

# Detecção de radicais livres e oxidantes

**QBQ2509: Bioquímica Redox**

**QBQ5893: Processos Redox em Bioquímica**

**Dr. Danilo B. Medinas**

**Material de estudo para prova**

Halliwel: Capítulo 6

Manuscritos citados



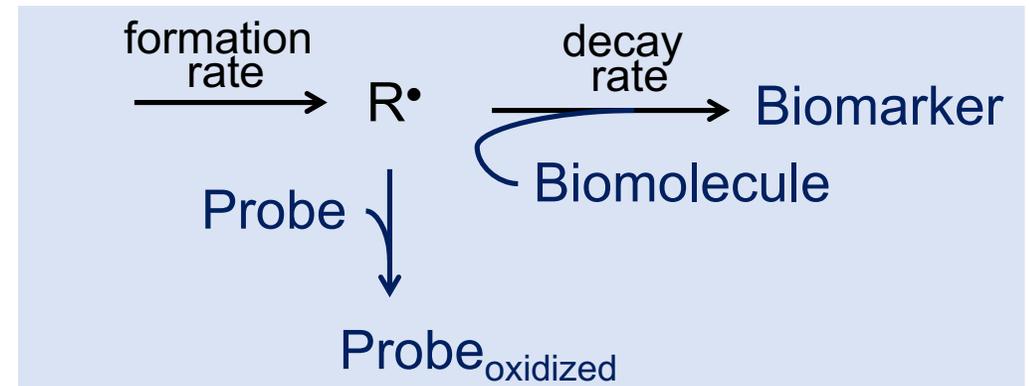
**Espectrômetro de EPR**

# Radicais livres e oxidantes – espécies elusivas em bioquímica

A detecção e quantificação de radicais livres e oxidantes permanece um dos grandes desafios da área redox- no geral meia-vida curta em fases condensadas (soluções) e em meios biológicos (crowded). **Difícil de detectar mesmo *in vitro*, e mais ainda em células e tecidos, onde as concentrações de estado estacionário de oxidantes e radicais são usualmente muito baixas, requerendo estratégias acumulativas (métodos indiretos).**

Species	$t_{1/2}$ (seconds)
HO $\cdot$	$< 10^{-9}$
RO $\cdot$	$\sim 10^{-6}$
CO $_3^{\cdot-}$	$\sim 10^{-6}$
NO $_2$	$\sim 10^{-6}$
O $_2^{\cdot-}$	$\sim 10^{-3}$ (pH 7)
ONOO $^-$ /ONOOH	$\sim 10^{-3}$ - $10^{-1}$
$\cdot$ NO	1- 10
$^1$ O $_2$	10
ROO $\cdot$	7
Q $\cdot$ (tar)	days

Physiological	Pathophysiological
[O $_2^{\cdot-}$ ] $_{ss}$ 40 pM	$< 1 \mu$ M
[NO $\cdot$ ] $_{ss}$ 20 nM	500 nM
[H $_2$ O $_2$ ] $_{ss}$ 1nM-0.1 $\mu$ M	0.1-10 uM



# Estratégias de detecção de radicais livres e oxidantes

## DIRETA

-EPR-ressonância paramagnética eletrônica (radicais e metais de transição)

## INDIRETA

-EPR-método do captador de spin (“spin-trapping”) (alta especificidade para radicais)

-Biomarcadores - detecção/quantificação de produtos de alvos biológicos (lipídeos, proteínas, DNA/RNA) (baixa especificidade; “end-point data”)

-Moléculas reporteres (sondas) de radicais e oxidantes (“real-time”)

-Sondas químicas fluorescentes/luminescentes (propensas a artefatos)

-Sondas geneticamente codificadas/fluorescência sensível al estado redox

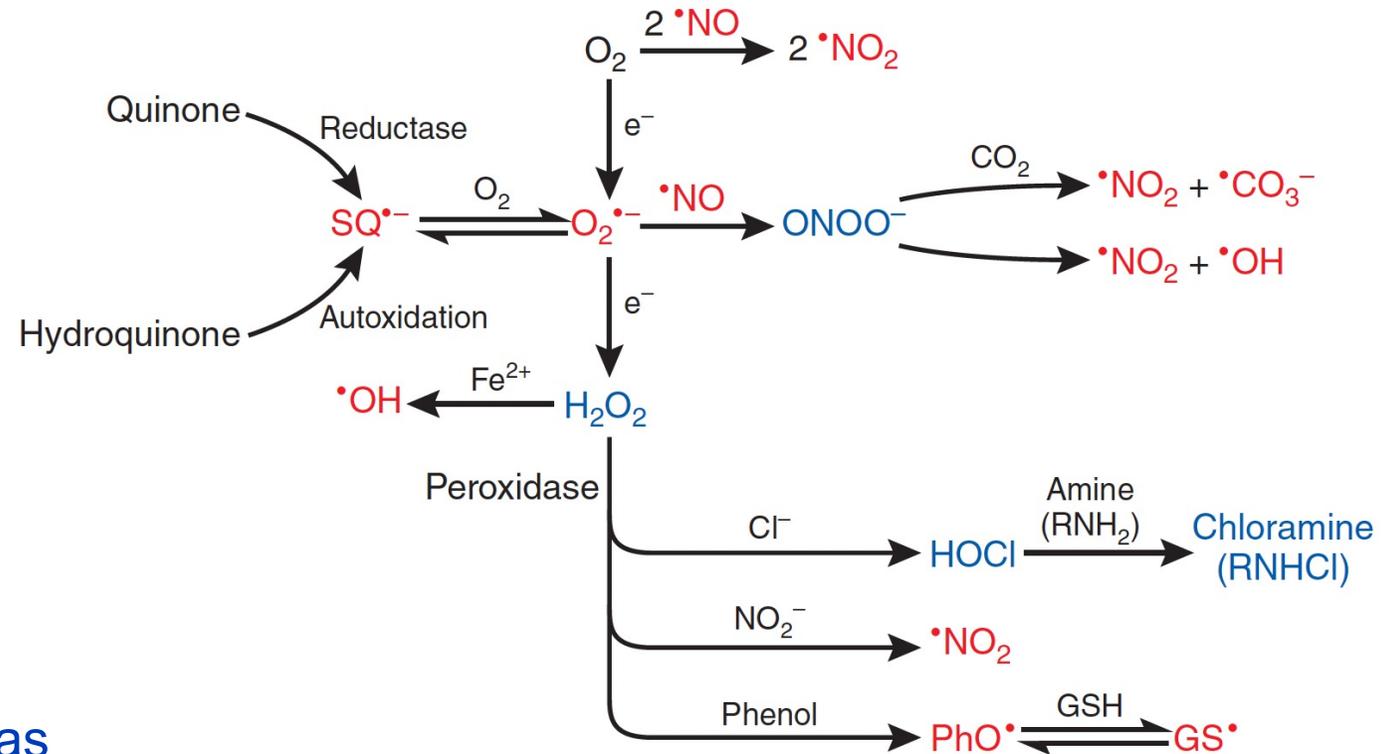
## Complementares - Efeitos fisiológicos

-Nocaute/superexpressão de enzimas antioxidantes ou de enzimas que produzem radicais/oxidantes (iRNA).

# Estratégias de detecção de radicais livres e oxidantes

São necessários critérios rigorosos para selecionar as metodologias a serem empregadas. Tais critérios devem se basear no:

- Conhecimento das propriedades físico-químicas e biológicas dos radicais ou oxidantes de interesse.
- Conhecimento dos fundamentos da metodologia a ser aplicada, incluindo suas vantagens e desvantagens.
- Uso de mais de uma metodologia (baseadas em fundamentos diferentes).

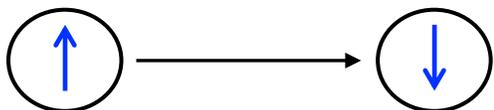


Winterbourn, Nat. Chem. Biol., 2008

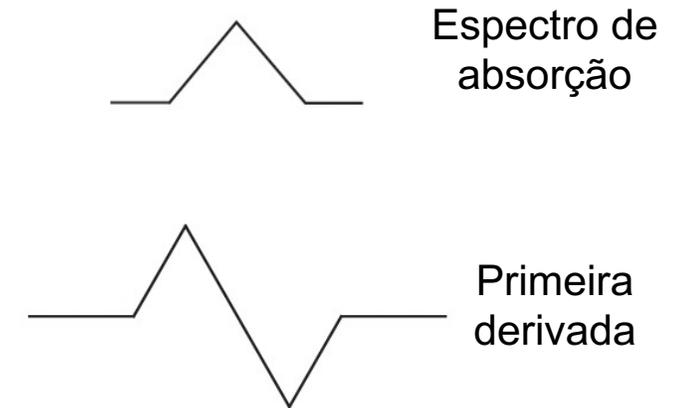
# Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

- Técnica de espectroscopia para detecção de elétrons desemparelhados.
- Elétrons desemparelhados possuem spin de  $+1/2$  ou  $-1/2$ , comportando-se como pequenos magnetos. Num campo magnético externo, os elétrons podem alinhar-se paralelamente ou anti-paralelamente ao campo. Isso gera dois níveis de energia possíveis, que são proporcionais a força do campo magnético. A aplicação de radiação eletromagnética promove a transição entre os estados de energia, resultando no espectro absorvância de EPR normalmente representado como a primeira derivada.

$$\Delta E = h\gamma = g\beta H$$



$h$  = constante de Planck  
 $\gamma$  = frequência da radiação eletromagnética  
 $g$  = fator do elétron  
 $\beta$  = magnéton Bohr  
 $H$  = força do campo magnético



Núcleos de átomos próximos, como H, podem atuar como magnetos e gerar mais estados de energia que refletem no espectro de EPR

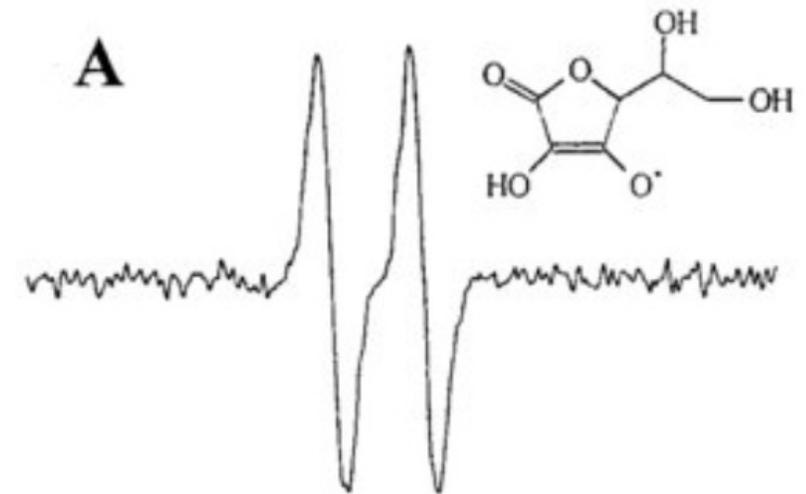
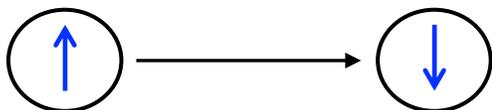


# Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

- Técnica de espectroscopia para detecção de elétrons desemparelhados.
- Elétrons desemparelhados possuem spin de +1/2 ou -1/2, comportando-se como pequenos magnetos. Num campo magnético externo, os elétrons podem alinhar-se paralelamente ou anti-paralelamente ao campo. Isso gera dois níveis de energia possíveis, que são proporcionais a força do campo magnético. A aplicação de radiação eletromagnética promove a transição entre os estados de energia, resultando no espectro absorvância de EPR normalmente representado como a primeira derivada.

$$\Delta E = h\gamma = g\beta H$$

$h$  = constante de Planck  
 $\gamma$  = frequência da radiação eletromagnética  
 $g$  = fator do elétron  
 $\beta$  = magnéton Bohr  
 $H$  = força do campo magnético



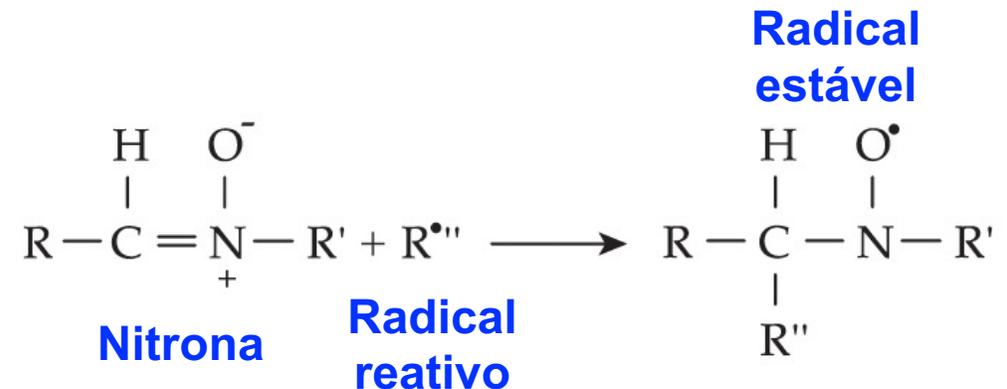
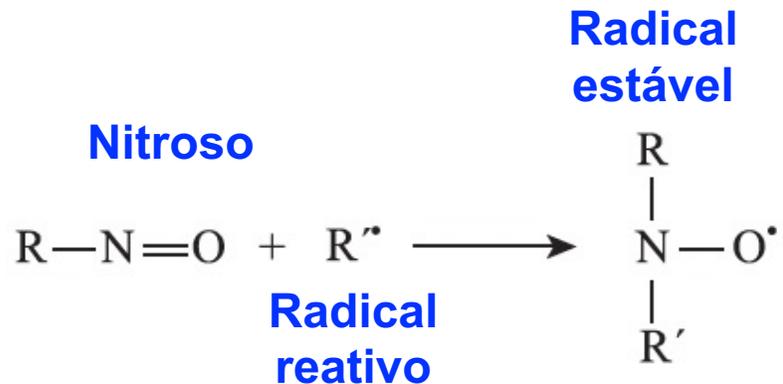
Radical ascorbilo

# Spin-trapping

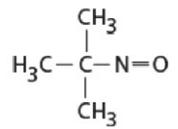
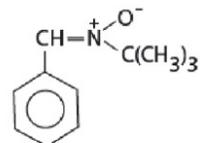
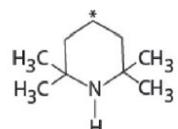
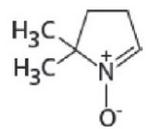
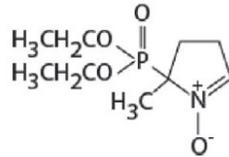
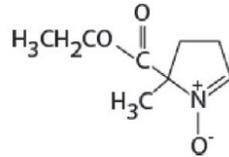
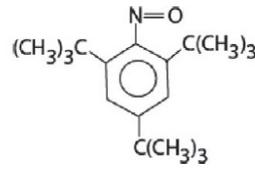
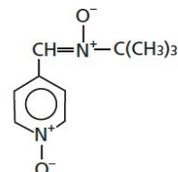
- Muitos radicais tem tempo de vida curta e concentrações abaixo do limite de detecção do instrumento de EPR.
- O método de 'spin-trapping' se baseia na reação do radical estudado que possui meia-vida curta com uma sonda para formação de um segundo radical que apresenta estabilidade química (meia-vida longa) e se acumula ao longo do tempo em concentrações adequadas para sua detecção.



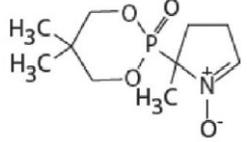
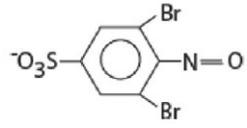
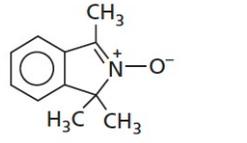
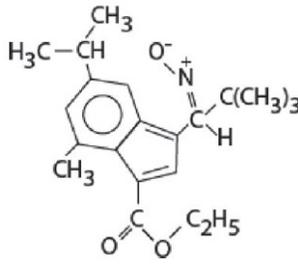
Estabilização do elétron desemparelhado por ressonância



# Sondas para spin-trapping (captadores de spin)

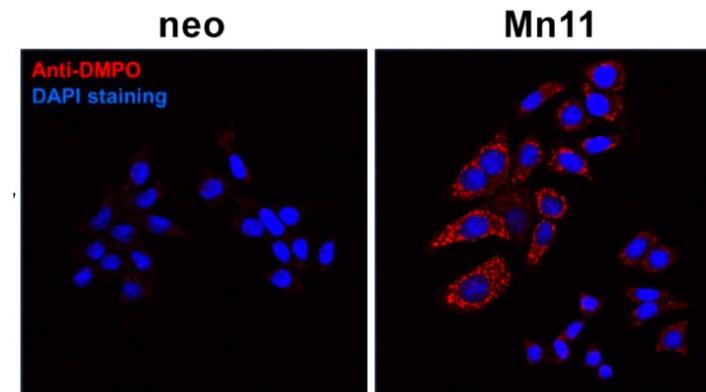
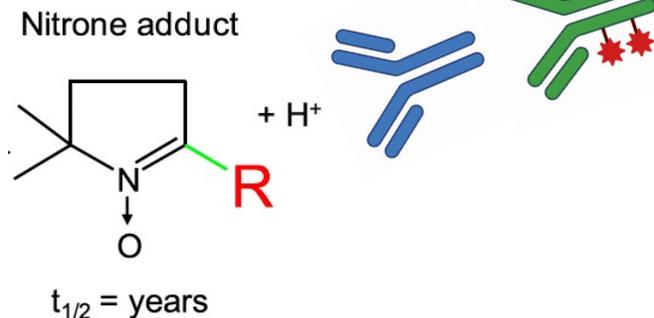
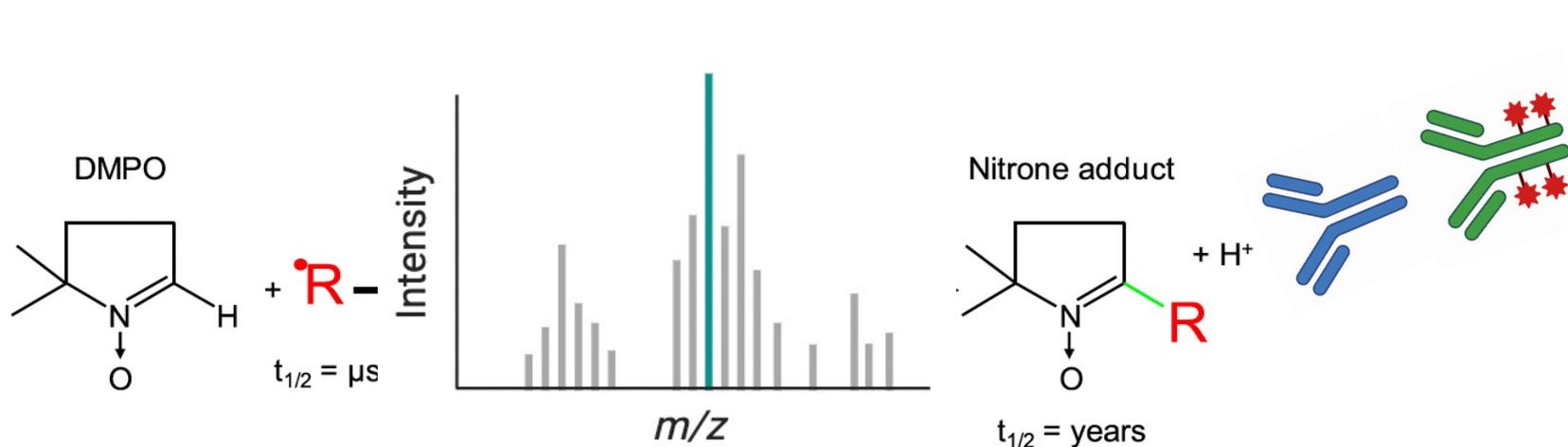
Name	Abbreviation	Structure
<i>tert</i> -Nitrosobutane (nitroso- <i>tert</i> -butane)	tNB (NtB)	
$\alpha$ -Phenyl- <i>tert</i> -butylnitrone	PBN	
2,2,6,6-Tetramethylpiperidine	TEMP <sup>b</sup> (TEMPD)	 <p> in TEMPD, which is more hydrophilic.</p>
5,5-Dimethylpyrroline- <i>N</i> -oxide	DMPO	
5-Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxide	DEPMPO	
5-Ethoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxide <sup>a</sup>	EMPO	
<i>tert</i> -Butylnitrosobenzene	BNB	
$\alpha$ -(4-Pyridyl-1-oxide)- <i>N</i> - <i>tert</i> -butylnitrone	4-POBN	

# Sondas para spin-trapping (captadores de spin)

Name	Abbreviation	Structure
5-(2,2-Dimethyl-1,3-propxocyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline <i>N</i> -oxide	CYPMPO	
3,5-Dibromo-4-nitroso-benzenesulphonic acid	DBNBS	
1,1,3-Trimethyl-isoindole <i>N</i> -oxide	TMINO	
Azulenylnitron	AZN	

# Imunospin-trapping

- Mesmo radicais 'estáveis' resultantes da captura de spin podem ser difíceis de detectar em sistemas biológicos, tecidos, células, organelas, etc.
- Além disso, uma variedade de diferentes radicais podem ser capturados *in vivo*, dificultando a interpretação do espectro de EPR.
- O radical aduto (produto da adição) pode decair para um produto estável, que pode ser detectado por espectrometria de massas.



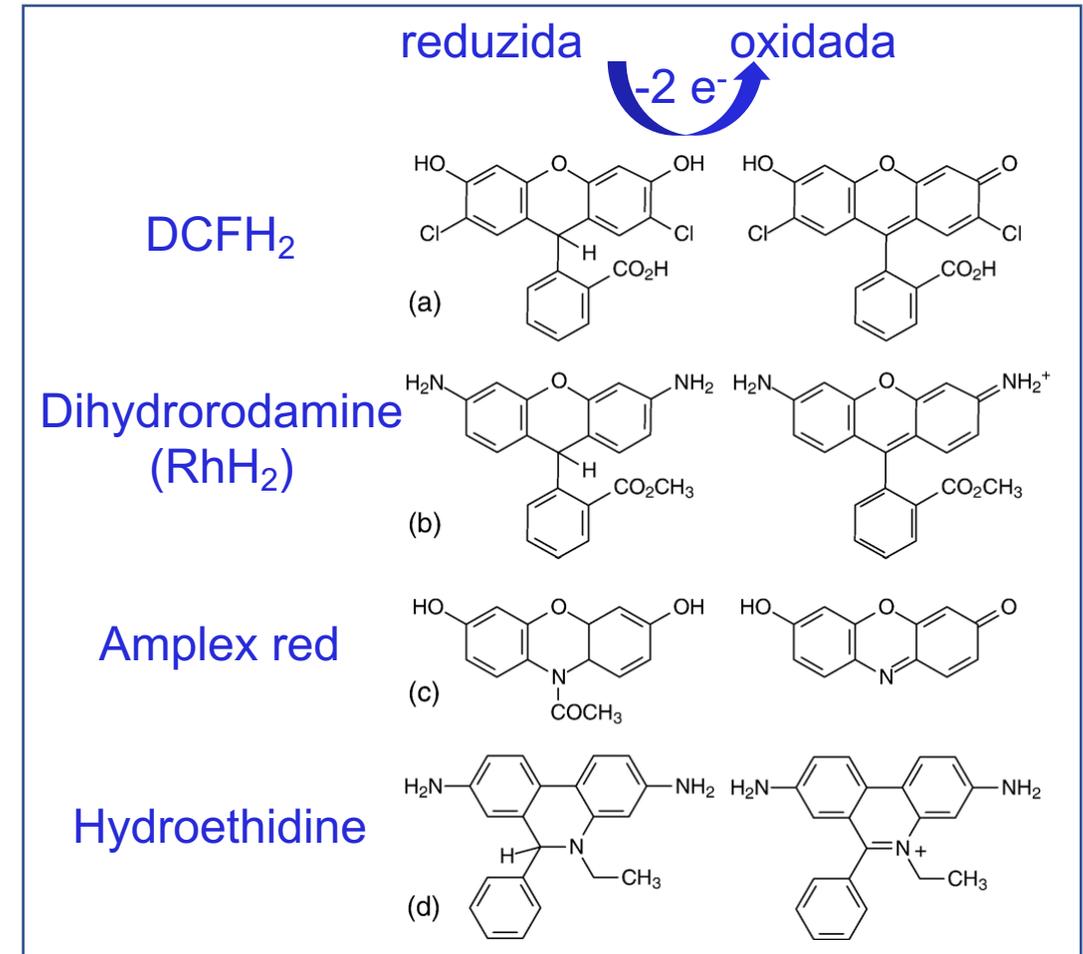
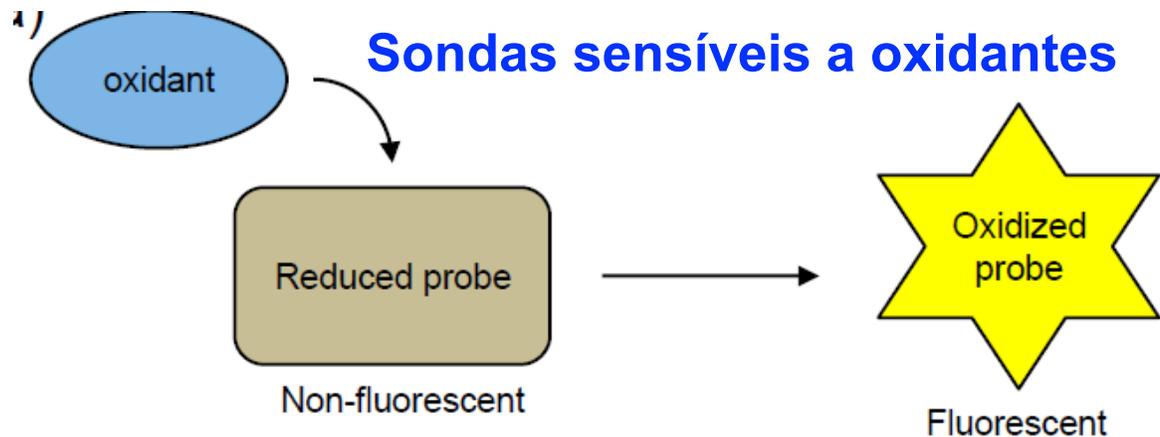
**Produtos de oxidação de lipídeos, proteínas e  
DNA/RNA serão apresentados na aula de  
biomarcadores**

# Uso de sondas para monitorar a produção de radicais livres e oxidantes em tempo real

- Sondas colorimétricas, fluorescentes e quimioluminescentes, podem ser oxidadas por mecanismos de 1 ou 2 e<sup>-</sup>.

- Detectam e estimam a produção de oxidantes/radicais.

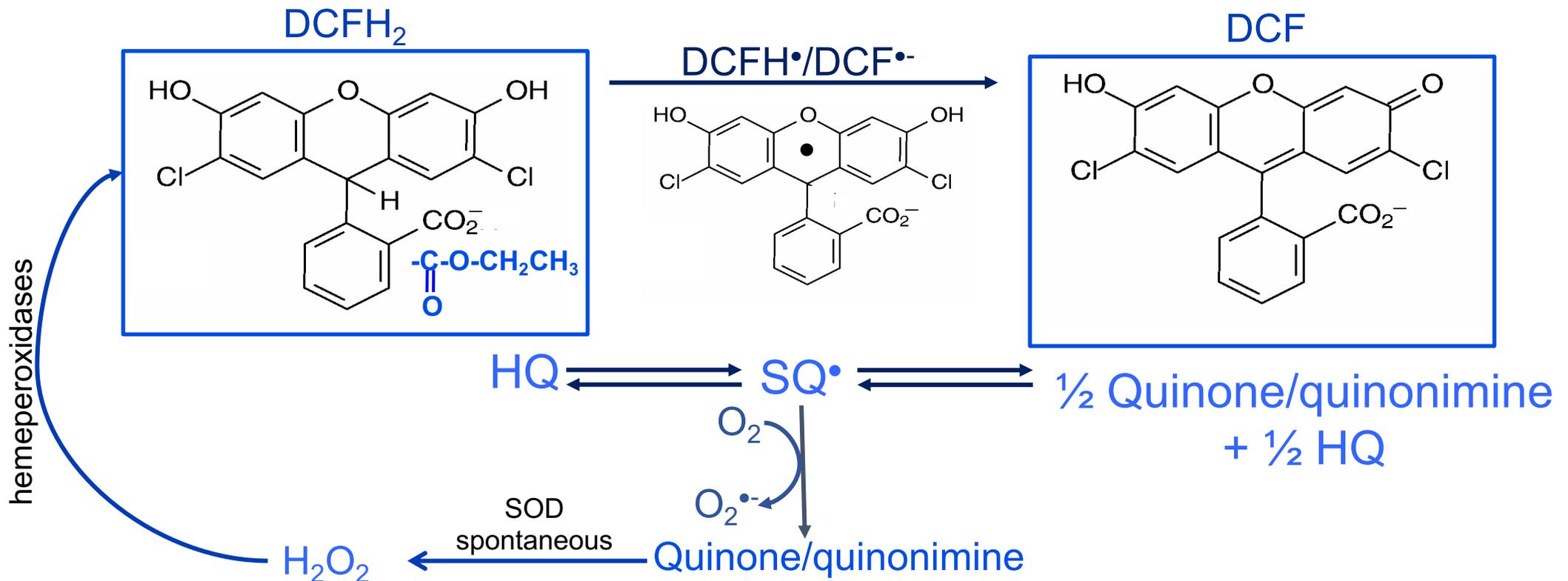
- Compostos exógenos não coloridos e não fluorescentes no estado reduzido que se transformam em coloridos e fluorescentes, ou emitem luz, devido a sua oxidação.



# Sondas redox estão sujeitas a artefatos

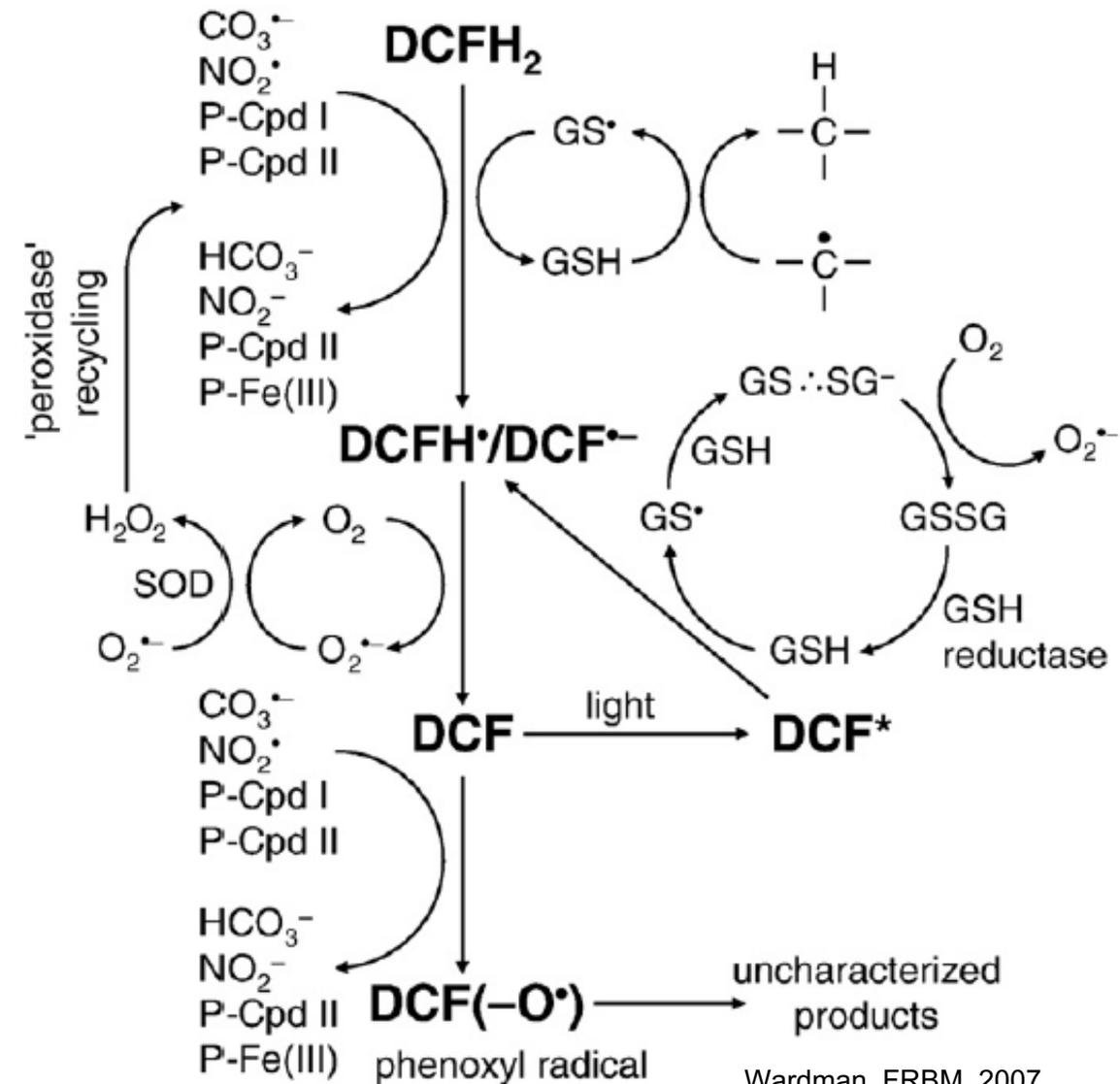
- Quando oxidadas por radicais (mecanismos de 1 e<sup>-</sup>), produzem radicais intermediários (SQ<sup>•</sup>). A SQ<sup>•</sup> pode amplificar a formação de radicais, ou seja, gerar artefatos por “inflar” os resultados.

- Podem ser utilizadas como uma indicação de processos redox, mas os resultados devem ser interpretados com cautela e outros métodos empregados para a validação dos estudos.



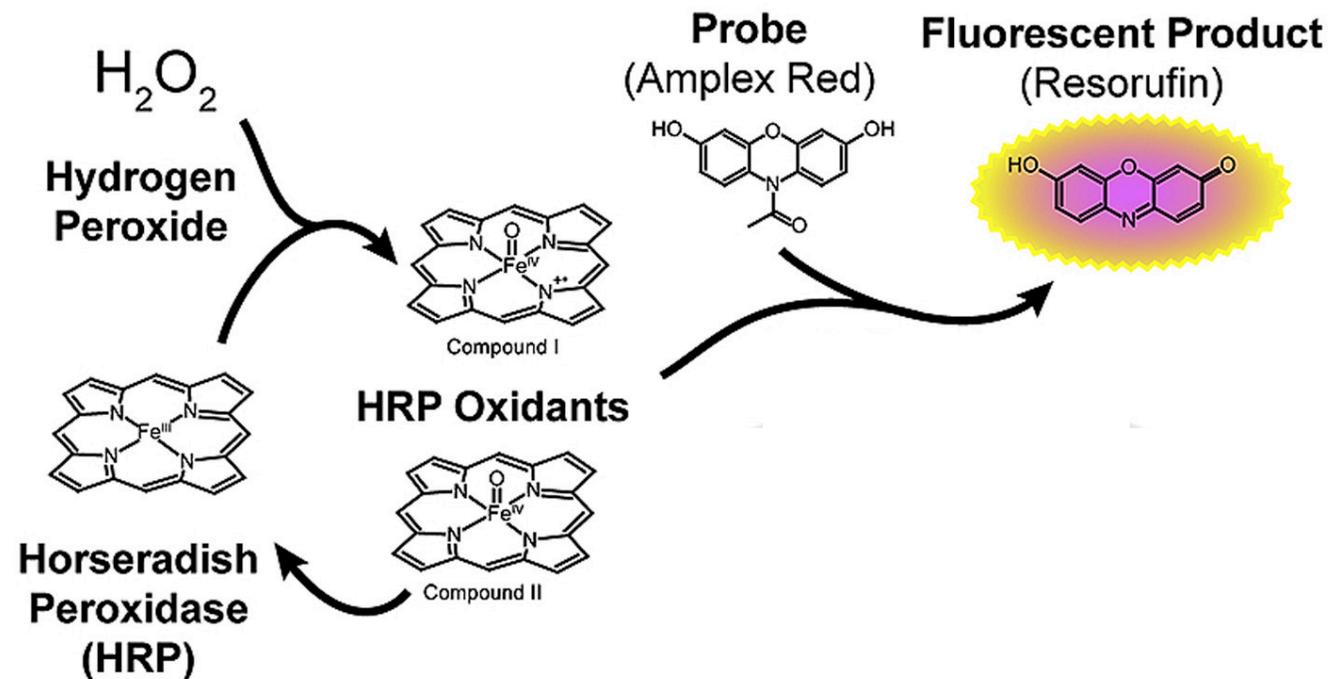
# Reações da DCFH2 *in vitro* e em células

- Similares às que ocorrem no caso de outros corantes reduzidos (fluoresceínas, rodaminas) .
- Não reage diretamente com  $O_2^{\bullet-}/H_2O_2/ ONOO^- /ONOOH/HCO_4^-$  (mas sim com radicais que sejam oxidantes fortes, como os radicais derivados do peroxinitrito, peroximonocarbonato, e compostos I e II formados por hemeperoxidases (detecção indireta de  $H_2O_2$ )).
- A produção de  $O_2^{\bullet-}$  é um subproduto do uso desses corantes (via propagação da oxidação por 1 e<sup>-</sup>).
- Deve-se usar baixas [ ]s (1-10  $\mu M$ ) desses corantes. Entrada em células é lenta >45 min.
- Fotoexcitação das sondas ocorre em alguma extensão (always see 'something').



# Detecção e quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular

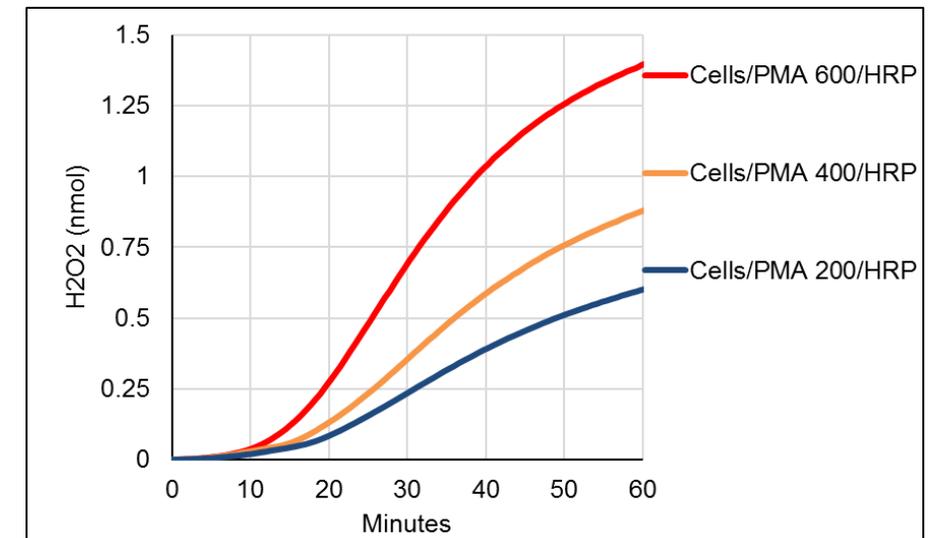
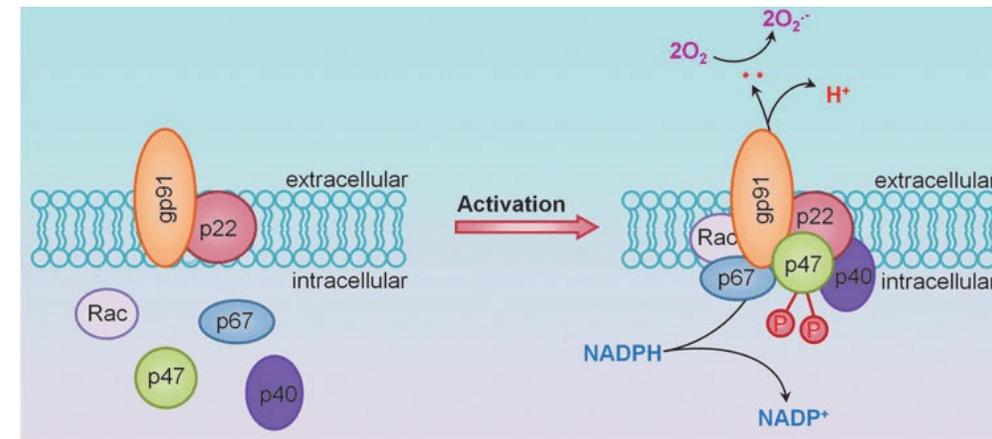
- Método do Amplex Red (praticamente não “entra” em células).



HRP- horseradish peroxidase  
Compound I/Compound II

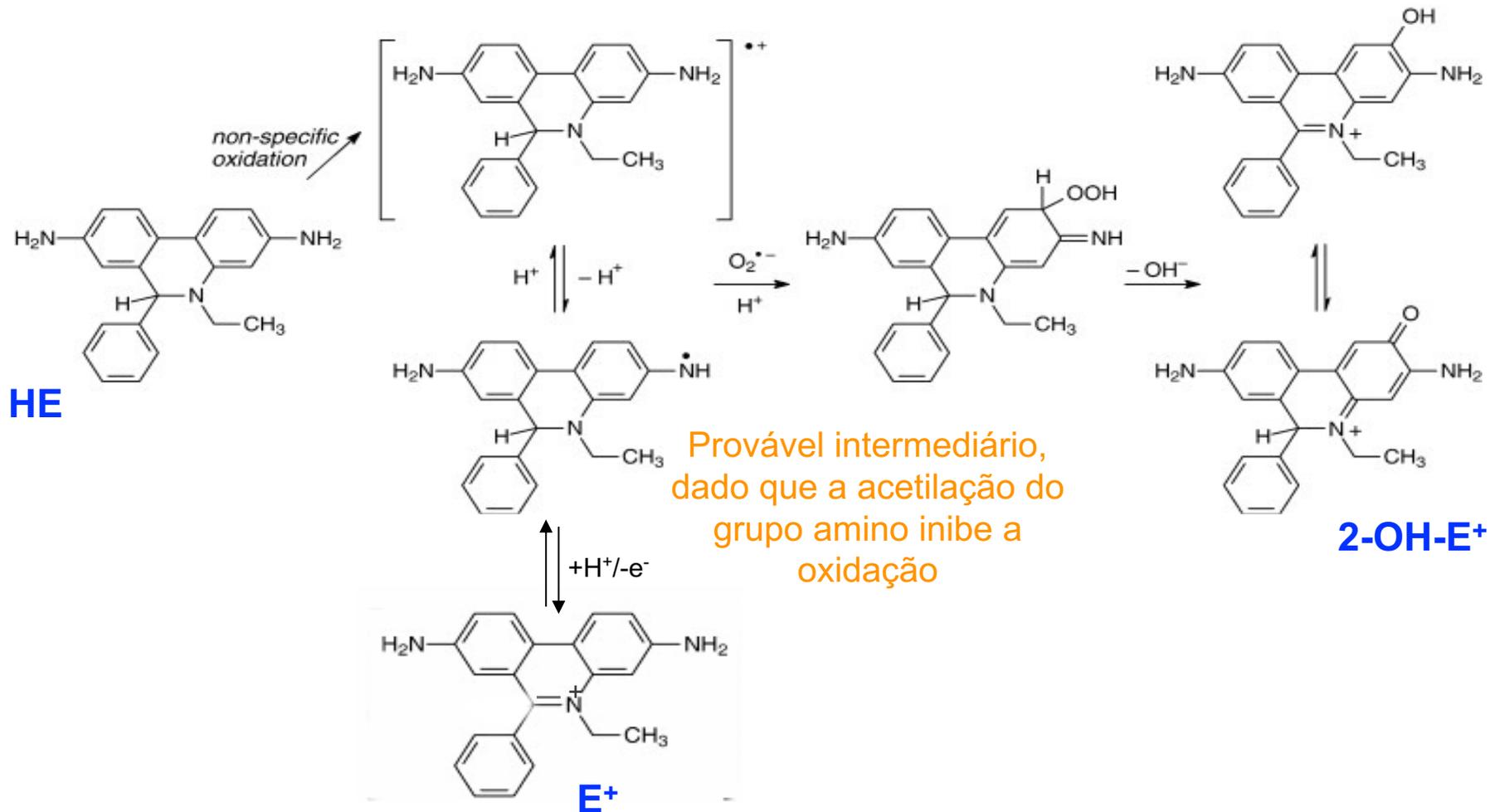
Curva padrão com concentrações conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para transformar unidades de Fluorescência em [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]

## Macrófagos ativados com PMA



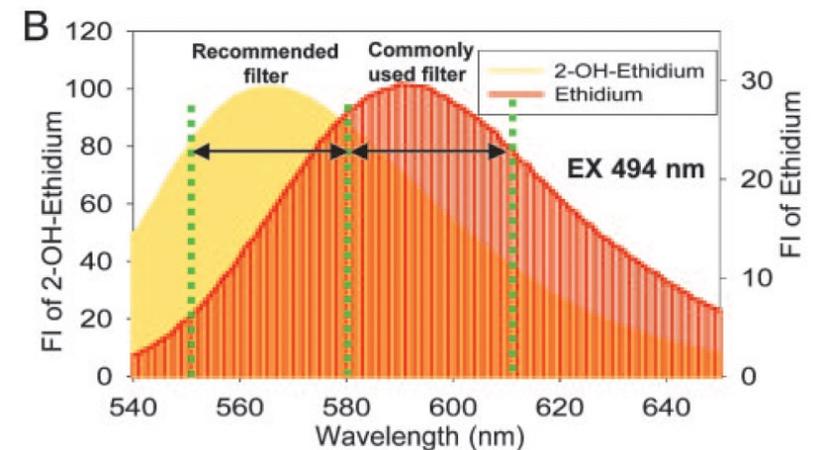
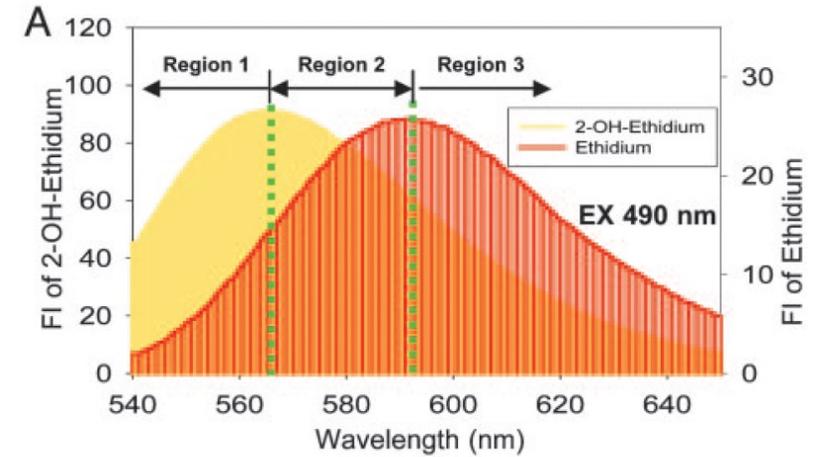
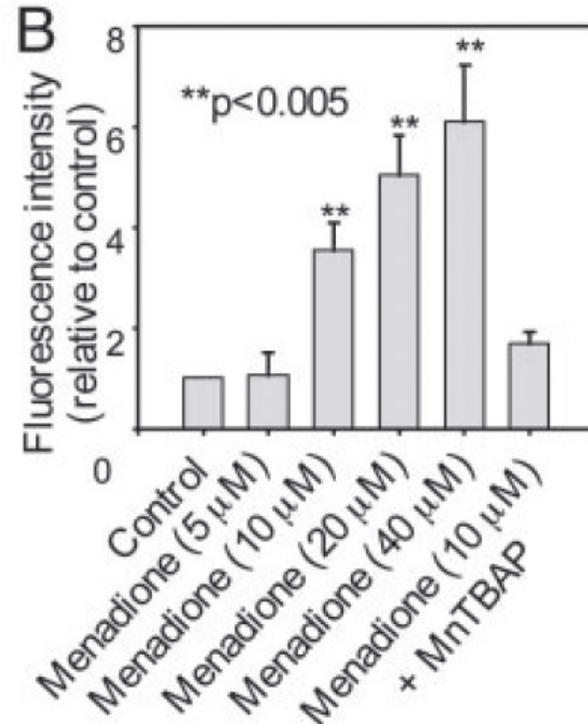
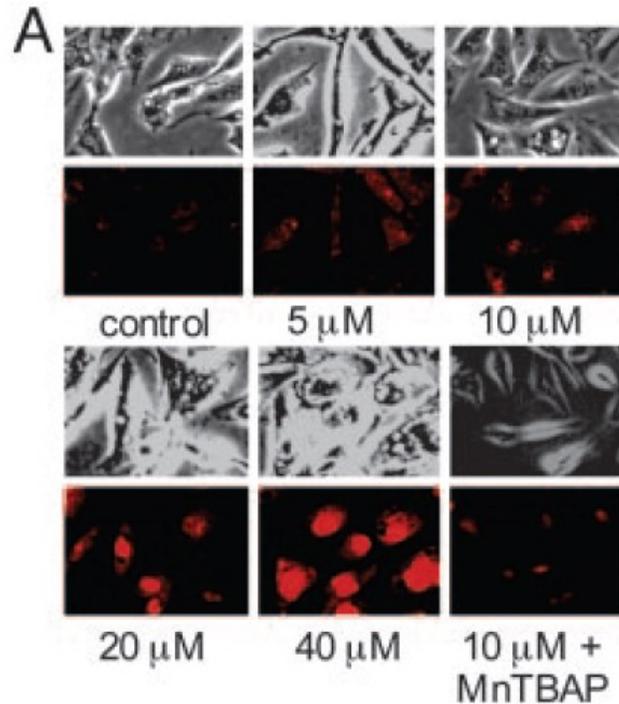
# Detecção e quantificação de $O_2^{\bullet-}$

Hidroetidina reage com superóxido para formação de 2-hidroxietidido.

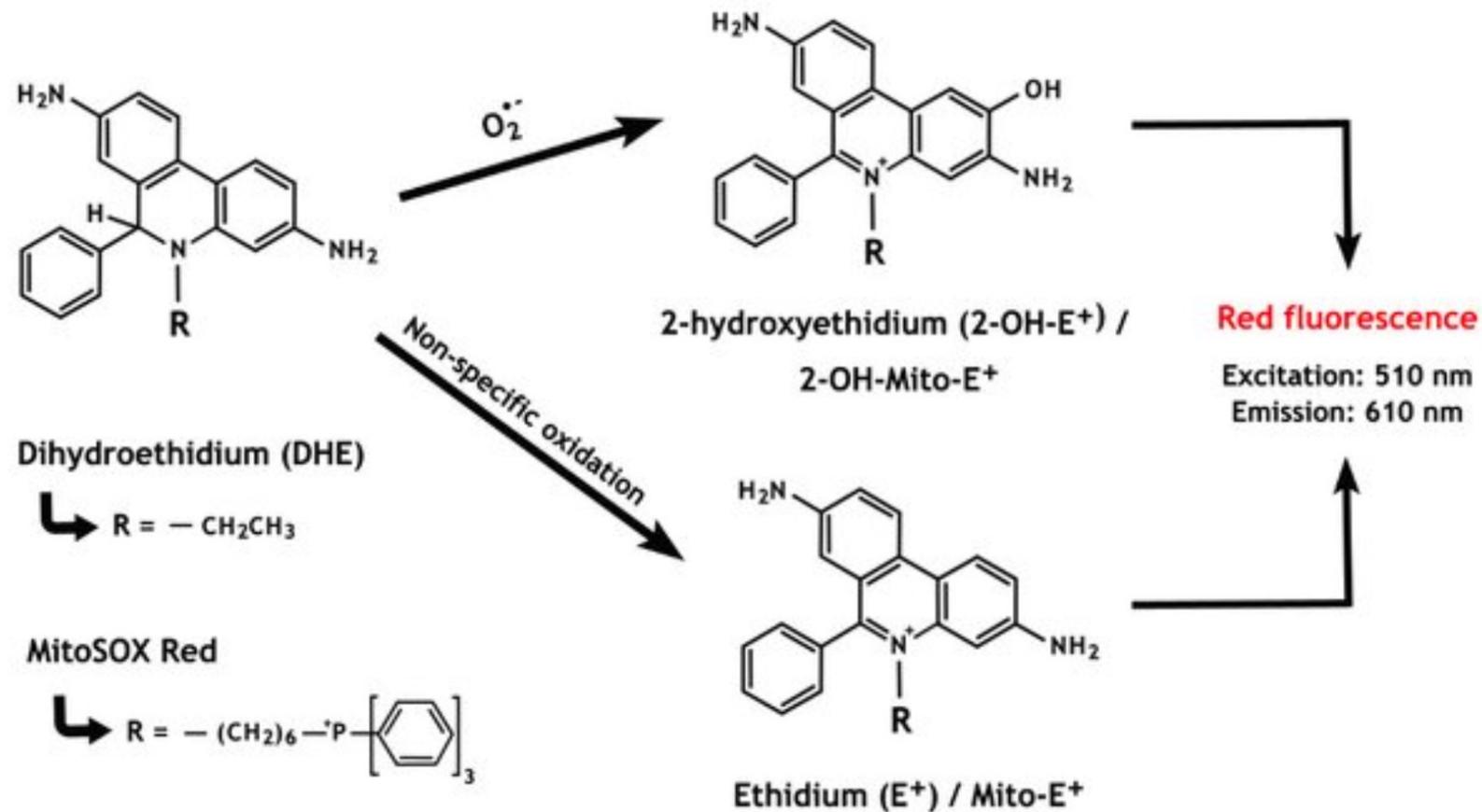


# Detecção e quantificação de $O_2^{\bullet-}$

- Hidroetidina reage com superóxido para formação de 2-hidroxi-etídio.

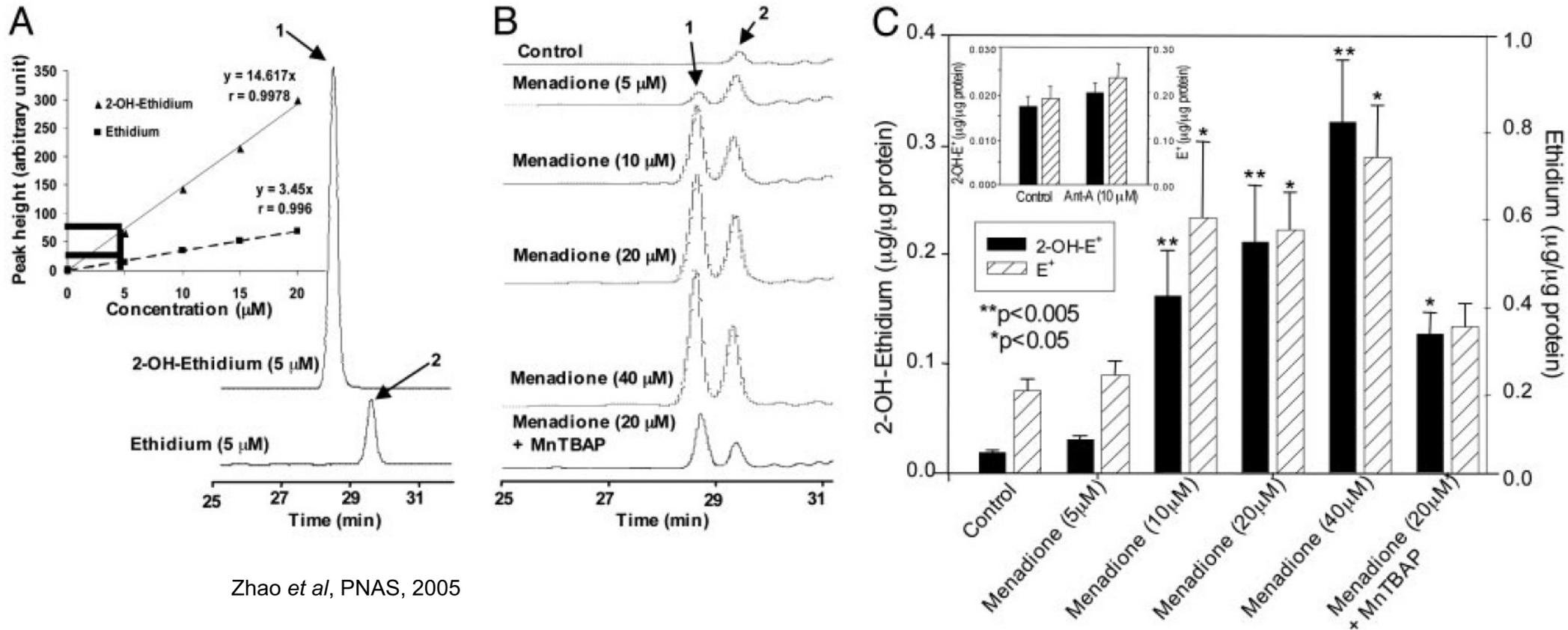


# MitoSOX: Cuidado para aqueles que trabalham com mitocôndria



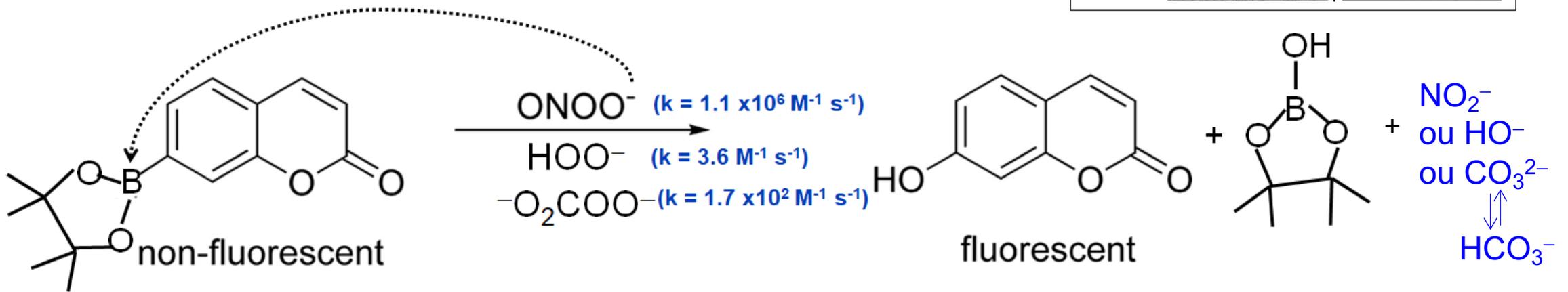
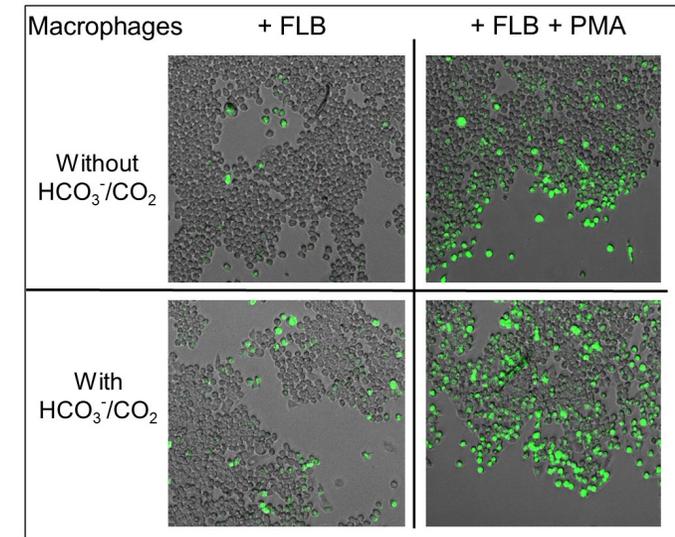
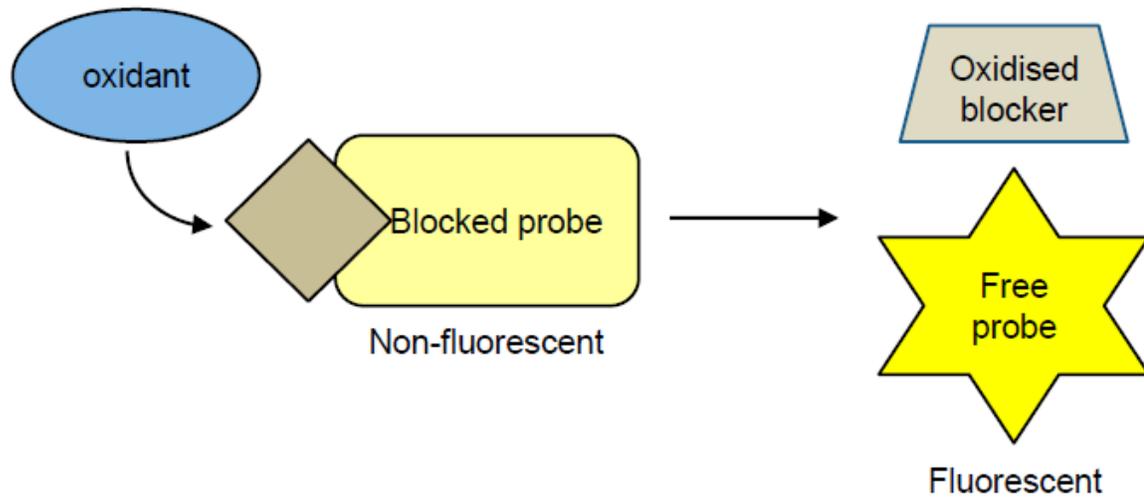
# Detecção e quantificação de $O_2^{\bullet-}$

- Hidroetidina reage com superóxido para formação de 2-hidroxi-etídio.



# Sondas para detecção de oxidantes de 2e<sup>-</sup>

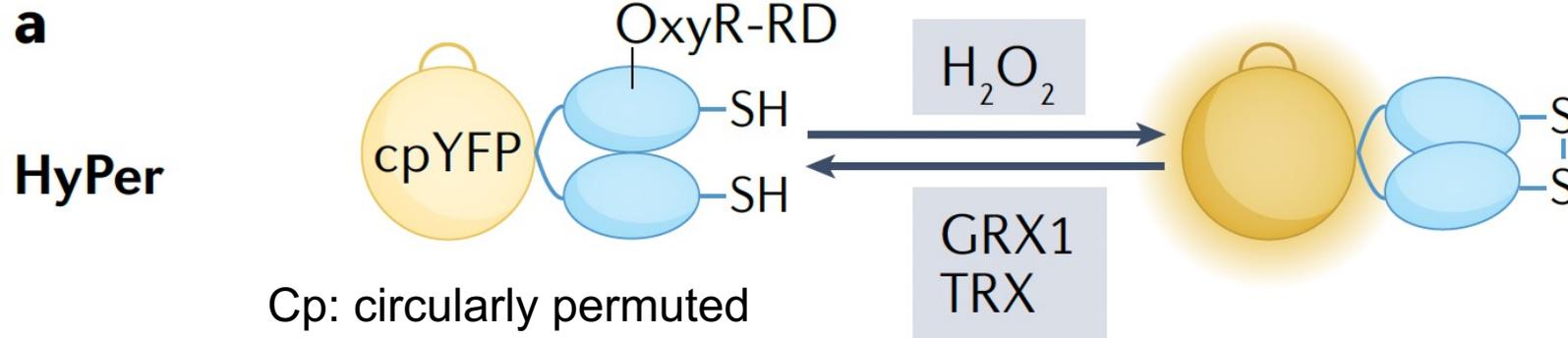
- Ataque nucleofílico das formas deprotonadas do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HOO<sup>-</sup>), ONOO<sup>-</sup> ou HCO<sub>4</sub><sup>-</sup> (CO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) em derivados do ácido borônico (boronatos).



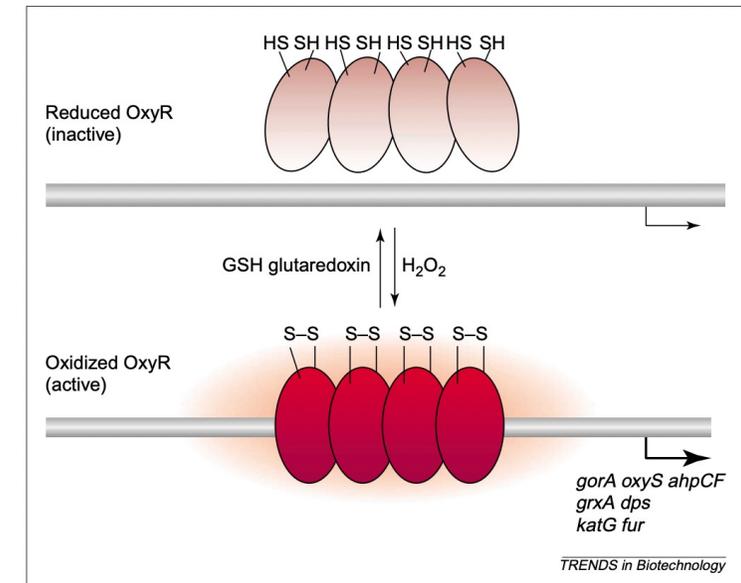
# Sondas geneticamente codificadas

- Baseadas em proteínas fluorescentes que alteram sua excitação e emissão devido a mudanças conformacionais induzidas pela oxidação de um domínio sensor de oxidantes.
- Também podem ser reduzidas por sistemas redutores, refletindo, assim, tanto a geração de oxidantes quanto o poder redutor da célula.
- Permitem melhor resolução temporal e espacial.

## Hyper: sensor OxyR de bactéria.



Sies *et al*, Nat Rev Mol Cell Biol, 2022

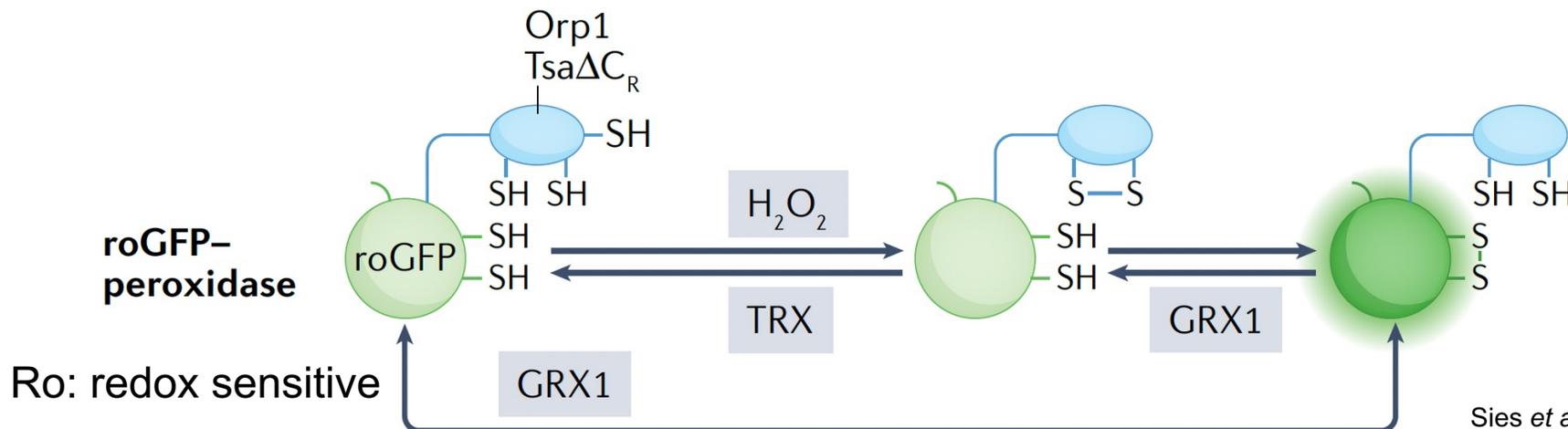


Pomposiello e Demple, Trends in Biotechnol, 2001

# Sondas geneticamente codificadas

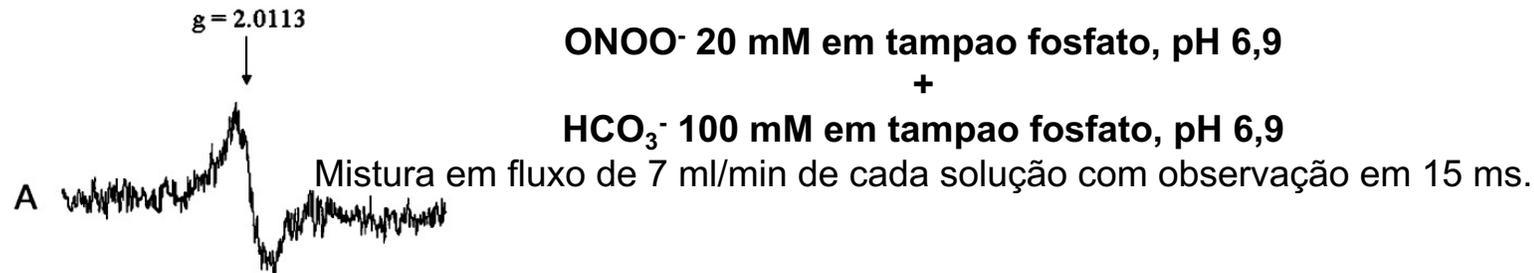
- Baseadas em proteínas fluorescentes que alteram sua excitação e emissão devido a mudanças conformacionais induzidas pela oxidação de um domínio sensor de oxidantes.
- Também podem ser reduzidas por sistemas redutores, refletindo, assim, tanto a geração de oxidantes quanto o poder redutor da célula.
- Permitem melhor resolução temporal e espacial.

**roGFP:** pode estar acoplada a diferentes sensores, operando com transmissão redox. Para detectar  $H_2O_2$ , deve-se utilizar uma peroxidase (Orp1, Tsa, etc) como sensor.



# Questões e Exercícios

1. A detecção do ânion radical carbonato na reação entre peroxinitrito e  $\text{CO}_2$  abriu novas perspectivas na área da biologia redox. Com base nos resultados desta pesquisa descritos abaixo, explique a estratégia experimental utilizada para demonstrar a produção do ânion radical carbonato.



$\text{ONOO}^-$  20 mM em tampao fosfato, pH 6,9  
+  
 $\text{HCO}_3^-$  100 mM em tampao fosfato, pH 6,9



$\text{ONOO}^-$  20 mM em tampao fosfato, pH 6,9  
+  
 $\text{HCO}_3^-$  100 mM em tampao fosfato, pH 6,9  
Mistura com fluxo parado



$\text{ONOO}^-$  20 mM em tampao fosfato, pH 6,9  
+  
Tampao fosfato, pH 6,9

Mistura em fluxo de 7 ml/min de cada solução com observação em 15 ms.



$\text{H}_2\text{O}$   
+  
 $\text{HCO}_3^-$  100 mM pH 12

Mistura em fluxo de 7 ml/min de cada solução com observação em 15 ms.

# Questões e Exercícios

- 2. O uso do EPR na investigação de mecanismos redox é limitado pela sua baixa sensibilidade. Apresente as metodologias alternativas para o estudo de radicais livres que surgiram a partir do uso do EPR.**
- 3. Qual o princípio do uso de sondas colorimétricas, fluorescentes e quimioluminescentes para o estudo de radicais livres e oxidantes? Classifique estas sondas quanto ao seu mecanismo de oxidação. Por que o uso destas sondas deve ser feito com cautela? Que medidas experimentais podem ser adotadas para minimizar a introdução de artefatos nos resultados?**
- 4. Explique o que são sondas geneticamente codificadas e suas vantagens em relação as sondas químicas.**

# Bibliografía

- **Halliwell and Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, 5<sup>th</sup> Edition, 2015.**
- **Manuscritos citados.**