

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 908**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 33/84 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013 PCT/US2013/031354**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13148246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13767904 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2831581**

54 Título: **Determinación de fracciones biológicamente lábiles de sulfuro de hidrógeno**

30 Prioridad:

30.03.2012 US 201261617995 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2019

73 Titular/es:

**BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA
STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND
MECHANICAL COLLEGE (100.0%)
LSU Health Science Center-Shreveport P.O. Box
33932
Shreveport, LA 71130-3932, US**

72 Inventor/es:

**KEVIL, CHRISTOPHER G.;
SHEN, XINGGUI y
PETER, ELVIS A.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 706 908 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Determinación de fracciones biológicamente lábiles de sulfuro de hidrógeno

La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud de patente estadounidense provisional con número de serie 61/617.995, presentada el 30 de marzo de 2012.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a un método analítico para determinar las concentraciones de H₂S libre, de sulfuro lábil en medio ácido y de azufre sulfano enlazado en fracciones biodisponibles, así como a un método para la determinación de cada una de las tres fracciones discretas biodisponibles de sulfuro de hidrógeno en muestras clínicas y de investigación, incluidas, entre otras, sangre, tejidos, fluidos y muestras medioambientales.

10 **Antecedentes**

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es una molécula gaseosa ubicua transdutora de señales que desempeña un papel indispensable en numerosas funciones celulares [1-5]. Se ha convertido también en el foco de interés de muchas iniciativas de investigación, incluida la manipulación farmacoterapéutica [1-5]. Uno de los retos en este campo lo constituye la determinación con exactitud de la concentración de H₂S biológicamente activo. La complejidad de la determinación analítica del H₂S, especialmente en los organismos vivos, refleja el hecho de que el sulfuro de hidrógeno es un gas volátil y existe en el organismo en distintas formas: una forma libre ("H₂S libre"), una fracción lábil en medio ácido y una fracción de azufre sulfano enlazado, como se muestra en la Figura 1.

El azufre se encuentra presente en el organismo en varias formas, que van de un estado divalente completamente reducido, como sulfuro, a un estado hexavalente completamente oxidado, como sulfato [1, 9, 10]. La determinación del azufre biológico se ha centrado en determinar la concentración de sulfuro (el estado reducido divalente), en parte por la dificultad que entraña la determinación con exactitud de otros estados. Los equivalentes de azufre en el estado reducido divalente son muy reactivos en las matrices biológicas, lo que hace que haya equivalentes de sulfuro presentes en las tres distintas fracciones volátiles de azufre, como se muestra en la Figura 1. Las tres fracciones son importantes para regular la cantidad de azufre biodisponible, y las más importantes son la fracción lábil en medio ácido y la fracción de azufre sulfano enlazado [10, 11].

El sulfuro de hidrógeno se produce predominantemente por vía enzimática a partir de la cisteína, por ejemplo, utilizando dos enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato, cistationina-β-sintasa y cistationina-γ-liasa, así como 3-mercaptopiruvato azufre transferasa. El sulfuro de hidrógeno libre se puede difundir a través de las membranas celulares sin la necesidad de un transportador específico [4, 6]. El H₂S libre se encuentra disuelto en el plasma y otros fluidos de tejidos. En las condiciones de los organismos de mamíferos, es decir, a un pH de 7,4 y una temperatura de 37 °C, un 18,5% del sulfuro de hidrógeno libre existe como H₂S gas, y el resto existe casi exclusivamente como anión hidrosulfuro (HS⁻) con una contribución insignificante de S²⁻ [7, 8].

El término "azufre sulfano" hace referencia a átomos de azufre divalentes enlazados a otro átomo de azufre, aunque pueden tener un hidrógeno ionizable a ciertos pH. Entre los ejemplos de estos azufres enlazados se incluyen el tiosulfato (S₂O₃²⁻), los persulfuros (R-S-SH), los tiosulfonatos (R-S(O)-S-R'), los polisulfuros (R-S_n-R), los politionatos (S_nO₆²⁻) y el azufre elemental (S⁰) [10]. Este azufre sulfano enlazado se puede liberar en condiciones reductoras. El sulfuro lábil en medio ácido, la otra fracción biodisponible importante, consiste en azufre presente en complejos de hierro-azufre contenidos en las proteínas de hierro-azufre (no hemo), las cuales son ubicuas en los organismos vivos, e incluyen una diversidad de proteínas y enzimas, incluidas, entre otras, rubredoxinas, ferredoxinas, aconitasa y succinato deshidrogenasa [10, 12]. Los sulfuros lábiles en medio ácido liberan fácilmente H₂S libre en condiciones ácidas (pH < 5,4). En el proceso de liberación en medio ácido también se puede liberar sulfuro de hidrógeno a partir de persulfuros, que siempre se han clasificado como azufre sulfano [13]. Se ha propuesto que esta "fracción de sulfuro lábil en medio ácido" es un "sumidero reversible de sulfuro" y puede constituir una importante fracción de almacenamiento que regula la cantidad de sulfuro de hidrógeno libre biodisponible [14]. Sin embargo, las formas de azufre enlazado pueden ser más importantes para almacenar y liberar el sulfuro administrado por vía exógena [11].

Una debilidad en el estudio del sulfuro ha sido la ausencia de una metodología precisa para la determinación reproducible y con exactitud del sulfuro de hidrógeno tanto *in vivo* como *in vitro*. En la determinación del H₂S libre, se han utilizado diversos métodos con resultados divergentes [10, 13, 15]. Estos métodos incluyen un método espectrofotométrico con derivatización que da lugar a la formación de azul de metileno, variaciones de este método con azul de metileno en las que se utiliza cromatografía líquida de alta resolución [10], electrodos selectivos de iones sulfuro, sensores polarográficos [16], cromatografía de gases [13, 17] y HPLC en combinación con métodos fluorimétricos en los que se utiliza monobromobimano (MBB) para derivatizar el H₂S libre [14, 18, 39, 41].

En los organismos de mamíferos se han determinado concentraciones de H₂S que van de concentraciones de nanomolar a cientos de micromolar [10, 15]. Este amplio intervalo se debe en parte a la diversidad de métodos utilizados en la determinación de H₂S. El método con azul de metileno que anteriormente se había favorecido para detectar sulfuro de hidrógeno presentaba varias desventajas: interferencias de las fracciones de sulfuro enlazado, presencia de artefactos químicos e imposibilidad de aplicarlo al sulfuro de hidrógeno libre. Además, en medio acuoso,

el azul de metileno forma con facilidad agregados diméricos y triméricos, lo que no se adecua a la ley de Beer, y que a su vez impide la determinación analítica con exactitud del sulfuro biodisponible [18].

En anteriores intentos de caracterizar la fracción de azufre sulfano enlazado se utilizó principalmente MBB junto con ditiotreitól (DTT) como agente reductor para liberar el sulfuro enlazado [10, 21]. La mayor parte de los estudios se han centrado únicamente en el sulfuro de hidrógeno libre y las fracciones lábiles en medio ácido [11, 13]. Estos resultados de estudios eran limitados debido a diversos inconvenientes problemáticos como el pH, la volatilización y la oxidación de las muestras analizadas [40].

El reactivo fluorescente MBB se ha utilizado ampliamente en la determinación mediante alquilación de diversos compuestos que contienen tiol [22]. La S-alquilación tiene lugar dos veces con sulfuro en condiciones alcalinas, de manera que se forma sulfuro de dibimano. Previamente hemos publicado un método analítico fluorimétrico con HPLC en fase inversa que estabiliza el sulfuro de hidrógeno libre biológicamente activo frente a la oxidación a la vez que permite detectar concentraciones bajas. Con este método analítico se determina el sulfuro de hidrógeno libre en plasma mediante derivatización del sulfuro con un exceso de MBB en condiciones alcalinas, con poco oxígeno y sin metales en trazas mediante separación por HPLC en fase inversa y detección fluorescente del producto fluorescente, sulfuro de dibimano, con un nivel de detección de aproximadamente 2 nM [18].

La rama que estudia la determinación de sulfuro de hidrógeno continúa evolucionando con modificaciones de diversos métodos, incluidas la publicación de distintas sondas fluorescentes [33-35], así como aplicaciones de nuevas tecnologías, como los nanotubos y los puntos cuánticos [36, 37], y un método para la determinación del sulfuro de hidrógeno disuelto en soluciones acuosas mediante el uso de un sensor electroquímico [38]. Sin embargo, no se ha publicado ningún método para la determinación con exactitud de todas las fracciones de sulfuro de hidrógeno lábil con el fin de determinar la biodisponibilidad del sulfuro de hidrógeno en muestras biológicas u otras muestras que contengan tejidos o proteínas procedentes de fuentes biológicas, como, por ejemplo, muestras de agua medioambientales. Se precisa un método que se pueda llevar a cabo a gran escala y que permita una determinación exacta y cuantitativa de las fracciones discretas de sulfuro de hidrógeno a partir de las fracciones principales de sulfuro lábil para su uso tanto en muestras experimentales como clínicas.

En la patente de EE.UU. n.º 6.468.762 se da a conocer un método para la determinación de homocisteína utilizando N,N-dipropilfenilendiamina y, como agente reductor, ditiotreitól.

En la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2007/0078113 se da a conocer un método para la determinación de sulfuro de hidrógeno en sangre en el que se utiliza una técnica de alquilación extractiva acoplada a cromatografía de gases y detección específica de masas para cuantificar el sulfuro de hidrógeno, y una solución amortiguadora desnaturalizante/reductora de cloruro de benzalconio, hidróxido de tetraetilamonio y hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en una solución amortiguadora saturada de borato.

En la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2012/0073988 se da a conocer un sensor electroquímico para la determinación de sulfuro de hidrógeno. En el artículo de Shen, X.; Patillo, C. B.; Pardue, S.; Bir, S. C.; Wang, R.; Kevill, C. G., "Measurement of plasma hydrogen sulfide *in vivo* and *in vitro*" en *Free Radical Biology & Medicine* 50: 1021-1031; 2011, se da a conocer un método para la determinación *in vivo* e *in vitro* de sulfuro de hidrógeno en plasma. En el artículo de Shen, X., *et al.*, "Fluorescent Detection and Optimization of Hydrogen Sulfide in Blood", *Free Radical Biology & Medicine*, 49, S198 2010, se da a conocer un método para detectar sulfuro de hidrógeno en sangre. En el artículo de Olsen, K: "Is hydrogen sulfide a circulating "gasotransmitter" in vertebrate blood?", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1787, n.º 7, 2009, págs. 856 - 863, se dan a conocer y se examinan determinaciones de sulfuro en sangre/plasma que se han publicado a lo largo de los últimos 30 años a fecha de la publicación del artículo desde la perspectiva de los métodos analíticos utilizados y las posibles fuentes de error.

El artículo de Mylon, S., *et al.*, "Subnanomolar Detection of Acid-Labile Sulfides by the Classical Methylene Blue Method Coupled to HPLC", *Environ. Set. Technol.*; 2001; 35(22); 4544-4548, se dan a conocer métodos que tienen como objeto las determinaciones directas y fiables de sulfuros reactivos frente al azul de metileno en agua dulce completamente oxigenada.

En el artículo de Ubuka, T, con el título "Assay Methods and Biological Roles of Labile Sulphur in Animal Tissues", *J. Chromatography B*; 2002; 781; 227-249, se evalúan aspectos analíticos, aspectos fisiológicos y aspectos patológicos del sulfuro lábil.

Descripción de la invención

Los inventores han descubierto un método para la determinación de todas las fracciones de sulfuro de hidrógeno biológico de interés, en concreto, sulfuro de hidrógeno libre, sulfuro lábil en medio ácido y azufre sulfano enlazado. Han desarrollado un nuevo protocolo para determinar por separado fracciones específicas de H₂S lábil utilizando el método del monobromobimano (MBB) en combinación con HPLC en fase inversa. Este nuevo protocolo supone la liberación selectiva, el atrapamiento y la derivatización del H₂S lábil. La determinación de H₂S libre se llevó a cabo mediante nuestro método anterior utilizando un exceso de MBB en condiciones alcalinas, con oxígeno al 1% y sin metales en trazas, seguido de HPLC en fase inversa y detección fluorescente del sulfuro de dibimano producido. El H₂S lábil en medio ácido se liberó mediante incubación de la muestra en una solución ácida (por ejemplo, solución

amortiguadora de fosfato 100 mM con DTPA 0,1 mM, pH 2,6) y se cuantificó junto con el H₂S libre en un sistema cerrado para contener el H₂S volatilizado. A continuación, el H₂S volatilizado y el H₂S libre se atraparon en una solución alcalina (por ejemplo, tris-HCl 100 mM con DTPA 0,1 mM, pH 9,5), y a continuación, se hicieron reaccionar con un exceso de monobromobimano para formar el producto estable fluorimétrico, sulfuro de dibimano. En una alícuota de muestra aparte, la determinación del sulfuro lábil total, incluida la contribución de la fracción de azufre sulfano enlazado, la fracción lábil en medio ácido y el H₂S libre, se realizó mediante la incubación de la muestra con un agente reductor, hidrocloreto de *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP), para reducir los enlaces disulfuro en una solución ácida (por ejemplo, una solución amortiguadora de fosfato 100 mM con DTPA 0,1 mM, pH 2,6) y, tras eliminar la solución, el H₂S volatilizado se atrapó utilizando una solución amortiguadora alcalina con MBB conforme a lo descrito más arriba.

La cantidad de sulfuro en las tres fracciones de sulfuro individuales se determinó entonces según se indica a continuación. La cantidad de H₂S libre se determina directamente. La cantidad de sulfuro lábil en medio ácido es la diferencia entre [el resultado de] la determinación de la fracción lábil en medio ácido + H₂S libre y [el resultado de] la determinación de H₂S libre. Finalmente, la cantidad de azufre sulfano enlazado es la diferencia entre [el resultado de] la determinación de sulfuro total y [el resultado de] la determinación de la fracción lábil en medio ácido + H₂S libre.

Este nuevo método permite una determinación muy sensible y con exactitud de las tres principales fracciones biológicas de H₂S, incluidas la fracción libre, la fracción lábil en medio ácido y el azufre sulfano enlazado en diversas muestras biológicas. Hemos utilizado este método para determinar las fracciones de sulfuro en muestras de sangre de ratones y personas. También hemos optimizado el método para lograr una determinación más exacta de las tres fracciones. Este nuevo método se puede utilizar para fines de investigación, medioambientales y de diagnóstico clínico al determinar la biodisponibilidad del sulfuro de hidrógeno en muestras biológicas o de otro tipo.

Este método presenta ventajas considerables para la fácil determinación y el diagnóstico de los niveles de toxicidad del sulfuro de hidrógeno, con inclusión de las determinaciones analíticas con precisión del sulfuro de hidrógeno en todas las fracciones biodisponibles, lo que facilita la vigilancia de la exposición a la dosis y el diagnóstico de la toxicidad del sulfuro de hidrógeno. Este método analítico también se puede utilizar para la determinación de sulfuro de hidrógeno y su carga química volátil en el ambiente, con inclusión de, entre otros, animales, plantas, suelo, fuentes de agua, microbios y otras fuentes.

Breve descripción de los dibujos

En la Figura 1 se ilustran las tres fracciones biológicas de sulfuro lábil presentes en los organismos.

En la Figura 2 se muestra una representación esquemática de una realización del método de determinación de las tres fracciones de sulfuro lábil: H₂S libre, sulfuro lábil en medio ácido y azufre sulfano enlazado.

En las Figuras 3A y 3B se ilustra el efecto de los tubos de recogida de sangre en las concentraciones plasmáticas de H₂S. En la Figura 3A se ilustran las diferencias en el H₂S libre en plasma entre los dos tubos de recogida distintos (tubos de recogida de heparina de litio y de EDTA) en comparación con los glóbulos rojos lisados (**p<0,01 frente a los tubos de recogida de heparina de litio). En la Figura 3B se ilustra la cantidad de hemoglobina sin células en el plasma de sangre recogida en los dos tubos de recogida distintos en comparación a la que hay en los glóbulos rojos lisados (**p<0,01 frente a los tubos de recogida de heparina de litio).

En la Figura 4 se ilustra la estabilidad del H₂S libre en plasma en función del tiempo.

En las Figuras 5A-5C se ilustra la optimización de las técnicas para la determinación del H₂S volatilizado utilizando sulfuro de sodio y una solución amortiguadora ácida para inicialmente generar H₂S. En la Figura 5A se ilustra el efecto del tiempo en el atrapamiento del H₂S con una solución amortiguadora alcalina al recuperar el sulfuro de hidrógeno. En la Figura 5B se ilustra la recuperación del sulfuro de hidrógeno en muestras antes de la liberación de H₂S y tras la liberación y el atrapamiento de H₂S. En la Figura 5C se ilustra el efecto del tiempo en la liberación y el atrapamiento del sulfuro procedente del plasma.

En las Figuras 6A-6C se ilustra el efecto de la presencia de proteínas plasmáticas en el atrapamiento de sulfuro de hidrógeno gas. En la Figura 6A se ilustra la concentración determinada de sulfuro, comparando las muestras atrapadas para las que el plasma permanece en el recipiente de reacción con las muestras atrapadas tras la eliminación del plasma. En la Figura 6B se ilustra el cambio en el persulfuro a lo largo del tiempo al incubar el plasma con sulfuro de sodio. En la Figura 6C se ilustra la concentración de persulfuro en proteínas en muestras de plasma con y sin la adición de KCN (cianuro de potasio).

En las Figuras 7A-7E se ilustra la optimización del método de determinación del sulfuro total utilizando TCEP como agente reductor y se muestran los cambios en las determinaciones mediante el método del MBB del sulfuro de hidrógeno liberado. En la Figura 7A se ilustra el cambio en el H₂S liberado y atrapado en muestras de sulfuro de sodio con y sin TCEP 50 mM. En la Figura 7B se ilustra el cambio en el H₂S liberado y atrapado en muestras de sulfuro de sodio con y sin TCEP 1 mM. En la Figura 7C se ilustra el efecto del tiempo de incubación con TCEP en la reducción del trisulfuro de dialilo (DATS) y la determinación posterior del H₂S liberado mediante el método del MBB. En la Figura 7D se ilustra la eficiencia del protocolo, incluida la reducción, la liberación y el atrapamiento utilizando muestras con sulfuro de sodio, DATS o ambos, con o sin TCEP 1 mM. En la Figura 7E se muestra el efecto del TCEP en la estabilidad del sulfuro de dibimano producido mediante el método del MBB a pH 9,5 y 4,5.

En las Figuras 8A-8B se ilustran las concentraciones de sulfuro de hidrógeno libre, azufre lábil en medio ácido y azufre sulfano enlazado en plasma murino y de personas. En la Figura 8A se ilustra la concentración de sulfuro en las tres fracciones de sulfuro en muestras de sangre tomadas de ratones C57BE6J sin mutaciones genéticas en comparación con ratones deficientes en cistationina-γ-liasa (CSE) (CSE^{-/-}), de los que se sabe que producen menos sulfuro de hidrógeno. En la Figura 8B se ilustra la concentración de sulfuro en las tres fracciones de sulfuro en muestras de sangre de varones sanos como controles.

Maneras de llevar a cabo la invención

El reactivo fluorescente MBB se ha utilizado ampliamente en la determinación mediante alquilación de diversos compuestos que contienen tiol [22]. Con sulfuro, la S-alquilación ocurre dos veces en condiciones alcalinas, de manera que se forma sulfuro de dibimano. Anteriormente publicamos un método analítico para la determinación *in vivo* e *in vitro* de sulfuro de hidrógeno libre en plasma mediante la derivatización del sulfuro con un exceso de monobromobimano en condiciones alcalinas, con un 1% de oxígeno y sin metales en trazas, con separación mediante HPLC en fase inversa y detección fluorescente del sulfuro de dibimano producido [18]. El sulfuro de hidrógeno libre o volatilizado se derivatiza en condiciones alcalinas, preferentemente a un pH >7,5, más preferentemente, a un pH de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 10,0 y, aún más preferentemente, a un pH de aproximadamente 9,5. La derivatización debe tener lugar en condiciones con poco oxígeno, preferentemente <5% de oxígeno, más preferentemente <2% de oxígeno y, más preferentemente, <1% de oxígeno. Además, todos los metales en trazas se deben quelar para evitar interferencias en la reacción. En los métodos de abajo, utilizamos ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) para quelar los metales en trazas. Además, utilizamos un exceso de MBB, a aproximadamente una relación de 2:1 de MBB a sulfuro. La reacción de derivatización se para a aproximadamente los 30 min con ácido (pH <5), como, por ejemplo, ácido sulfosalicílico, a aproximadamente un pH de 4,5, para estabilizar el SDB producido y para precipitar todas las proteínas. A continuación, el SDB producido se analiza mediante HPLC en fase inversa y se compara con patrones para obtener la concentración.

Para liberar sulfuro de hidrógeno a partir de la fracción lábil en medio ácido se necesita un pH inferior a 5,4 [11]. Por lo tanto, la determinación de sulfuro lábil en medio ácido supone la acidificación de la muestra, preferentemente a un pH <4,0, más preferentemente, a un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 3,0 y, aún más preferentemente, a un pH de aproximadamente 2,6. En los experimentos de más abajo, la solución ácida es solución amortiguadora de fosfato 100 mM (H₃PO₄ 30 μM y KH₂PO₄ 70 μM, DTPA 0,1 mM, pH 2,6), lo que produce la liberación de sulfuro de hidrógeno libre al *headspace* del tubo cerrado (por ejemplo, tubo Vacutainer) desde la fracción lábil en medio ácido. Tras eliminar la solución original para prevenir la interferencia de cualquier proteína, se añade una solución alcalina para atrapar y redissolver el H₂S gas. La determinación del sulfuro a continuación se lleva a cabo conforme a lo descrito más arriba para el H₂S libre. La concentración de sulfuro obtenida mediante este procedimiento refleja tanto el sulfuro de hidrógeno libre como el sulfuro de hidrógeno liberado desde la fracción lábil en medio ácido.

La cantidad total de sulfuro lábil, incluida el componente de azufre sulfano junto con el sulfuro lábil en medio ácido y el sulfuro libre, se determina utilizando un compuesto reductor junto con la solución ácida indicada más arriba para la obtención del resultado correspondiente a la [fracción] lábil en medio ácido. El agente reductor que utilizamos fue el hidrocloreto de *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP), el cual rompe los enlaces disulfuro para liberar los átomos de azufre sulfano. Aunque también se puede utilizar el ditioneitol (DTT), se prefiere el TCEP porque es hidrosoluble, no es volátil, reduce los enlaces disulfuro más rápidamente y se ha demostrado que es muy estable en un intervalo de pH (2,0-9,5) más amplio que el DTT. El TCEP no tiene una parte tiólica y presenta la ventaja adicional de no requerir la eliminación de tiol antes de la reacción con MBB. En cambio, el DTT contiene una parte tiólica y se ha señalado que tiene pequeñas cantidades de sulfuros contaminantes [21].

Sin embargo, se ha descrito la deshalogenación reductiva del monobromobimano por el TCEP, con la formación de un producto fluorescente, como una posible interferencia [25]. Aunque este producto se puede extraer con cloruro de metileno, en nuestro método no es necesario, pues el análisis por HPLC de la mezcla de reacción separa este producto del sulfuro de dibimano. Encontramos que el producto de reacción del TCEP con MBB tiene un tiempo de retención de 11,2 min (los datos no se muestran), mientras que el producto de reacción del sulfuro con MBB, es decir, el sulfuro de dibimano, tiene un tiempo de retención de 16,5 min, mientras que el MBB por sí solo tiene un tiempo de retención de 17,6 min. Para evitar que el TCEP consuma el MBB, así como cualquier efecto inhibitorio en el colorante, como se ha descrito con colorantes de yodoacetamida y maleimida [26], utilizamos una relación de MBB a TCEP superior a 10:1.

La formación de persulfuros normalmente tiene lugar a pH alcalinos a temperatura ambiente, y la determinación de persulfuros se puede llevar a cabo [midiendo la] absorbancia a 335 nM con un espectrofotómetro [27]. El sulfuro de hidrógeno libre liberado al *headspace* puede reaccionar con proteínas plasmáticas para formar persulfuros, como se describe más abajo mediante espectrofotometría. Por lo tanto, es preferible proceder a la eliminación del plasma (u otra muestra) del recipiente de reacción tras la volatilización del sulfuro de hidrógeno al *headspace* antes de reatrapar el sulfuro de hidrógeno gas volatilizado en solución alcalina para su posterior reacción con MBB.

El uso de este protocolo en muestras experimentales y clínicas permitirá la determinación de los equivalentes de sulfuro de hidrógeno biodisponible durante acontecimientos fisiopatológicos y aportará un método analítico de detección clave para estudios de farmacología con el objetivo de manipular las concentraciones de sulfuro de hidrógeno con fines terapéuticos. El método también se puede utilizar para la determinación de sulfuro en muestras

medioambientales de agua.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

5 *Materiales.* En todos estos experimentos, utilizamos: monobromobimano (MBB, Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri; n.º de catálogo B4380); sulfuro de sodio (Alfa Aesar, Ward Hall, Massachusetts, n.º de catálogo 65122), para el que se ha demostrado que posee una pureza superior en comparación con otras fuentes [8]; tubos separadores de plasma Microtainer (BD Biosciences, San José, California (EE.UU.), n.º de catálogo 365958); ácido sulfosalicílico (SSA, Sigma-Aldrich, n.º de catálogo No. S2130); acetonitrilo (CH₃CN, Sigma-Aldrich, n.º de catálogo. 34851); ácido trifluoroacético (TFA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, n.º de catálogo 28903); BD Vacutainer
10 (Becton Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, Nueva Jersey (EE.UU.), n.º de catálogo 366703); jeringa de plástico de 1 ml; tubo de PCR (Molecular Bioproducts, San Diego, California (EE.UU.), n.º de catálogo 34129); aguja espinal de 3,5 pulgadas con un calibre de 25 (BD, n.º de catálogo 405180); y aguja espinal de ½ pulgada con un calibre de 30 (BD, n.º de catálogo 305106). Todos los tubos de recogida (tubos Vacutainer con heparina de litio o EDTA) que se utilizaron eran de plástico para evitar que el H₂S se uniera al vidrio. A menos que se indique lo contrario, todos los
15 demás reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Instrumental. En todos estos experimentos, se utilizó: una balanza de platos (sensibilidad de 0,1 mg) (Mettler; AG 104); mezclador Vortex (Thermolyne; Maxi Mix II); espectrofotómetro SmartSpect™ Plus (Bio-RAD); sistema HPLC: equipo de cromatografía líquida ultrarrápida (UFLC) Shimadzu Prominence equipado con detector fluorescente (HPLC 20A Prominence); cámara hipóxica (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, Michigan (EE.UU.)); caja con guantes grande); y mezclador Nutating (VWR, Radnor, Pensilvania (EE.UU.); S0500).
20

Animales y personas. Se compraron ratones C57Bl/6J sin mutaciones genéticas (Laboratorio Jackson, Bar Harbor, Maine, EE.UU.), y los ratones deficientes en CSE (CSE -/-) se obtuvieron del Dr Rui Wang, de la Universidad de Lakehead (Thunder Bay, Ontario, Canadá). El uso de ratones para este estudio fue autorizado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la facultad de ciencias de la salud de la universidad del estado de Luisiana en Shreveport, EE.UU. (Louisiana State University Health Shreveport). Todos los animales recibieron un trato humano de conformidad con la legislación. La inscripción de sujetos varones sanos fue autorizada por el Comité de Ética de Investigación Clínica de la facultad de ciencias de la salud de la universidad del estado de Luisiana en Shreveport, EE.UU. (Louisiana State University Health Shreveport). Los sujetos humanos eran varones de entre 23 y 34 años de edad.
25

Preparación de la muestra y detección del sulfuro de hidrógeno libre [18]. El método fue similar a uno previamente publicado [18]. En resumen, se colocaron en hielo tubos separadores de plasma BD Microtainer con heparina de litio para muestras murinas y tubos BD Vacutainer de plástico con heparina de litio para muestras de personas. Como anticoagulante se utilizó heparina de litio porque se ha demostrado que tiene menos tendencia a causar hemólisis que el EDTA [32; y resultados más abajo]. La sangre se recogió con jeringas de plástico o tubos capilares de plástico directamente en tubos separadores de plasma, especialmente evitando el uso de jeringas de vidrio. La sangre se colocó en los tubos y estos se centrifugaron a una FCR de 3000 durante 2 minutos a 4 °C para las muestras murinas, y a una FCR de 1500 durante 4 minutos a 4 °C para las muestras de personas. En todos estos experimentos, todas las muestras se mantuvieron a 4 °C para minimizar la degradación o producción enzimática de sulfuro de hidrógeno, y la unión del H₂S a los recipientes del experimento se minimizó utilizando recipientes de reacción de polipropileno. La reacción de derivatización del sulfuro con monobromobimano se llevó a cabo en una cámara hipóxica con O₂ al 1 % transfiriendo 30 µl de plasma, 70 µl de tris-HCl (100 mM, DTPA 0,1 mM, pH 9,5) y 50 µl de solución de MBB (10 mM en CH₃CN) al tubo de PCR. En lo que respecta a la determinación de sulfuro de hidrógeno, la derivatización se llevó a cabo en la oscuridad debido a que MBB es un reactivo sensible a la luz. Además, se mantuvo un ambiente de oxígeno al 1% durante todo el protocolo de reacción con ácido y agentes reductores, así como durante el proceso de reacción con MBB.
30
35
40
45

La mezcla con MBB se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y a continuación, la incubación se paró mediante la adición de 50 µl de solución de ácido sulfosalicílico 200 mM enfriada con hielo (para parar la reacción y precipitar la proteína) y se agitó con un vórtex durante 10 s. Los tubos se colocaron en hielo durante 10 min y a continuación, se centrifugaron a 12 000 rpm a 4 °C durante 10 min. Tras la centrifugación, se inyectaron 10 µl de sobrenadante a un sistema de HPLC en fase inversa equipado con una columna Agilent Eclipse XDB-C18 (5 µm, 80 Å, 4,6 mm × 250 mm) equilibrado con CH₃CN al 15% en agua que contenía TFA al 0,1% (v/v). La detección fluorescente se fijó a 390 nm (excitación) y 475 nm (emisión). El monobromobimano y el sulfuro de dibimano se separaron mediante el gradiente de dos fases móviles que se muestra en la Tabla 1 (fase A: agua con TFA al 0,1% (v/v); y fase B: CH₃CN al 99,9%, TFA al 0,1% (v/v)) a un caudal de 0,6 ml/min. Los tiempos de retención correspondientes a los picos de sulfuro de dibimano y monobromobimano fueron 16,5 y 17,6 minutos, respectivamente. La cantidad de sulfuro de hidrógeno se determinó a partir de las representaciones gráficas lineales de las áreas de los picos de sulfuro de dibimano obtenidos mediante HPLC frente a concentraciones conocidas de una solución de sulfuro.
50
55

Tabla 1- Gradiente de la fase móvil

Tiempo (min)	% de fase A	% de fase B
0	85	15
5	65	35
16	45	55
23	30	70
24	10	90
26	10	90
28	85	15

5 *Preparación de la muestra y detección de sulfuro de hidrógeno en la fracción lábil en medio ácido.* Para liberar sulfuro de hidrógeno a partir de la fracción lábil en medio ácido se necesita un pH inferior a 5,4 [11]. Por lo tanto, la determinación de sulfuro lábil en medio ácido supone la acidificación de la muestra, 50 µl de plasma, realizada añadiendo 450 µl de solución amortiguadora de fosfato 100 mM (H₃PO₄ 30 µM y KH₂PO₄ 70 µM, DTPA 0,1 mM, pH 2,6), lo que causa la liberación de sulfuro de hidrógeno libre al *headspace* de un tubo Vacutainer desde la fracción lábil en medio ácido. Tras la incubación durante 30 min, la solución se retira para eliminar todas las proteínas plasmáticas, y se añade solución amortiguadora de tris-HCl 100 mM (DTPA 0,1 mM, pH 9,5) para redissolver el sulfuro de hidrógeno gas de vuelta a la solución amortiguadora. A continuación, el protocolo prosigue según se describe más arriba, con la adición de MBB y la determinación de la concentración de sulfuro mediante el método del MBB conforme a lo descrito más arriba. La concentración de sulfuro obtenida de este modo refleja tanto el sulfuro de hidrógeno libre como el sulfuro de hidrógeno liberado desde la fracción lábil en medio ácido. La concentración de sulfuro lábil en medio ácido se puede calcular sustrayendo del resultado correspondiente a la fracción lábil en medio ácido el resultado correspondiente a la fracción de H₂S libre.

10 *Preparación de la muestra y detección de sulfuro de hidrógeno en el componente de sulfano.* El componente de azufre sulfano se determina mediante el tratamiento inicial de una muestra de plasma de 50 µl con 450 µl de solución amortiguadora de fosfato 100 mM (H₃PO₄ 30 µM y KH₂PO₄ 70 µM, DTPA 0,1 mM, pH 2,6; hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP)). El TCEP rompe los enlaces disulfuro para liberar los átomos de azufre. A continuación, la muestra se incuba durante 30 min, la solución se elimina y se prosigue conforme a lo descrito más arriba para la determinación del componente lábil en medio ácido. Se ha descrito la deshalogenación reductiva del monobromobimano por el TCEP, con la formación de un producto fluorescente, como una posible interferencia [25]; aunque este producto se puede extraer con cloruro de metileno, ello no es necesario, pues el análisis por HPLC de la mezcla de reacción separa este producto del sulfuro de dibimano. Para evitar que el TCEP consuma el MBB, así como cualquier efecto inhibitor en el colorante, como se ha descrito con colorantes de yodoacetamida y maleimida [26], utilizamos una relación de MBB a TCEP superior a 10:1. A continuación, el protocolo prosigue según se describe más arriba, con la adición de MBB y la determinación de la concentración de sulfuro mediante el método del MBB conforme a lo descrito más arriba. La concentración de sulfuro resultante refleja la cantidad total de sulfuro de hidrógeno libre y sulfuro de hidrógeno liberado tanto desde la fracción lábil en medio ácido como desde la fracción de sulfuro enlazado. La concentración de sulfuro procedente de la fracción de sulfano [sic] enlazado se puede calcular sustrayendo de este resultado el resultado correspondiente a la fracción lábil en medio ácido.

Ejemplo 2

Optimización del protocolo para la determinación del H₂S libre

35 Se seleccionaron tubos de recogida de heparina de litio tras demostrar con experimentos preliminares realizados con sangre procedente de personas donantes sanas que los tubos de heparina de litio disminuían la hemólisis en comparación con los tubos de recogida de EDTA. Para esta prueba, se obtuvo sangre venosa de voluntarios sanos en tubos de recogida Vacutainer de heparina de litio o EDTA, y la determinación de H₂S libre en plasma se llevó a cabo conforme a lo descrito más arriba. En la Figura 3A se ilustran las diferencias en el H₂S libre en plasma entre los distintos tubos de recogida frente a los glóbulos rojos lisados (**p<0,01 frente a los tubos de recogida de heparina de litio). Para garantizar la coherencia, a partir de entonces se utilizaron tubos de recogida de heparina de litio en todos los experimentos. En la Figura 3B se ilustra la cantidad de hemoglobina sin células, determinada mediante el ensayo de Drabkin, en el plasma de sangre recogida en distintos tubos frente a [la que hay en] los glóbulos rojos lisados (**p<0,01 frente a los tubos de recogida de heparina de litio). Una vez más, los tubos de heparina de litio mostraron menos lisis celular.

45 Además, la estabilidad del H₂S libre en plasma se determinó en función del tiempo transcurrido tras la recogida. La sangre venosa se recogió en tubos Vacutainer de heparina de litio y se incubó sobre hielo durante diferentes intervalos de tiempo. La determinación de H₂S libre en plasma se llevó a cabo en cada punto temporal conforme a lo descrito más arriba, y los resultados se muestran en la Figura 4. Los resultados se compararon con una ANOVA unilaterial con prueba *a posteriori* de Bonferroni hasta el punto temporal de 0 minutos (*p<0,05 frente a todos los puntos temporales). Se observó una reducción significativa en H₂S únicamente en la muestra de 30 min.

Ejemplo 3

Optimización de la eficiencia de la detección de sulfuro lábil en medio ácido y azufre sulfano

Con el fin de establecer la eficiencia de la técnica de liberación en medio ácido y atrapamiento en medio alcalino con solución amortiguadora de tris-HCl del gas sulfuro en el espacio de cabeza (también conocido como *headspace*), se determinó el tiempo de atrapamiento óptimo utilizando una solución de molaridad conocida de sulfuro de sodio. En la Figura 5A se muestra el efecto del tiempo de atrapamiento en la recuperación del sulfuro de hidrógeno. Después de incubar durante 30 min 50 μ l de sulfuro de sodio 40 μ M con 450 μ l de solución amortiguadora de fosfato 0,1 M a pH 2,6, el sulfuro de hidrógeno gas se reatrapó con 500 μ l de solución amortiguadora de tris-HCl 0,1 M (DTPA 0,1 mM, pH 9,5) y, a continuación, se llevó a cabo su determinación con el método del MBB conforme a lo descrito más arriba. Como se muestra en la Figura 5A, el porcentaje de recuperación más elevado se logró tras 30 min de atrapamiento del sulfuro gas del *headspace*, de modo que se estableció este intervalo de tiempo como el óptimo.

A continuación, se examinó el efecto de la liberación y el reatrapamiento del sulfuro de sodio en la recuperación del sulfuro de hidrógeno, y los resultados se muestran en la Figura 5B. Se comparó el sulfuro de hidrógeno detectado para sulfuro a una concentración de 40 μ M antes de la liberación y tras la liberación y el reatrapamiento. Los tiempos de liberación y atrapamiento fueron de 30 min. En la Figura 5B se muestra que la recuperación porcentual del sulfuro de hidrógeno volatilizado en medio ácido era óptima tanto cuando el contenido de sulfuro se determinó directamente en una solución con molaridad conocida de sulfato de sodio, como cuando se llevó a cabo la liberación en medio ácido y el reatrapamiento en medio alcalino.

Se determinó el tiempo óptimo para la liberación del sulfuro de hidrógeno tras la acidificación del plasma, y los resultados se muestran en la Figura 5C. En 450 μ l de solución amortiguadora de fosfato 0,1 M a pH 2,6 se incubaron 50 μ l de plasma durante distintos intervalos de tiempo y a continuación, se llevó a cabo el reatrapamiento durante 30 min, con lo que se demostró que el tiempo óptimo de liberación era de 30 min. Por lo tanto, en todos los experimentos posteriores el tiempo de liberación fue de 30 min y el tiempo de atrapamiento, de 30 min. Además, se llevó a cabo la determinación del sulfuro de hidrógeno residual en el plasma tras la volatilización mediante acidificación, y resultó ser $0,0125 \pm 0,0029 \mu$ M, ligeramente superior a la concentración de fondo de la solución de la reacción, que era $0,00725 \pm 0,0018 \mu$ M. Esta no representa una fracción significativa del H₂S detectado en el espacio de cabeza tras la volatilización en medio ácido.

Ejemplo 4

Efecto de las proteínas plasmáticas en el atrapamiento del sulfuro de hidrógeno volatilizado

Para comprobar la interacción de las proteínas plasmáticas con el sulfuro de hidrógeno liberado al espacio de cabeza del tubo Vacutainer durante el reatrapamiento en medio alcalino, se determinó la cantidad de sulfuro de hidrógeno detectada cuando el plasma se retuvo en el tubo Vacutainer y se comparó con la cantidad detectada en ausencia de plasma. Además, se determinó la formación de persulfuros en el plasma. Tras centrifugar, se añadieron 50 μ l de plasma por separado en dos grupos de tubos Vacutainer BD de 4 ml. Se añadieron 450 μ l de solución amortiguadora de fosfato 100 mM (DTPA 0,1 mM, pH 2,6) a estos tubos, y los tubos se incubaron en un mezclador Nutating durante 30 min. En un tubo, la solución se retiró a través del tapón con una aguja espinal de un calibre de 25 y una jeringa de plástico de 1 ml, y, a continuación, se añadieron 500 μ l de solución amortiguadora de tris-HCl 100 mM (DTPA 0,1 mM, pH 9,5) al tubo Vacutainer BD. En el otro tubo, se añadieron 25 μ l de solución de NaOH 3 M para ajustar el pH a ~9,5. A continuación, los tubos se incubaron durante 30 min en el mezclador Nutating. Las concentraciones de sulfuro en los tubos Vacutainer BD se determinaron mediante el método del MBB conforme a lo descrito más arriba. Además, 20 μ l de las muestras se mezclaron con 200 μ l de KCN 100 mM (disuelto en NaOH 10 mM) y, a continuación, se midió la A₃₃₅ [28], y el desarrollo posterior de un color rojo se facilitó mediante la adición de 200 μ l de solución de nitrato férrico (se disolvieron 2 g de Fe(NO₃) y 9 ml de H₂O en 20 ml de ácido nítrico al 65%) [29]. De manera similar, se incubó Na₂S a concentraciones de 0, 30 o 300 μ M (concentración final) con la mezcla de plasma y solución amortiguadora de tris-HCl 0,1 M (v/v 1:9, pH 9,5) en condiciones hipóxicas (O₂ al 1%), y la A₃₃₅ se midió mediante espectrofotometría a los 0, 10, 30 y 60 min conforme a lo descrito previamente [30].

En las Figuras 6A-6C se muestra el efecto de las proteínas plasmáticas en el atrapamiento del sulfuro de hidrógeno gas. En la Figura 6A se muestra una comparación de la concentración de sulfuro entre las muestras atrapadas para las que el plasma permanece en el recipiente de reacción y las muestras atrapadas tras la eliminación del plasma. Después de incubar durante 30 min 50 μ l de plasma con 450 μ l de solución amortiguadora de fosfato 0,1 M a pH 2,6, al primer grupo se añadieron directamente ~25 μ l de solución de NaOH 3 M al plasma para ajustar el pH a 9,5 y, a continuación, se llevó a cabo el atrapamiento durante 30 min. En el segundo grupo, el plasma se eliminó del recipiente de reacción, y el sulfuro de hidrógeno liberado se atrapó con 500 μ l de solución amortiguadora de tris-HCl 0,1 M a pH 9,5 durante 30 min. A continuación, se llevó a cabo la determinación de sulfuro mediante el método del MBB. Como se muestra en la Figura 6A, la concentración de sulfuro de hidrógeno determinada disminuyó cuando el proceso de atrapamiento se llevó a cabo en presencia de plasma en el recipiente de reacción, al contrario de lo que sucede cuando este se elimina y se reemplaza con solución amortiguadora de tris-HCl 100 mM (pH 9,5).

En todos estos experimentos, la volatilización de sulfuro de hidrógeno de las muestras se llevó a cabo mediante la

recogida inmediata de las muestras en tubos de vacío que se mantuvieron en todo momento sin plasma tras la volatilización, y, a fin de evitar la pérdida de vacío y de muestras de gas, la transferencia de los reactivos y las soluciones se realizó por medio de una aguja introducida en la llave de paso de goma de los tubos de vacío [31]. La pérdida de sulfuro de hidrógeno en presencia de plasma se atribuyó a la formación de persulfuros en proteínas, con base en la determinación de persulfuros formados mediante el método de la cianólisis y su comparación con sulfuro de sodio a una concentración molar conocida que ha reaccionado con plasma (Figuras 6B y 6C).

En las Figuras 6B y 6C se muestra el efecto del sulfuro en la formación de persulfuros en proteínas. Como se muestra en la Figura 6B, se incubó sulfuro de sodio a concentraciones de 0, 30 y 300 μM con plasma, y la determinación del persulfuro generado resultante se llevó a cabo en distintos puntos temporales. En la Figura 6C, se determina el efecto del sulfuro en la formación de persulfuros en proteínas. La formación de persulfuros se determinó en las muestras atrapadas con plasma con y sin KCN mediante mediciones de la absorbancia a 335 nm.

Ejemplo 5

Efecto del TCEP en la reacción del sulfuro de hidrógeno con monobromobimano

Debido a que el TCEP es un fuerte agente reductor que puede reaccionar con MBB, se estudió el efecto de las distintas concentraciones de TCEP en la derivatización del sulfuro. Se preparó una solución madre de TCEP en agua con una concentración de 100 mM. Las [soluciones con las] concentraciones respectivas finales de TCEP (1 y 50 mM) se incubaron con sulfuro de sodio 20 μM durante 10 min. Se transfirieron 30 μl de la muestra de TCEP/sulfuro de sodio al tubo de PCR con 70 μl de solución amortiguadora (tris-HCl 100 mM, DTPA 0,1 mM, pH 9,5) para la reacción. A continuación, se añadieron 50 μl de solución de MBB 10 mM, y la mezcla se incubó en la cámara hipóxica durante 30 min en O_2 al 1% a temperatura ambiente. Se añadieron 50 μl de solución de SSA 200 mM para parar la reacción, y se utilizaron 10 μl de la solución de reacción para el análisis mediante HPLC en fase inversa con el fin de determinar la concentración de sulfuro. Antes de la derivatización del sulfuro, se añadió TCEP 50 mM o 1 mM a la solución madre de sulfuro que contenía sulfuro de sodio 40 μM . Como se muestra en las Figuras 7A y 7B, el TCEP a una concentración de 50 mM alteró la reacción entre el sulfuro y el monobromobimano, pero no se observó un efecto significativo a una concentración de 1 mM.

El trisulfuro de dialilo (DATS) es un polisulfuro orgánico que actúa como donador de sulfuro. El DATS se utiliza para verificar la eficiencia de la reducción de los puentes disulfuro con TCEP. Se analizó el efecto del TCEP en la reducción del trisulfuro de dialilo (DATS) utilizando 50 μl de DATS 25 μM incubado con 450 μl de solución amortiguadora de fosfato 0,1 M (TCEP 1 mM, pH 2,6) en distintos puntos temporales, y el sulfuro de hidrógeno resultante se atrapó con solución amortiguadora de tris-HCl 0,1 M durante 30 min. Como se muestra en la Figura 7C, un 95% de DATS se redujo a sulfuro libre tras la incubación con solución amortiguadora de fosfato 100 mM (DTPA 0,1 mM y TCEP 1 mM, pH 2,6) durante 30 min. Con el fin de comprobar la eficiencia del protocolo, incluida la reducción, la liberación y el atrapamiento, se utilizó Na_2S 5 μM y DATS 25 μM con y sin TCEP. Como se muestra en la Figura 7D, se demostró que el DATS es estable en ausencia de TCEP, pero se reduce completamente con TCEP, con la liberación prevista de sulfuro de hidrógeno al utilizar solución amortiguadora de fosfato 100 mM (DTPA 0,1 mM y TCEP 1 mM, pH 2,6) durante 30 min. Esto se demostró en presencia y en ausencia de sulfuro de sodio 5 μM junto con DATS 25 μM .

Ejemplo 6

Estabilidad del sulfuro de dibimano

Se investigó la estabilidad del sulfuro de dibimano producido en presencia de TCEP. Se prepararon dos soluciones a un pH de 4,5 y 9,5 cada una, y se preparó una solución de sulfuro de dibimano a una concentración de 12 μM utilizando las soluciones con los dos distintos pH. Las mezclas se trataron con o sin TCEP 1 mM. En distintos puntos temporales, se retiraron alícuotas (de 200 μl cada una) de estas soluciones y se analizaron mediante HPLC en fase inversa. La reacción entre el sulfuro de hidrógeno y el MBB tuvo lugar en condiciones alcalinas utilizando la solución amortiguadora descrita más arriba (pH 9,5) y a continuación, se paró y se estabilizó con ácido sulfosalicílico 200 mM. Como se muestra en la Figura 7E, la hidrólisis del SDB aumentó a pH 9,5 en presencia de TCEP 1 mM o 0 mM, y, tras una incubación de 20 horas, solo quedaba un 5% de SDB. Sin embargo, en la solución amortiguadora ácida, el SDB se mantuvo estable a 4 °C en presencia de TCEP 1 mM o 0 mM.

Ejemplo 7

Comparación del sulfuro libre, el sulfuro lábil en medio ácido y el sulfuro sulfano enlazado en muestras de plasma murinas y de personas

Se determinaron las concentraciones de sulfuro de hidrógeno libre, sulfuro lábil en medio ácido y sulfuro sulfano enlazado en el plasma de ratones C57BL/6J sin mutaciones genéticas (ratones WT), ratones deficientes en el gen CSE (ratones CSE KO) y personas voluntarias sanas. Como se muestra en la Figura 8A, los ratones deficientes en CSE, de los que se sabe que producen menos sulfuro de hidrógeno, mostraron una disminución significativa en la cantidad de sulfuro libre y lábil en medio ácido en comparación con los ratones sin mutaciones genéticas, pero no mostraron diferencias significativas en [la cantidad de] azufre sulfano enlazado (Figura 8A). En las muestras de personas, la fracción más abundante fue la fracción lábil en medio ácido, con cantidades escasas de tanto sulfuro de

hidrógeno libre como de azufre sulfano enlazado. (Figura 8B). Las concentraciones más elevadas de la fracción lábil en medio ácido en el plasma de tanto ratones como personas frente a las concentraciones más bajas de sulfuro de hidrógeno libre respaldan la teoría de que la fracción lábil en medio ácido actúa como un sumidero reversible de sulfuro, en el que se puede almacenar sulfuro de hidrógeno o desde el que se puede liberar sulfuro de hidrógeno para que este ejerza su función biológica.

Por lo tanto, hemos desarrollado un método para determinar la concentración de sulfuro de hidrógeno lábil a partir de las tres fracciones principales de sulfuro de hidrógeno lábil: H₂S gas libre, sulfuro lábil en medio ácido y azufre sulfano enlazado.

Referencias

- [1] Kabil, O.; Banerjee, R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *The Journal of biological chemistry* 285:21903-21907; 2010.
- [2] Lavu, M.; Bhushan, S.; Lefer, D. J. Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 120:219-229; 2011.
- [3] Olson, K. R. The therapeutic potential of hydrogen sulfide: separating hype from hope. *American journal of physiology* 301:R297-312; 2011.
- [4] Wang, R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 16:1792-1798; 2002.
- [5] Zhao, W.; Zhang, J.; Fu, Y.; Wang, R. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO journal* 20:6008-6016; 2001.
- [6] Mathai, J. C.; Missner, A.; Kugler, P.; Saporov, S. M.; Zeidel, M. F.; Fee, J. K.; Pohl, P. No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:16633-16638; 2009.
- [7] Dombkowski, R. A.; Russell, M. J.; Olson, K. R. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *American journal of physiology* 286:R678-685; 2004.
- [8] Hughes, M. N.; Centelles, M. N.; Moore, K. P. Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide *in vitro* and its measurement *in vivo*: a review. *Free radical biology & medicine* 47:1346-1353; 2009.
- [9] Kajimura, M.; Fukuda, R.; Bateman, R. M.; Yamamoto, T.; Suematsu, M. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H₂S gas biology. *Antioxidants & redox signaling* 13:157-192; 2010.
- [10] Ubuka, T. Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues. *J. Chromatogr. B Analyt. Techno. Biomed. Life Sci.*, 781:227-249; 2002.
- [11] Ishigami, M.; Hiraki, K.; Umemura, K.; Ogasawara, Y.; Ishii, K.; Kimura, H. A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxidants & redox signaling* 11:205-214; 2009.
- [12] Johnson, D. C.; Dean, D. R.; Smith, A. D.; Johnson, M. K. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual review of biochemistry* 74:247-281; 2005.
- [13] Levitt, M. D.; Abdel-Rehim, M. S.; Fume, J. Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. *Antioxidants & redox signaling* 15:373-378; 2011.
- [14] Wintner, E. A.; Deckwerth, T. L.; Langston, W.; Bengtsson, A.; Leviten, D.; Hill, P.; Insko, M. A.; Dumpit, R.; VandenEkar, E.; Toombs, C. F.; Szabo, C. A monobromobimane-based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood. *British journal of pharmacology* 160:941-957; 2010.
- [15] Whiteman, M.; Le Trionnaire, S.; Chopra, M.; Fox, B.; Whatmore, J. Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools. *Clin Sci (Lond)* 121:459-488; 2011.
- [16] Doeller, J. E.; Isbell, T. S.; Benavides, G.; Koenitzer, J.; Patel, H.; Patel, R. P.; Lancaster, J. R., Jr.; Darley-Usmar, V. M.; Kraus, D. W. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Analytical biochemistry* 341:40-51; 2005.
- [17] Tangerman, A.; Meuwese-Arends, M. T.; van Tongeren, J. H. New methods for the release of volatile sulfur compounds from human serum: its determination by Tenax trapping and gas chromatography and its application in liver diseases. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 106:175-182; 1985.
- [18] Shen, X.; Pattillo, C. B.; Pardue, S.; Bir, S. C.; Wang, R.; Kevil, C. G. Measurement of plasma hydrogen sulfide *in vivo* and *in vitro*. *Free radical biology & medicine* 50:1021-1031; 2011.

- [19] Olson, K. R. Is hydrogen sulfide a circulating "gasotransmitter" in vertebrate blood? *Biochimica et biophysica acta* 1787:856-863; 2009.
- [20] Fume, J.; Saeed, A.; Levitt, M. D. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *American journal of physiology* 295:R1479-1485; 2008.
- 5 [21] Togawa, T.; Ogawa, M.; Nawata, M.; Ogasawara, Y.; Kawanabe, K.; Tanabe, S. High performance liquid chromatographic determination of bound sulfide and sulfite and thiosulfate at their low levels in human serum by pre-column fluorescence derivatization with monobromobimane. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 40:3000-3004; 1992.
- [22] Kosower, N. S.; Kosower, E. M. Thiol labeling with bromobimanes. *Methods in enzymology* 143:76-84; 1987.
- 10 [23] Tanabe, S. [Development of assay methods for endogenous inorganic sulfur compounds and sulfurtransferases and evaluation of the physiological functions of bound sulfur], *Yakugaku Zasshi* 128:881-900; 2008.
- [24] Han, J. C.; Han, G. Y. A procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Analytical biochemistry* 220:5-10; 1994.
- [25] Graham, D. E.; Harich, K. C.; White, R. H. Reductive dehalogenation of monobromobimane by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *Analytical biochemistry* 318:325-328; 2003.
- 15 [26] Tyagarajan, K.; Pretzer, E.; Wiktorowicz, J. E. Thiol-reactive dyes for fluorescence labeling of proteomic samples. *Electrophoresis* 24:2348-2358; 2003.
- [27] Rao, G. S.; Gorin, G. *Organic Chemistry* 24:749-753; 1959.
- [28] Cavallini, D.; De Marco, C.; Mondovi, B.; Mori, B. G. The cleavage of cystine by cystathionase and the transulfuration of hypotaurine. *Enzymologia* 22:161-173; 1960.
- 20 [29] Sorbo, B. On the formation of thiosulfate from inorganic sulfide by liver tissue and heme compounds. *Biochimica et biophysica acta* 27:324-329; 1958.
- [30] Zal, F.; Leize, E.; Lallier, F. H.; Toulmond, A.; Van Dorsselaer, A.; Childress, J. J. S-Sulfohemoglobin and disulfide exchange: the mechanisms of sulfide binding by *Riftia pachyptila* hemoglobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:8997-9002; 1998.
- 25 [31] Deleon, E. R.; Stoy, G. F.; Olson, K. R. Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments. *Analytical biochemistry*; 2011.
- [32] Unger, J.; Filippi, G.; Patsch, W. Measurements of free hemoglobin and hemolysis index: EDTA- or lithium-heparinate plasma? *Clinical chemistry* 53:1717-1718; 2007.
- 30 [33] Peng, H.; Cheng, Y.; Dai, C.; King, A. L.; Predmore, B. L.; Lefer, D. J.; Wang, B. A fluorescent probe for fast and quantitative detection of hydrogen sulfide in blood. *Angewandte Chemie (International ed)* 50:9672-9675; 2011.
- [34] Qian, Y.; Karpus, J.; Kabil, O.; Zhang, S. Y.; Zhu, H. L.; Banerjee, R.; Zhao, J.; He, C. Selective fluorescent probes for live-cell monitoring of sulphide. *Nature communications* 2:495; 2011.
- [35] Lippert, A. R.; New, E. J.; Chang, C. J. Reaction-based fluorescent probes for selective imaging of hydrogen sulfide in living cells. *Journal of the American Chemical Society* 133:10078-10080; 2011.
- 35 [36] Mubeen, S.; Zhang, T.; Chartuprayoon, N.; Rheem, Y.; Mulchandani, A.; Myung, N. V.; Deshusses, M. A. Sensitive detection of H₂S using gold nanoparticle decorated single-walled carbon nanotubes. *Analytical chemistry* 82:250-257; 2010.
- [37] Zhang, B. H.; Wu, F. Y.; Wu, Y. M.; Zhan, X. S. Fluorescent method for the determination of sulfide anion with ZnS:Mn quantum dots. *Journal of fluorescence* 20:243- 250; 2010.
- [38] Zhang, X; Kraus, D. Sensor for measurement of hydrogen sulfide. US 2012/0073988 A1; 2012.
- 40 [39] Kolluru, G.K., Shen, X., Kevil, C.K. Detection of hydrogen sulfide in biological samples: current and future, *Expert Reviews*, 4: 9-12; 2011.
- [40] Olson, K.H. A practical look at the chemistry and biology of hydrogen sulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17: 32-44; 2012.
- 45 [41] O'Reilly, J.W.; Dicoski, G.W.; Shaw, M.J.; Haddad, P R. Chromatographic and electrophoretic separation of inorganic sulfur and sulfur-oxygen species. *Analytica Chimica Acta*, 432:165-192; 2001.
- [42] Burns, J.A.; Butler, J.C.; Moran, J.; Whitesides, G.M, Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J. Org. Chem.* 56:2648-2650.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar en una muestra las concentraciones de H₂S libre, de sulfuro lábil en medio ácido y de azufre sulfano enlazado; comprendiendo dicho método las siguientes etapas:
- 5 (a) colocar porciones independientes X, Y y Z de la muestra en tres recipientes evacuados individuales, de manera que la mayor parte del H₂S libre se distribuye al espacio de cabeza de cada uno de los recipientes respectivos;
- 10 (b) combinar la porción X con una solución amortiguadora alcalina, un agente quelante para quelar cualquier metal en trazas que pudiera estar presente en la muestra, y monobromobimano, e incubar en condiciones con poco oxígeno; de manera que el H₂S libre reaccione con el monobromobimano para formar el producto sulfuro de dibimano; separar mediante cromatografía el sulfuro de dibimano producido de otros componentes de la mezcla resultante; y determinar por fluorimetría la cantidad de sulfuro de dibimano producido separado como una medida de la concentración de H₂S libre en la muestra (resultado B);
- 15 (c) combinar la porción Y con una solución amortiguadora ácida que tiene un pH inferior a aproximadamente 5,4 e incubar para liberar sulfuro lábil en medio ácido como H₂S libre; combinar la porción Y con una solución amortiguadora alcalina, un agente quelante para quelar cualquier metal en trazas que pudiera estar presente en la muestra, y monobromobimano, e incubar en condiciones con poco oxígeno; de manera que el H₂S libre reaccione con el monobromobimano para formar el producto sulfuro de dibimano; separar mediante cromatografía el sulfuro de dibimano producido de otros componentes de la mezcla resultante; y determinar por fluorimetría la cantidad de sulfuro de dibimano producido separado como una medida de la concentración combinada de azufre lábil en medio ácido y H₂S libre en la muestra (resultado A);
- 20 (d) combinar la porción Z con una solución amortiguadora ácida que tiene un pH inferior a aproximadamente 5,4 y un agente reductor para liberar como H₂S libre tanto el sulfuro lábil en medio ácido como el azufre sulfano; combinar la porción Z con una solución amortiguadora alcalina, un agente quelante para quelar cualquier metal en trazas que pudiera estar presente en la muestra, y monobromobimano, e incubar en condiciones con poco oxígeno; de manera que el H₂S libre reaccione con el monobromobimano para formar el producto sulfuro de dibimano; separar mediante cromatografía el sulfuro de dibimano producido de otros componentes de la mezcla resultante; y determinar por fluorimetría la cantidad de sulfuro de dibimano producido separado como una medida de la concentración combinada de azufre sulfano, sulfuro lábil en medio ácido y H₂S libre en la muestra (resultado C); y
- 25 (e) determinar la concentración de H₂S libre en la muestra como equivalente al resultado B; determinar la concentración de sulfuro lábil en medio ácido en la muestra como equivalente a la diferencia entre el resultado A y el resultado B; y determinar la cantidad de azufre sulfano como equivalente a la diferencia entre el resultado C y el resultado A.
- 35 2. El método de la reivindicación 1, donde el agente reductor es hidrocloreto de *tris*(2-carboxietil)fosfina.
3. El método de la reivindicación 1, donde la solución amortiguadora alcalina en las etapas (b)-(d) tiene un pH de entre aproximadamente 8,0 y 10,0.
4. El método de la reivindicación 1, donde la solución amortiguadora alcalina en las etapas (b)-(d) tiene un pH de aproximadamente 9,5.
- 40 5. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de oxígeno en las etapas (b)-(d) es inferior a aproximadamente un 5%.
6. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de oxígeno en las etapas (b)-(d) es inferior o igual a aproximadamente un 1 %.
- 45 7. El método de la reivindicación 1, donde el agente quelante en las etapas (b)-(d) es ácido dietilentriaminopentaacético.
8. El método de la reivindicación 1, donde el sulfuro de dibimano en las etapas (b)-(d) se estabiliza añadiendo ácido sulfosalicílico.
9. El método de la reivindicación 1, donde la solución amortiguadora ácida en las etapas (c)-(d) tiene un pH inferior a aproximadamente 4,0.
- 50 10. El método de la reivindicación 1, donde la solución amortiguadora ácida en las etapas (c)-(d) tiene un pH de entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 3,0.
11. El método de la reivindicación 1, donde la solución amortiguadora ácida en las etapas (c)-(d) tiene un pH de aproximadamente 2,6.

12. El método de la reivindicación 1, donde la relación molar de agente reductor a monobromodimano en la etapa (d) es aproximadamente 1:10.
13. El método de la reivindicación 1, donde el tiempo de incubación en cada una de las etapas (b)-(d) es aproximadamente 30 minutos.
- 5 14. El método de la reivindicación 1, donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en plasma, sangre, tejido, líquido cefalorraquídeo, orina, otros fluidos corporales, células y agua medioambiental.
15. El método de la reivindicación 1, donde la muestra es plasma.

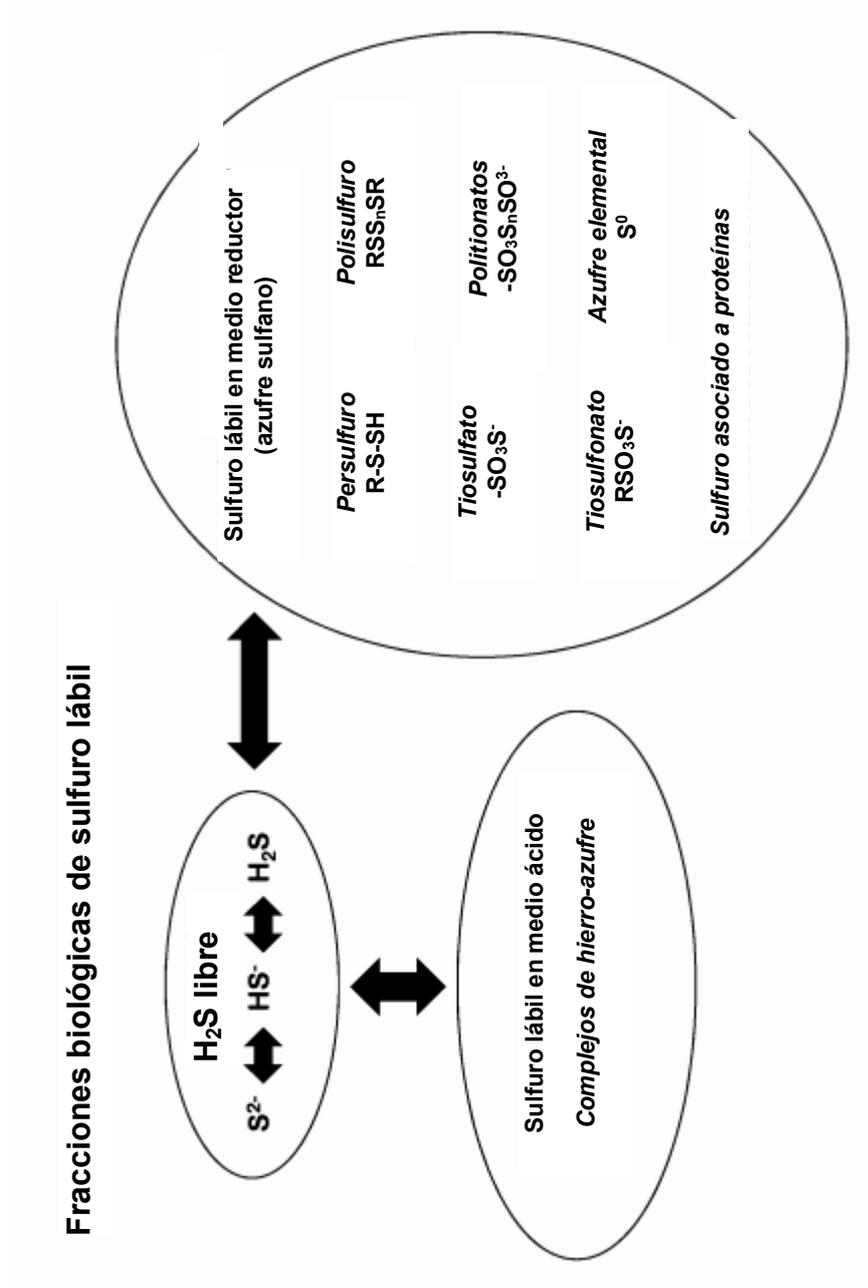


Fig. 1

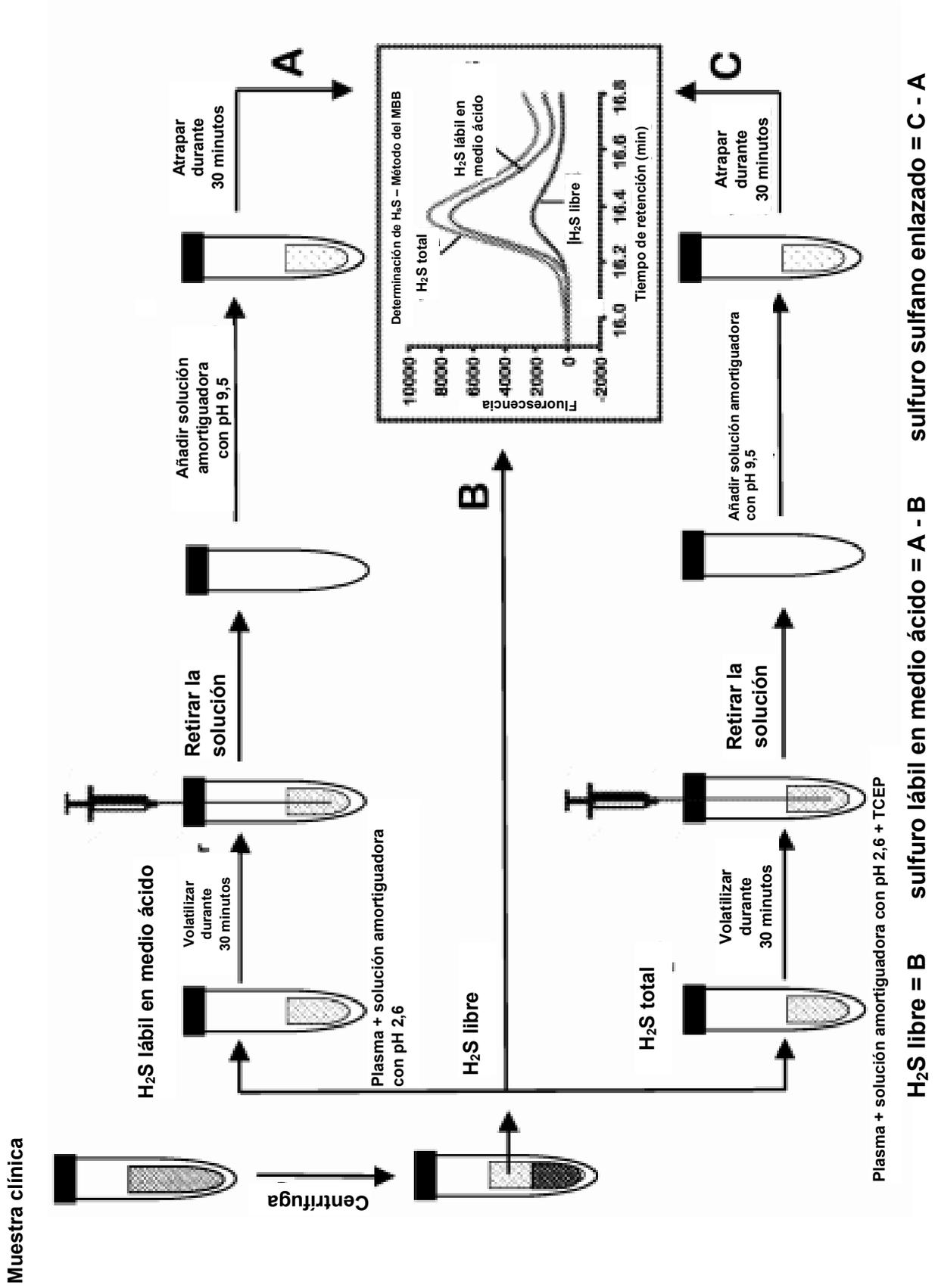


Fig. 2

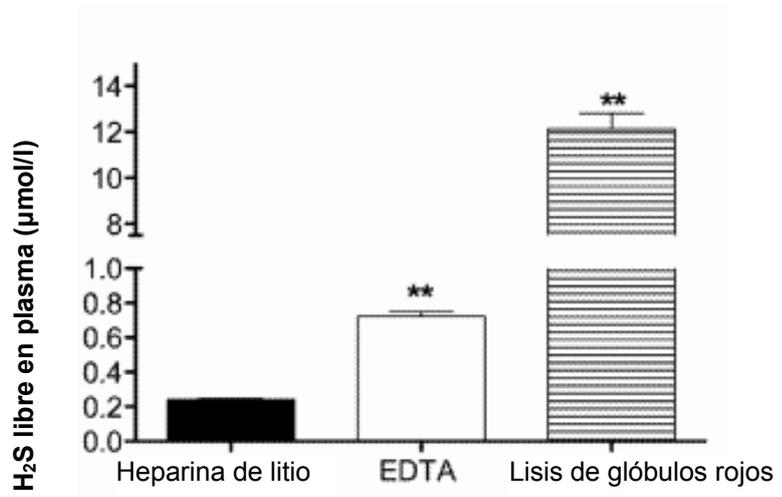


Fig. 3A

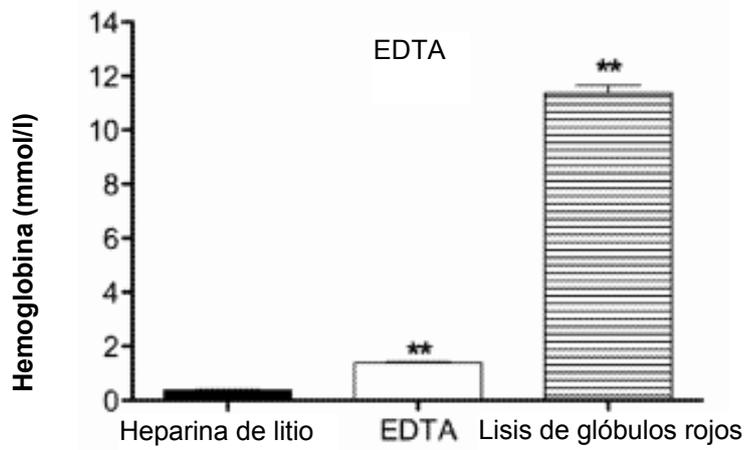


Fig. 3B

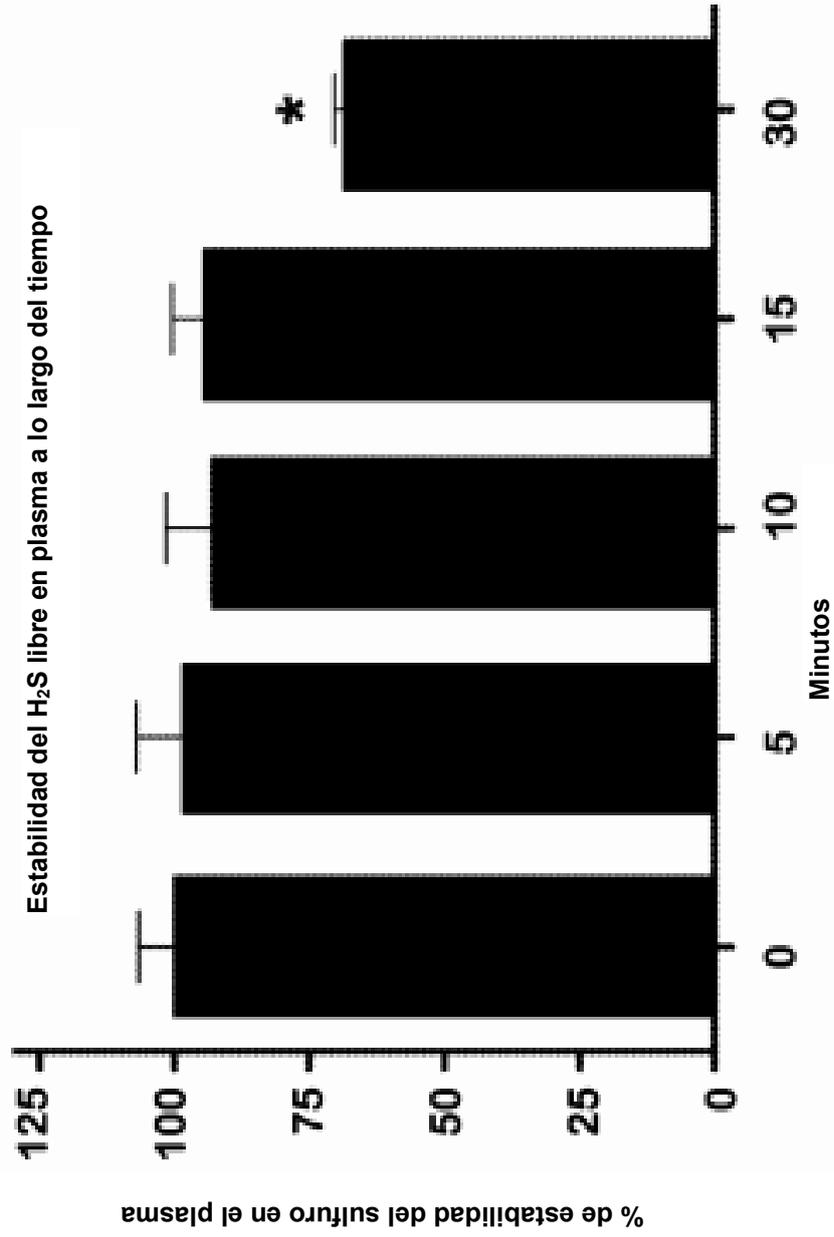


Fig. 4

Fig. 5A

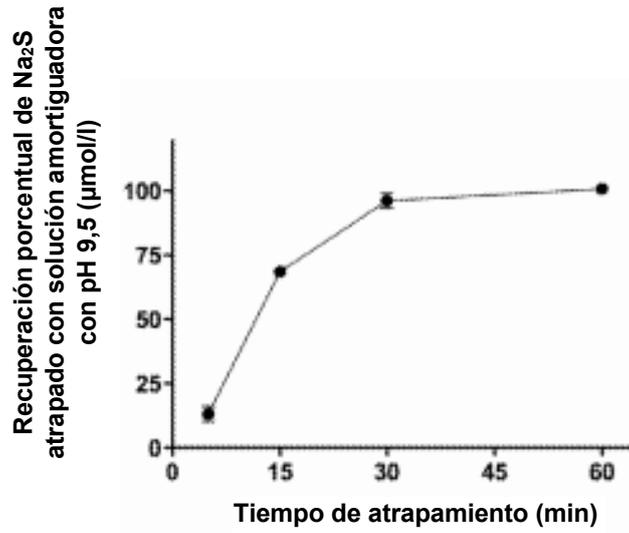


Fig. 5B

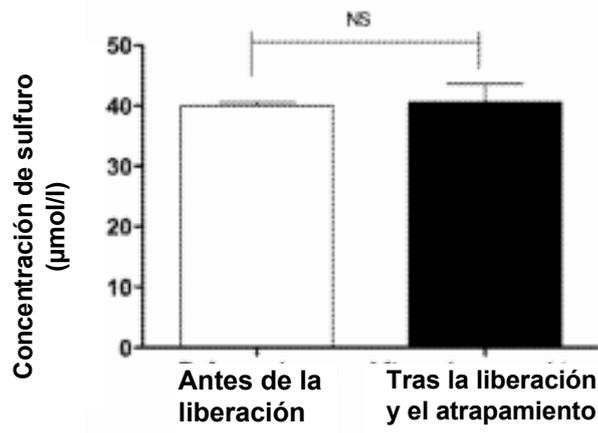


Fig. 5C

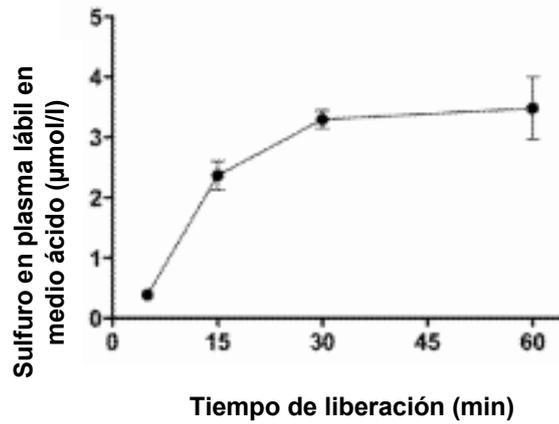


Fig. 6A

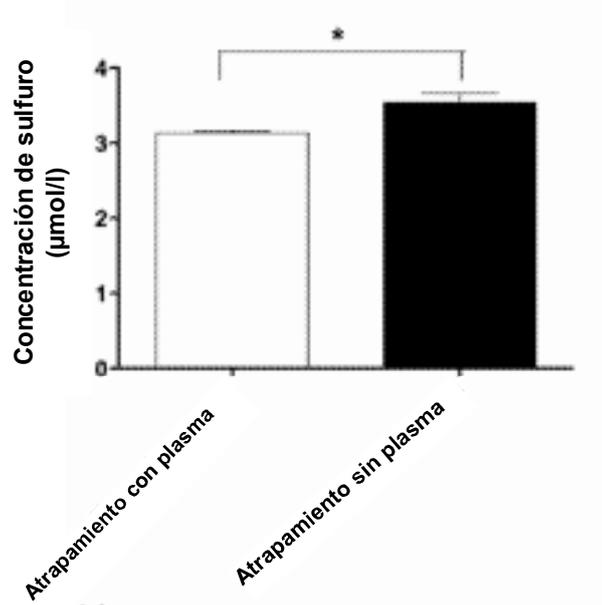


Fig. 6B

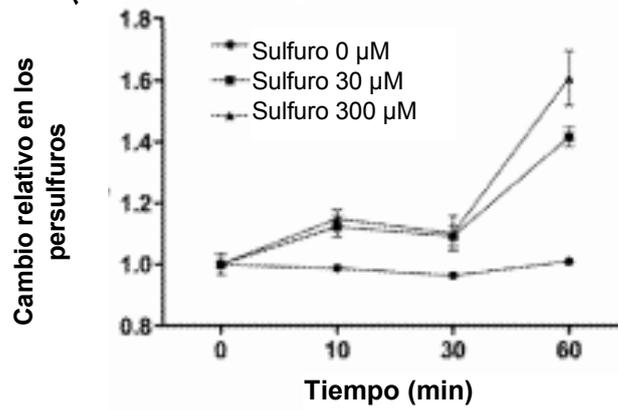


Fig. 6C

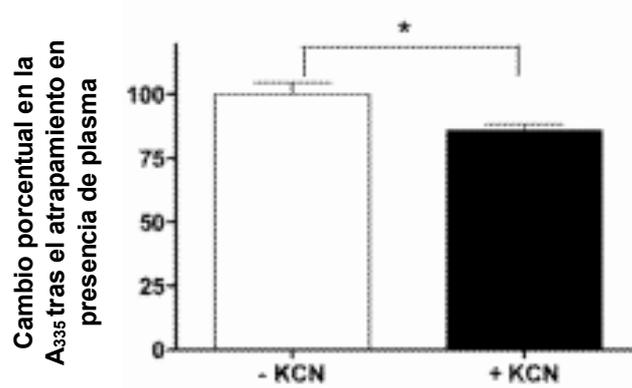


Fig. 7A

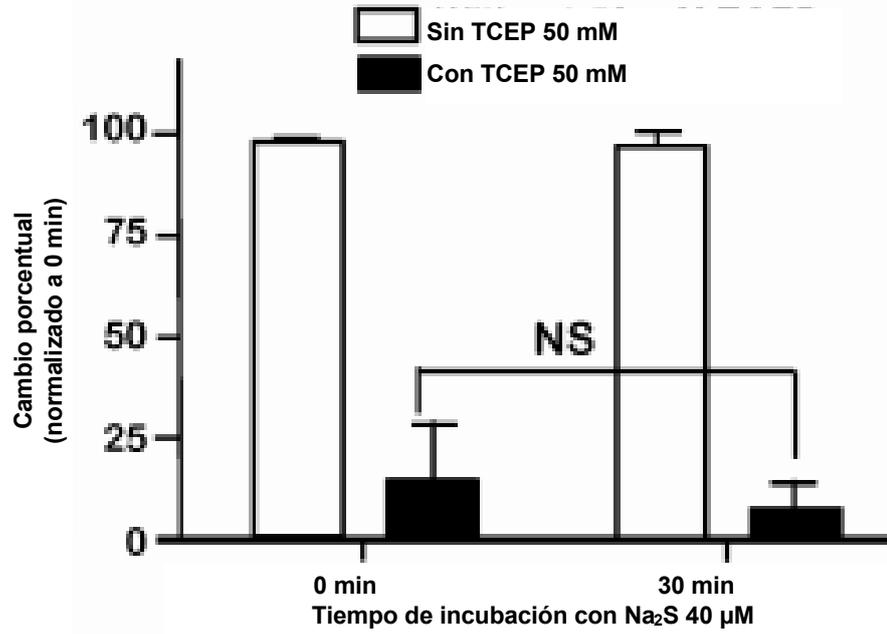


Fig. 7B

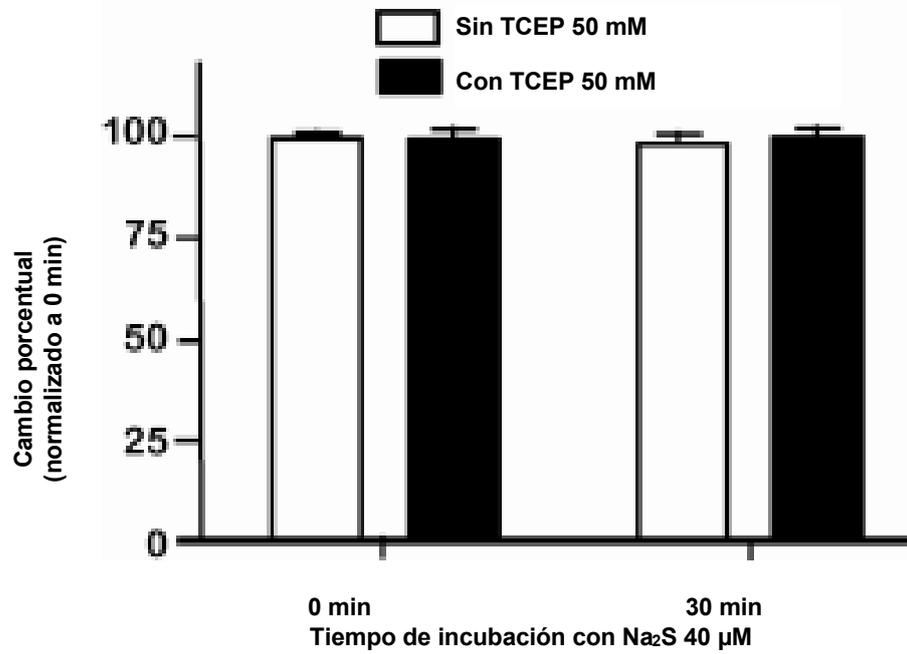


Fig. 7C

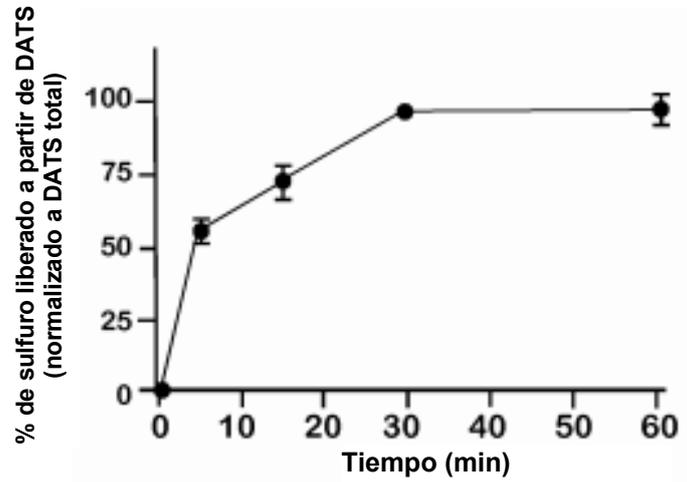
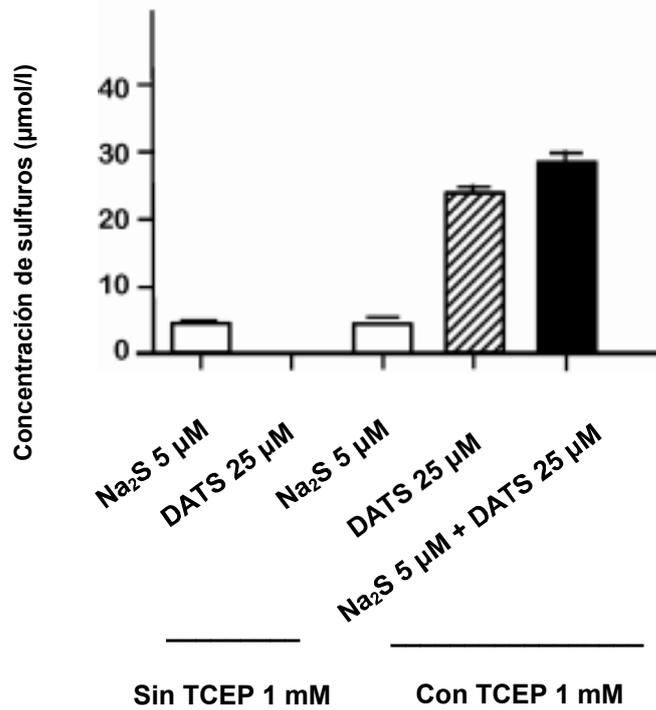


Fig. 7D



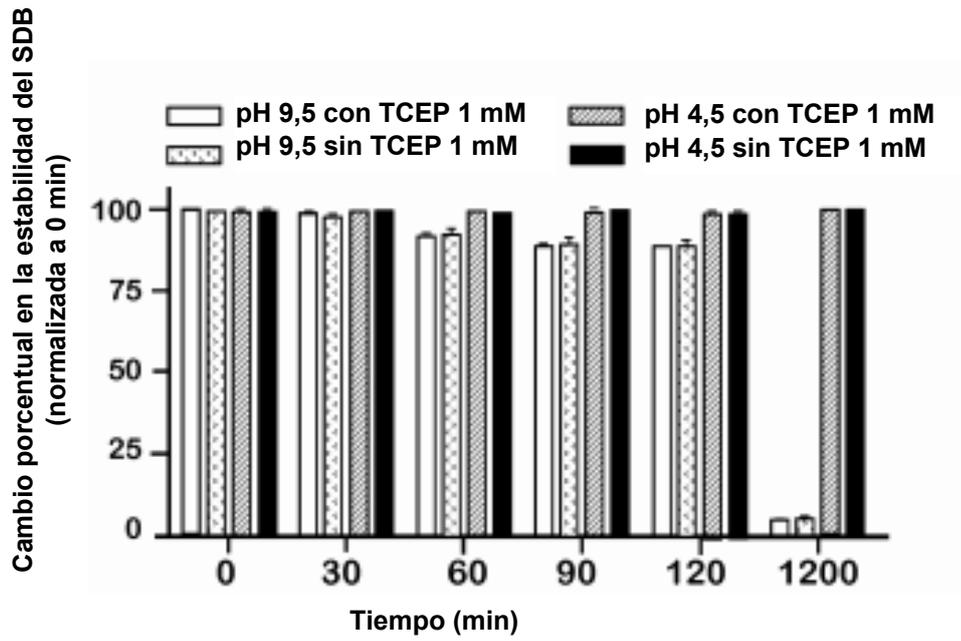


Fig. 7E

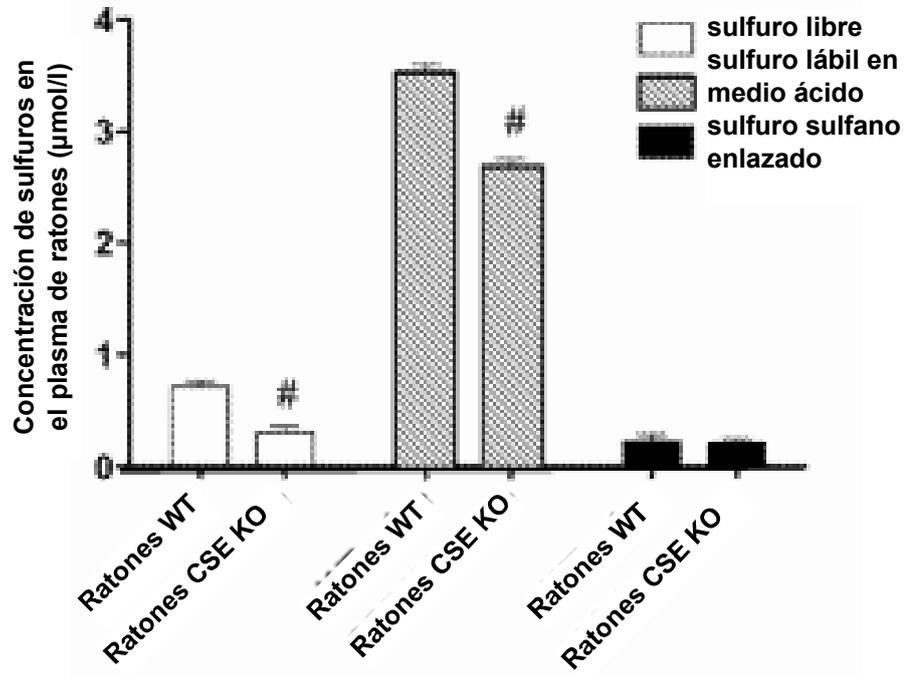


Fig. 8A

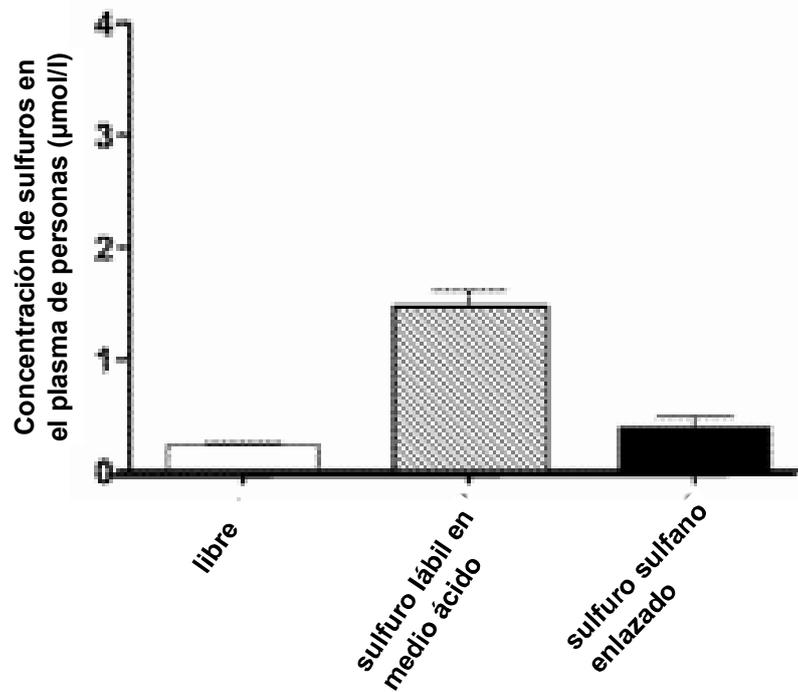


Fig. 8B