,4-dietilamino-2-hidroxi-acetofenona y resorcinol mono-sustituído por un ester borónico, como muestra la Figura 2 (ANEXO). La síntesis del derivado acetofenona ya fue puesta a punto anteriormente, obteniendose en buenas cantidades. Para la obtención del derivado de ester borónico (Figura 3, ANEXO) se hace reaccionar resorcinol con un agente triflante para obtener el correspondiente derivado 3-hidroxifenil-trifluorometanosulfonato 1a, según se muestra en la Tabla 1. Una vez obtenido el derivado monotriflado se lo trató con bis(pinacolato)diboro en presencia de catalizador de Pd y base, según se muestra en la Tabla 2. El producto 2a es aislado a partir de una TLC preparativa con un bajo rendimiento (R=2%). Por lo cual se decide no continuar explorando esta ruta.

A continuación, se procede a la síntesis del heterociclo xanteno 3 (Fig. 4 ANEXO) mediante la ruta sintética inicialmente planteada partiendo de 3-N,N-dietilaminofenol mediante tres pasos de reacción escalando a mayores cantidades para contar con mas masa y así poder explorar los siguientes pasos de reacción. La incorporación del agrupamiento triflato y posterior borilación, son las reacciones más sensibles al escalado por lo que se exploran varias condiciones de reacción para mejorar su eficiencia como se describen las Tablas 3 y 4, (ANEXO).

Paralelamente, se trabajó en la síntesis de Red-B II, a partir de 3 y ácido o-/p- formil-fenilborónico en anhídrido acético sin éxito, por lo que se decide explorar un nuevo fluoróforo Red-OX III para estudiar sus propiedades. El fluoróforo RedOxIII se obtuvo a partir de la reacción de Red-OxI con p-dimetilamino-benzaldehído en medio ácido (R= 66%), Figura 5, ANEXO. Próximamente este se tratará con un agente triflante para luego incorporar un éster borónico formando así Red-BIII.

Actividad 2. Caracterización fisicoquímica y cinética

2.1 Evaluación de las propiedades espectroscópicas de los fluoróforos Red-Ox I y Red-Ox III.

Se determinaron las propiedades espectroscópicas de los fluoróforos Red-Ox I y Red-Ox III, como se muestra en la Figura 6 y 7 ANEXO.

Red-OxI muestra buenas propiedades espectroscópicas(λ_{exc} = 511nm; λ_{em} = 538nm , QY= 0,092, ϵ = 67000 M⁻¹.cm⁻¹. Red-OxIII también fue caracterizado espectroscópicamente mostrando mayores longitudes de onda y menor rendimiento cuántico y absortividad molar (λ_{exc} = 530nm; λ_{em} = 565nm , QY= 0,045, ϵ = 7133 M⁻¹.cm⁻¹).

Determinación del tiempo de vida media (Tau) de Red-OxI: Se determinó el tiempo de vida media de la fluorescencia (tau) que es el tiempo promedio que un fluoróforo permanece en su estado excitado antes de emitir un fotón. Se realizó un análisis mediante Phase Delay Measurement, comparando con el fluoróforo de fluoresceína a pH básico como patrón ($\tau_{Fluoresceína}$ = 4.16 ns a pH 13). Los valores experimentales de Red-OxI (5 μ M, pH 7.42) se ajustan a un modelo exponencial de 3 tiempos discretos, obteniendo los valores de tiempo de vida media τ_F = (τ_{F1} =0,29ns (44,25%); τ_{F2} =4,19ns (38, 13%), τ_{F3} = 1,3ns (17,63%) Figura 7, ANEXO.

2.2 Oxidación de Red-BI por oxidantes de relevancia biológica: Análisis cinético

Una vez determinadas las propiedades espectroscópicas, se evalúa la reactividad de la sonda Red-B I frente a peroxinitrito (ONOO⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para ello se determina la emisión de fluorescencia tras la oxidación de Red-B I por adiciones sucesivas de peroxinitrito, o peróxido de hidrógeno, respectivamente, evaluando el aumento de la fluorescencia emitida, Figura 8 ANEXO.

Determinamos las constantes cinéticas de la reacción de Red-B I con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a 25°C y 37°C a pH 7.4 bajo condiciones de pseudo-primer orden, Figura 9, ANEXO. La reactividad del Red-BI con oxidantes biológicamente relevantes mostró un comportamiento comparable al de sondas derivadas de boronatos descritos previamente. Se determinó una constante de velocidad de k = 0,58 M⁻¹s⁻¹ a 25°C y 4,70 M⁻¹s⁻¹ a 37°C para el H₂O₂, mientras que se obtuvo una k estimada mayor a 1E5 M⁻¹s⁻¹ para el peroxinitrito a pH 7,4 y 25 °C, Tabla 6 ANEXO.

2.3. Efecto del oxígeno sobre la fluorescencia y estabilidad con pH

Dado que el O₂ actúa como uno de los principales agentes "apagadores" de la fluorescencia, atenuando su intensidad mediante distintos mecanismos, se evaluó la respuesta fluorescente de los fluoróforos Red-OxI y Red-Ox III frente a diferentes presiones parciales de oxígeno (pO₂). Se realizaron curvas de calibración de Red-OxI (0 - 0.33 - 0.46 - 0.73 - 0.96 - 1.23 - 2.72 μ M) expuestas a distintas pO₂ (2, 6, 21%); λ_{exc} = 511nm; λ_{em} = 538nm, y de Red-OxIII (0 - 5 - 10 - 15 - 20 - 25 - 30 μ M) expuestas a distintas pO₂ (2, 6,

21%); λ_{exc} = 530nm; λ_{em} = 565nm. Las pendientes obtenidas se comparan con la pendiente calculada a partir de curvas de calibración del fluoróforo de referencia fluoresceína (FI) (0 – 0,2 – 0,5uM) expuestas a distintas pO₂ (2, 6, 21%); λ_{exc} = 490nm; λ_{em} = 520nm. Figura 10, ANEXO. Ambos fluoróforos Red-OxI y Red-OxIII no muestran efecto quenching por el oxígeno de forma significativa a concentraciones estudiadas, lo que le otorga una ventaja a los nuevos fluoróforos Red-OxI y Red-Ox III, a diferencia de otros fluoróforos comúnmente utilizados que presentan una alta variabilidad con las diferentes pO₂ haciendo que la respuesta fluorescente no sea lineal con la concentración del analito.

Posteriormente, se estudió la estabilidad de los fluoróforos Red-B I y Red-B III frente a cambios de pH y se determinaron sus valores de pK_a, Figura 11, ANEXO. Se determinó para Red-OxI y Red-OxIII un valor de pK_a = (5,68 ± 0,59) y (4,88 ± 0,24) respectivamente.

Además, evaluamos la dependencia de la fluorescencia con los cambios de pH, comparando Red-OxI y Red-Ox III con fluoresceína (FI) como uno de los fluoróforos de referencia, mostrando Red-Ox I y Red-Ox III buena estabilidad en el entorno de pH fisiológico, Figura 11, ANEXO.

Actividad 3. Detección de peroxinitrito en modelos celulares

Se evaluó la capacidad de Red-BI para detectar la producción endógena de peroxinitrito en la respuesta oxidativa de macrófagos como modelo celular de inflamación. Los macrófagos de la línea celular J774A-1, fueron inmunoestimulados para la inducción de iNOS (IFN-gamma;/LPS para la producción de •NO dependiente de la iNOS, 400 unidades mL⁻¹ y 8 ug mL⁻¹ respectivamente, durante 5 horas y luego con un éster de forbol (PMA 4 ug/mL⁻¹), para la producción endógena de O₂•⁻). Se logró evidenciar por oxidación de Red-BI un flujo endógeno de producción de peroxinitrito por durante 30 minutos. Figura 12, ANEXO.

Conclusiones y recomendaciones

En el marco del presente proyecto desarrollamos una sonda fluorescente roja (Red-BI) derivada de éster borónico acoplada a xanteno para la detección selectiva de peroxinitrito, un agente oxidante y nitrante de gran relevancia biológica. Red-BI fue sintetizada con éxito en 5 pasos de reacción con moderado rendimiento global. El fluoróforo correspondiente (Red-OxI) también fue sintetizado y caracterizado exhaustivamente mostrando buenas propiedades espectroscópicas para su aplicación en técnicas fluorescentes y bioimagenología (λ_{exc} = 511nm; λ_{em} = 538nm, τ_F = (τ_F1 =0,29ns (44,25%); τ_F2 =4,19ns (38, 13%), τ_F3 = 1,3ns (17,63%), QY= 0,092, ϵ = 67000M⁻¹. cm⁻¹,

Paralelamente, sintetizamos un fluoróforo análogo pero con elongación del sistema conjugado Red-OxIII, que también fue caracterizado espectroscópicamente mostrando mayores longitudes de onda y menor rendimiento cuántico y absorptividad molar (λ_{exc} = 530nm; λ_{em} = 565nm, QY= 0,045, ϵ = 7133 M⁻¹.cm⁻¹ que Red-Ox I.

Se determinó para Red-OxI y Red-OxIII un pK_a = (5,68 ± 0,59) y (4,88 ± 0,24) respectivamente, mostrando buena estabilidad en el entorno de pH fisiológico. Ambos fluoróforos Red-OxI y Red-OxIII no muestran efecto quenching o apagamiento por el oxígeno de forma significativa a concentraciones estudiadas. Estas características representan una ventaja significativa frente a otras sondas fluorescentes que se utilizan habitualmente y que suelen ser sensibles a estas condiciones. Estas características hacen posible avanzar hacia una detección celular más precisa del peroxinitrito, aportando además nuevos conocimientos sobre el rol del oxígeno en la generación de especies oxidantes dentro del microambiente celular.

La reactividad de Red-BI con oxidantes biológicamente relevantes mostró un comportamiento comparable al de sondas derivadas de boronatos descritos previamente. Se caracterizó la reactividad de Red-BI con

H₂O₂ y se determinaron las constantes cinéticas a pH=7,4 $k_{25^{\circ}\text{C}}=(0,58 \pm 0,07)\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{37^{\circ}\text{C}}=(4,70 \pm 0,35)\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para H₂O₂, mientras que se obtuvo una k estimada mayor a $1\text{E}5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para peroxinitrito a pH 7,4 y 25 °C.

La sonda Red-BI muestra reactividad con ONOO⁻ de forma dosis-dependiente, con un rendimiento estimado de 88%.

Actualmente, se está finalizando el escalado de la síntesis para obtener cantidades suficientes de los compuestos, lo que permitirá evaluar su toxicidad celular y continuar posteriormente con ensayos in vivo en colaboración con el Grupo de Complejidad Molecular y Desarrollo de la Unidad de Genómica Avanzada del CINVESTAV, México donde se evaluarán en modelos animales tal como estaba inicialmente planteado.

Estudios posteriores nos permitirán validar la sonda como una herramienta para evaluar la formación de peroxinitrito en modelos celulares adaptados a un amplio rango de pO₂ a través de métodos espectroscópicos y de microscopía.

Por lo tanto, en este proyecto se generaron nuevos conocimientos asociados al desarrollo de nuevas sondas fluorescentes, las cuales presentan potencial de protección mediante herramientas de propiedad intelectual. En el presente trabajo se desarrollaron y se continúa validando sondas fluorescentes para aplicaciones en bioimagenología de procesos redox. Además, el estudio exhaustivo de las moléculas desarrolladas nos permitió identificar propiedades relevantes: los fluoróforos sintetizados no presentan apagamiento por oxígeno en las concentraciones estudiadas y muestran una alta estabilidad frente a variaciones de pH, a diferencia de las sondas fluorescentes comúnmente utilizadas. Estas características abren nuevas posibilidades para el estudio de fenómenos oxidativos en rangos fisiológicos de presión parcial de oxígeno (pO₂: 2–15%), los cuales difieren significativamente de las condiciones estándar de laboratorio (20–21%). Por lo tanto, el proyecto aporta herramientas novedosas para la generación de nuevos conocimientos sobre el rol del oxígeno en la generación de especies oxidantes dentro del microambiente celular, con potencial impacto científico y tecnológico.

Los resultados obtenidos en el marco de este proyecto fueron presentados en un total de nueve eventos científicos (nacionales e internacionales) con excelentes críticas, el trabajo fue ganador de un premio de un organismo internacional de referencia en el área de la biología redox (Travel award otorgado por la Society for Redox Biology and Medicine para exponer los resultados en la 32nd Annual Conference en Washington DC, EEUU 2025) y forma parte del estudio de posgrado de la estudiante Josefina Pereyra (Maestría académica por el programa ProInBio).

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Póster	Desarrollo de Red-B, una nueva sonda de peroxinitrito para el estudio de las respuestas oxidativas dependientes del oxígeno	Josefina Pereyra; Carolina Prolo; Rafael Radi; Natalia Rios		https://hdl.handle.net/20.500.12008/52927	Finalizado
Póster	Estudio del oxígeno como modulador de la respuesta oxidativa de macrófagos	Josefina Pereyra; Natalia Rios; María Noel Álvarez; Rafael Radi; Carolina		https://hdl.handle.net/20.500.12008/52939	Finalizado
Presentación en evento	Impacto del oxígeno en la regulación de la respuesta oxidativa en macrófagos.	Josefina Pereyra; Carolina Prolo; Rafael Radi; Natalia Rios		https://hdl.handle.net/20.500.12008/52938	Finalizado
Póster	Development of Red-B, a Novel Peroxynitrite	Josefina Pereyra; Carolina Prolo;		https://hdl.handle.net/20.500.12008/52928	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
	Probe for Unbiased Analysis of Oxygen-Dependent Oxidative Responses	Rafael Radi; Natalia Rios			
Tesis de maestría	Rol del oxígeno y el dióxido de carbono como moduladores de la respuesta oxidativa de macrófagos	Josefina Pereyra; Carolina Prolo; Natalia Rios	MESTRÍA POR PROGRAMA PROINBIO		En proceso
Presentación en evento	Rol del oxígeno como modulador de la respuesta oxidativa de macrófagos: formación de óxido nítrico y peroxinitrito.	Josefina Pereyra; Carolina Prolo; Natalia Rios; Rafael Radi; Maria Noel Alvarez.		https://hdl.handle.net/20.500.12008/47363	Finalizado
Póster	Desarrollo de una sonda fluorescente roja (Red-B) para la detección intracelular de peroxinitrito.	Josefina Pereyra; Carolina Prolo; Rafael Radi; Maria Noel Alvarez;		https://hdl.handle.net/20.500.12008/47354	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
		Natalia Rios.			
Póster	Rol del oxígeno como modulador de la respuesta oxidativa de macrófagos: formación de óxido nítrico y peroxinitrito.	Josefina Pereyra; Ana Clara Casella; Carolina Prolo; Natalia Rios; Rafael Radi; Maria Noel Alvarez.		https://hdl.handle.net/20.500.12008/41615	Finalizado
Póster	Desarrollo de una sonda fluorescente roja (Red-B) para la detección intracelular de peroxinitrito.	Josefina Pereyra; Carolina Prolo; Rafael Radi; Maria Noel Alvarez; Natalia Rios.		https://hdl.handle.net/20.500.12008/41613	Finalizado
Póster	Oxygen levels modulation of the macrophage oxidative response: nitric oxide and peroxyxynitrite	Josefina Pereyra; Ana Clara Casella; Carolina Prolo; Natalia Rios; Rafael		https://hdl.handle.net/20.500.12008/41614	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
	production.	Radi; Maria Noel Alvarez.			
Otro	Travel Award - Premio otorgado por la Society for Redox Biology and Medicine, para presentar el trabajo en la 32nd Annual Conference.	Josefina Pereyra; Carolina Prolo; Rafael Radi; Natalia Rios			Finalizado

Referencias bibliográficas

1. Sies H & Jones D (2007) Encyclopedia of Stress, Fink G (ed). 2nd edn, vol. 3. (Elsevier, Amsterdam).
2. 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.
3. Ferrer-Sueta G & Radi R (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. ACS chemical biology 4(3):161-177.
4. 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.
5. Prolo C, Rios N, Piacenza L, Álvarez MN, & Radi R (2018) Fluorescence and chemiluminescence approaches for peroxynitrite detection. Free Radical Biology and Medicine 128:59-68.
6. Zielonka J, Sikora A, Joseph J, & Kalyanaraman B (2010) Peroxynitrite 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.
7. Rios N, et al. (2016) Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxynitrite fluxes using fluorescein-boronate. Free Radical Biology and Medicine 101:284-295.
8. Sikora A, et al. (2011) Reaction between peroxynitrite and boronates: EPR spin-trapping, HPLC analyses, and quantum mechanical study of the free radical pathway. Chemical research in toxicology 24(5):687-697.
9. 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.

10. Kameritsch P, et al. (2021) The mitochondrial thioredoxin reductase system (TrxR2) in vascular endothelium controls peroxynitrite levels and tissue integrity. 118(7).

11. Uribe P, et al. (2020) Multiparameter flow cytometry assay for analysis of nitrosative stress status in human spermatozoa. 97(12):1238-1247.

12. Martínez A, et al. (2019) Cytosolic Fe-superoxide dismutase safeguards *Trypanosoma cruzi* from macrophage-derived superoxide radical. 116(18):8879-8888.

13. Carballal S, et al. (2018) Manganese porphyrin redox state in endothelial cells: Resonance Raman studies and implications for antioxidant protection towards peroxynitrite. 126:379-392.

14. Lepka K, et al. (2017) Iron-sulfur glutaredoxin 2 protects oligodendrocytes against damage induced by nitric oxide release from activated microglia. 65(9):1521-1534.

15. Sánchez-Calvo B, et al. (2016) Nitro-Arachidonic Acid Prevents Angiotensin II-Induced Mitochondrial Dysfunction in a Cell Line of Kidney Proximal Tubular Cells. *PloS one* 11(3):e0150459.

16. Prolo C, et al. (2015) Nitric oxide diffusion to red blood cells limits extracellular, but not intraphagosomal, peroxynitrite formation by macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* 87:346-355.

17. Poronik YM, Shandura M, Kovtun YPJ, & pigments (2007) Substituted xanthylocyanines. III. Dyes containing non-symmetrically substituted xanthylium core. 72(2):199-207.

18. Roychowdhury S, Luthe A, Keilhoff G, Wolf G, & Horn TFJG (2002) Oxidative stress in glial cultures: detection by DAF-2 fluorescence used as a tool to measure peroxynitrite rather than nitric oxide. 38(2):103-114.

19. Chevalier A, Renard PY, & Romieu AJCAEJ (2014) Straightforward Access to Water Soluble Unsymmetrical Sulfoxanthene Dyes: Application to the Preparation of Far Red Fluorescent Dyes with Large Stokes' Shifts. 20(27):8330-8337.

20. 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.

21. Kulangiappar K, Anbu Kulandainathan M, Raju TJI, & research ec (2010) Conversion of benzylic bromides to benzaldehydes using sodium nitrate as an oxidant. 49(14):6670-6673.

22. Berridge MV, Tan ASJAob, & biophysics (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. 303(2):474-482.

23. 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.

24. 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.

25. Renn J, Pruvot B, & Muller MJJoai (2014) Detection of nitric oxide by diaminofluorescein visualizes the skeleton in living zebrafish. 30(4):701-706.

26. Echeverri K, Clarke JD, & Tanaka EMJDb (2001) In vivo imaging indicates muscle fiber dedifferentiation is a major contributor to the regenerating tail blastema. 236(1):151-164.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)