

Desarrollo de una sonda fluorescente roja (Red-B) para la detección intracelular de peroxinitrito

Pereyra, Josefina^{1,2}; Prolo, Carolina^{1,2}; Radi, Rafael^{1,2}; Alvarez, Maria Noel^{2,3}; Rios, Natalia^{1,2}.

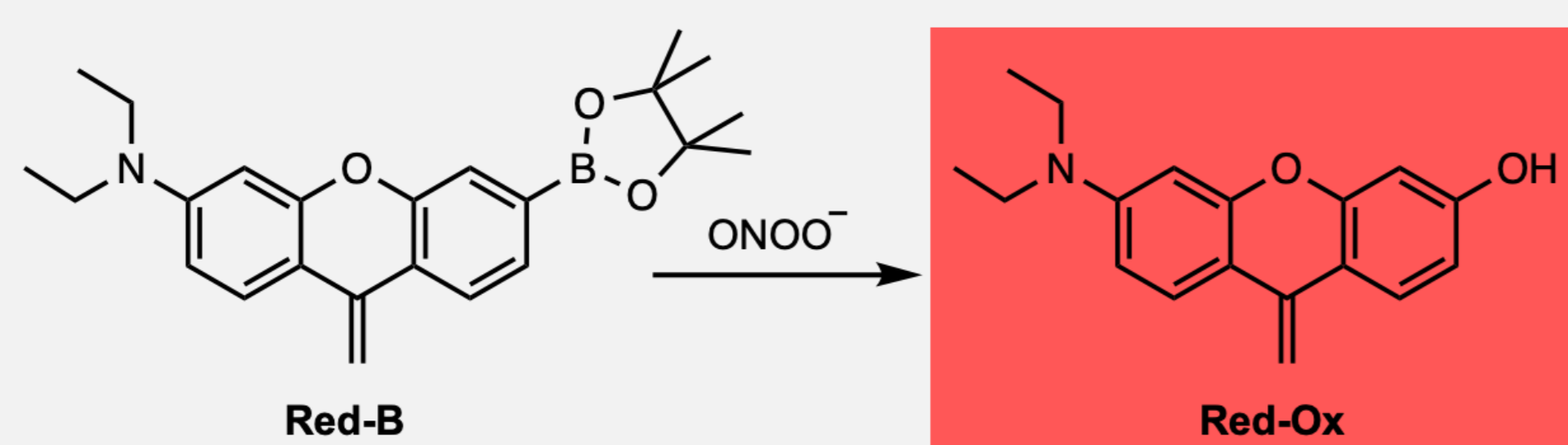
¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Centro de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

³Unidad Académica de Educación Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

INTRODUCCIÓN

En la última década se desarrollaron sondas fluorescentes derivadas de ésteres o ácidos borónicos para la detección de peroxinitrito en sistemas biológicos. Esto resultó en un importante avance en el área debido a su capacidad para reaccionar en forma cinéticamente selectiva con esta especie. Los fluoróforos utilizados hasta el momento (fluoresceína y cumarina) son sensibles a cambios de pH y de presión parcial de O₂ (pO₂) lo que puede afectar las determinaciones en algunos modelos experimentales. En este trabajo se describe la síntesis y caracterización de una nueva sonda, Red-B, diseñada a partir de un derivado de xanteno acoplado un éster borónico. Esta sonda, al reaccionar con peroxinitrito rinde el correspondiente producto hidroxilado, fluorescente, Red-Ox. El estudio de la distribución intracelular de Red-B, así como la eficiencia de Red-Ox en sistemas celulares expuestos a distintas presiones parciales de O₂, nos permitirá completar la validación de la sonda para su futura aplicación.

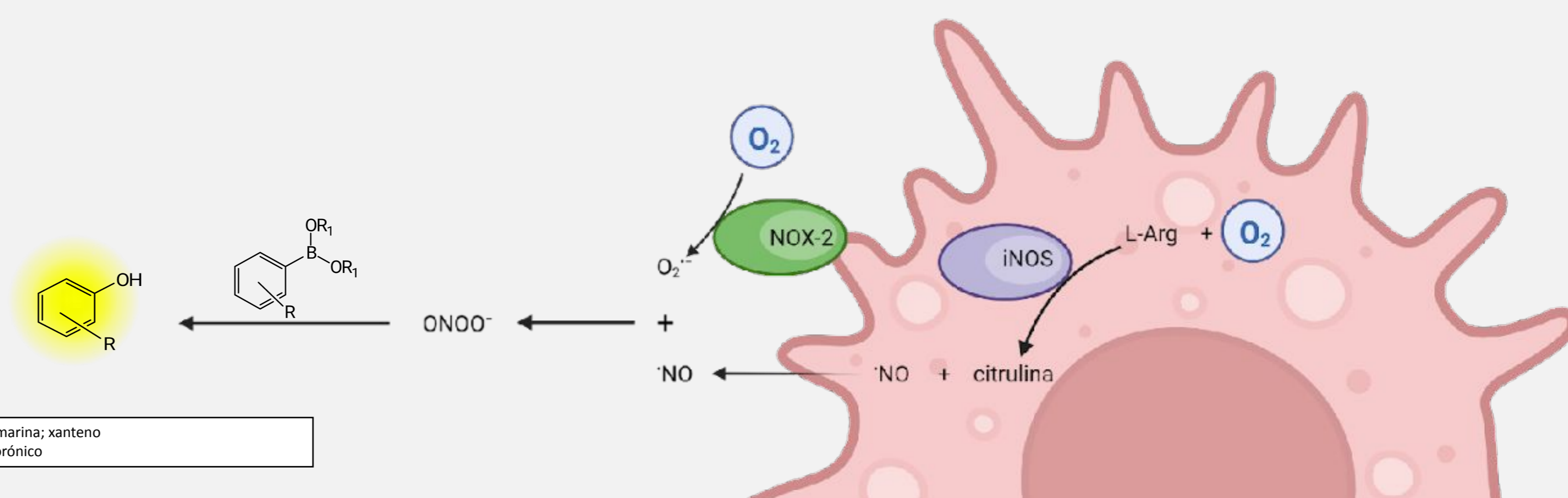


Objetivo general:

Diseñar, sintetizar y caracterizar una sonda fluorescente para la detección de peroxinitrito en células expuestas a distintas presiones parciales de O₂.

Objetivos específicos:

- Sintetizar una sonda derivada de xanteno acoplado un éster borónico (Red-B) para la detección de peroxinitrito en las distintas condiciones experimentales *in cellula*.
- Caracterizar las propiedades espectroscópicas de su forma oxidada (Red Ox) frente a cambios de pH y pO₂.



RESULTADOS

Diseño y síntesis de Red-B

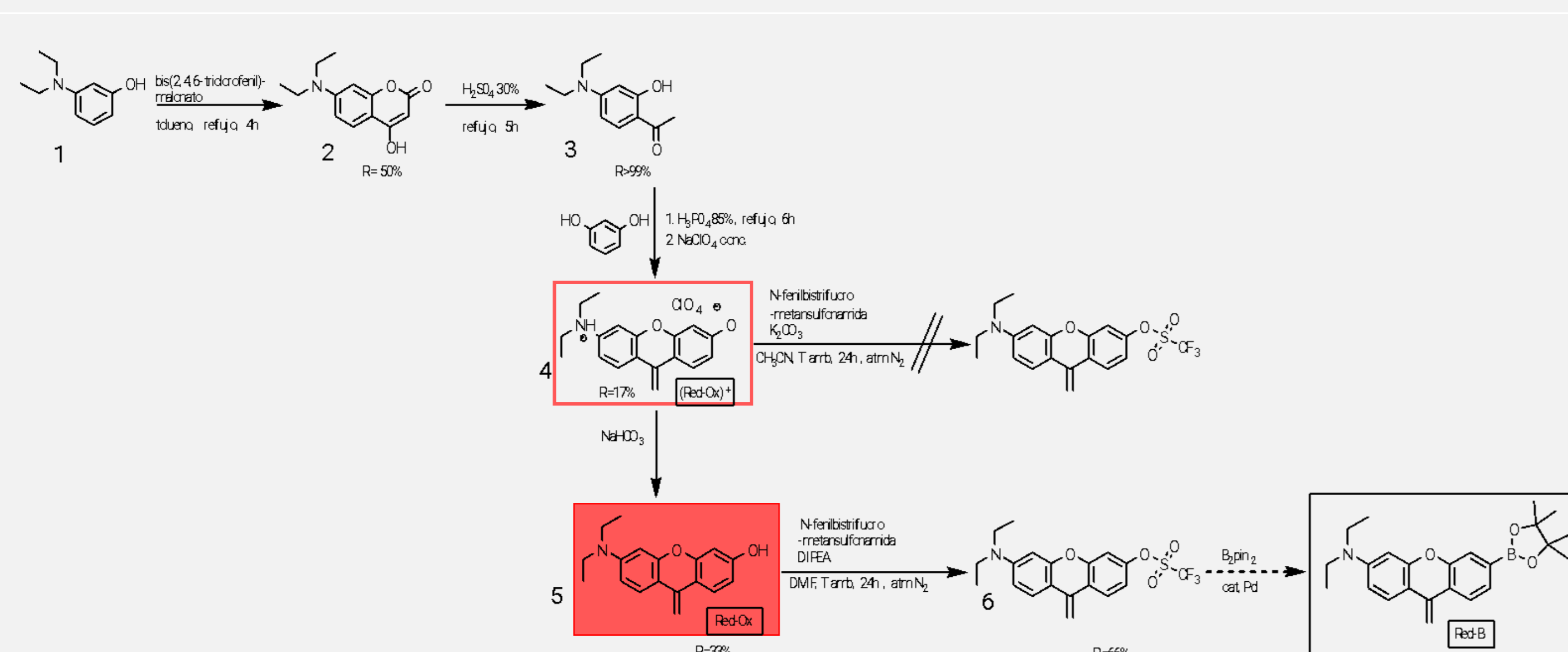


Figura 1. Ruta sintética para la obtención de Red-B. (Red-Ox)⁺ se obtuvo en 3 pasos de reacción. Posteriormente se obtuvo Red-Ox mediante precipitación con NaHCO₃. Red-B será sintetizado a partir del Compuesto 6 por borilación con B₂pin₂ catalizada por paladio.

Caracterización espectroscópica de Red-Ox

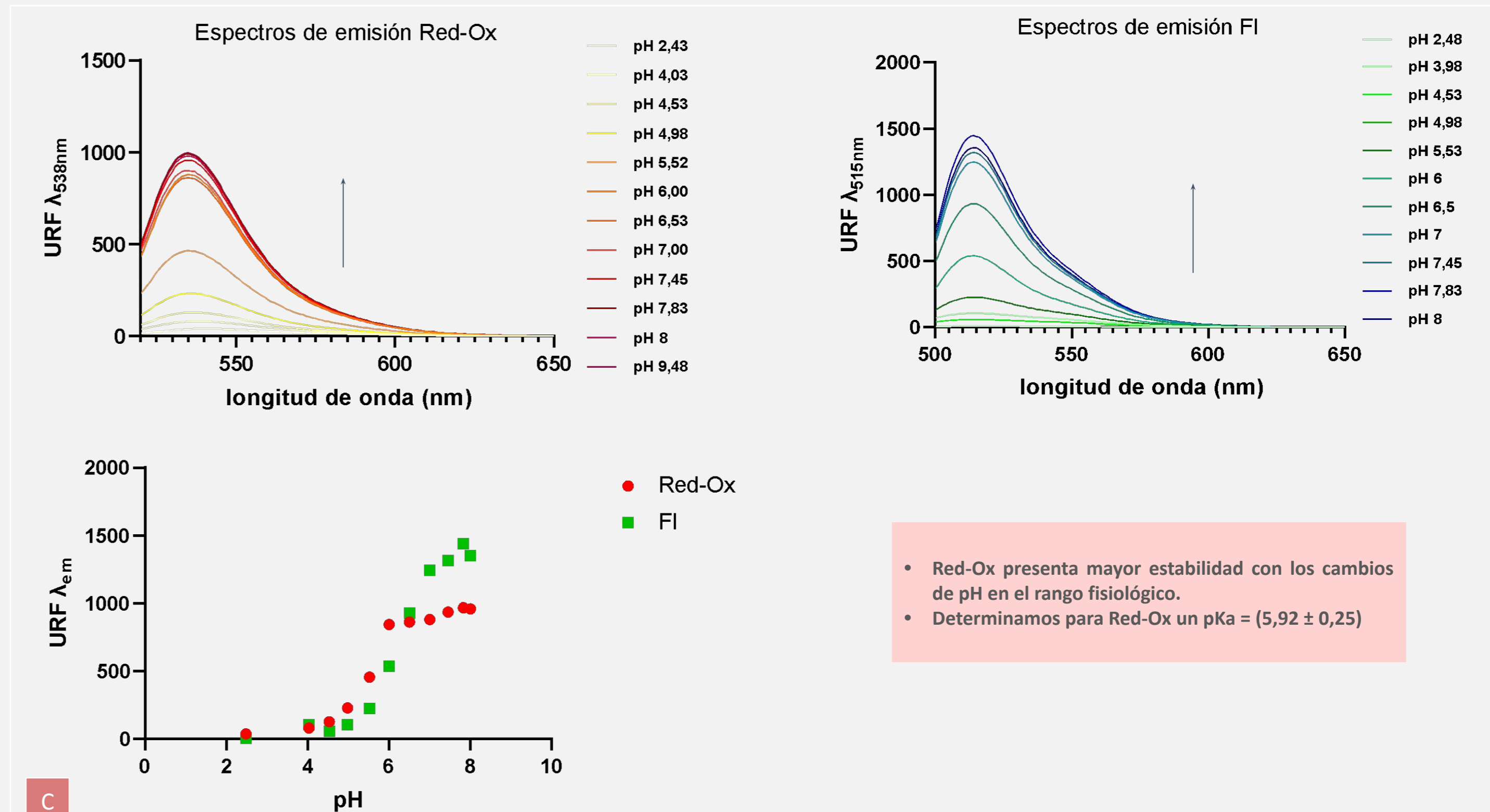
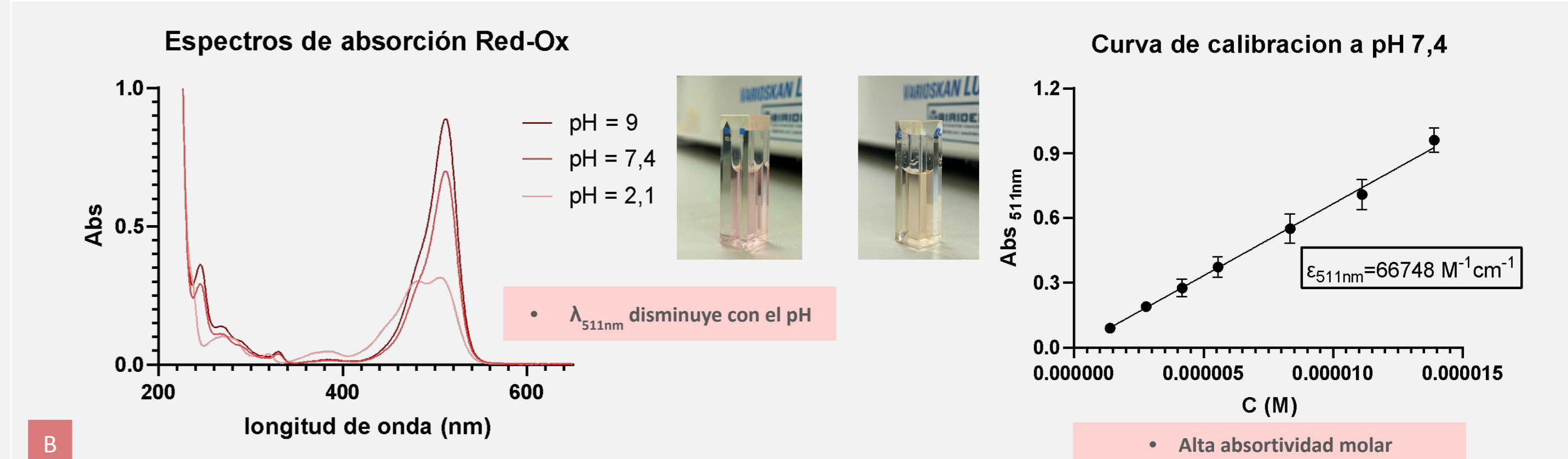
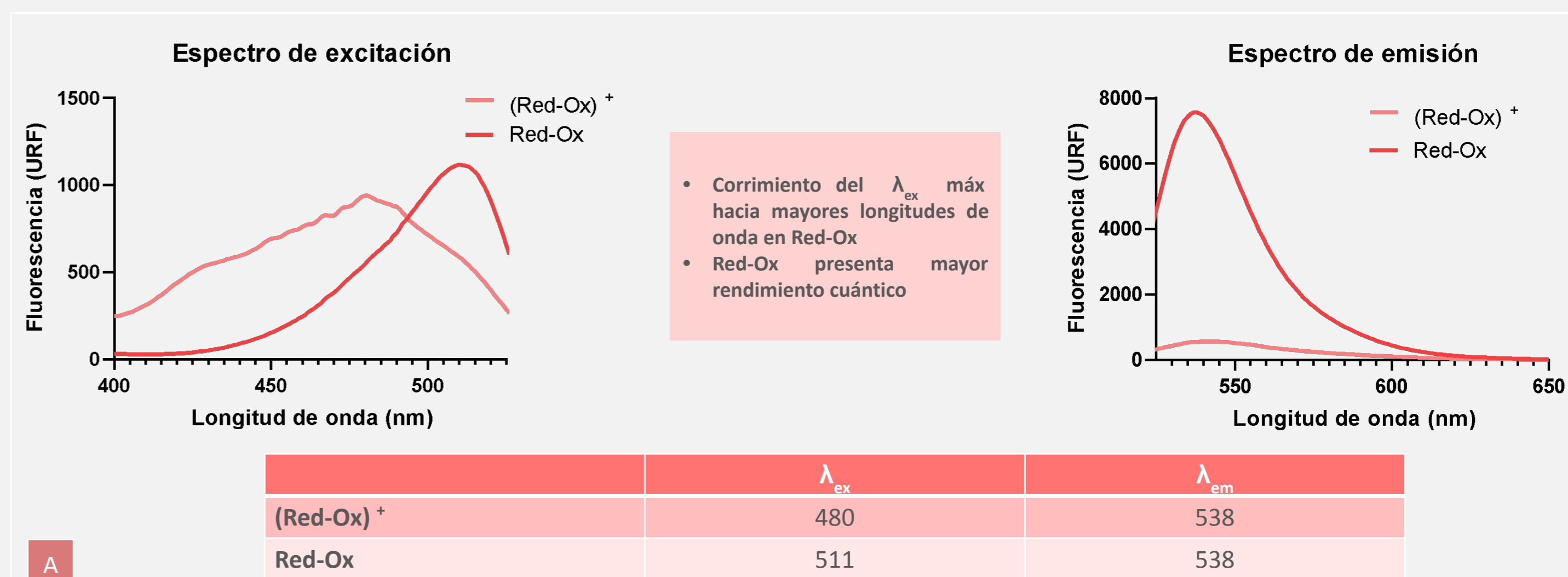


Figura 3. Caracterización espectroscópica y dependencia de Red-Ox con el pH. a) Espectros de fluorescencia de excitación y emisión de Red-Ox (10 μM) en su forma protonada y desprotonada a pH 2,1 y 7,4 respectivamente. b) Espectros de absorción de Red-Ox (10 μM) en su forma protonada y desprotonada a pH 2,1, 7,4 y 9 respectivamente. c) Dependencia de la fluorescencia con el pH para los fluoróforos Red-Ox y fluoresceína (FI).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- El fluoróforo Red-Ox fue sintetizado con éxito en tres pasos de reacción.
- Red-Ox fue caracterizado por espectroscopia, mostrando propiedades óptimas ($\lambda_{exc} = 511\text{nm}$; $\lambda_{em} = 538\text{nm}$, $\epsilon_{511\text{nm}} = 66.748\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).
- Se determinó para Red-Ox un pKa = (5,92 ± 0,25), considerando entonces una baja dependencia con el pH en el rango fisiológico.
- Se está trabajando en la optimización la última etapa de síntesis para obtener Red-B.
- Futuros estudios permitirán validar la sonda como una herramienta para evaluar la formación de peroxinitrito en modelos celulares a través de métodos espectroscópicos y de microscopía.



Referencias

- Prolo, C., Rios, N., et al. (2018). Fluorescence and chemiluminescence approaches for peroxynitrite detection. *FRBM*, 128, 59–68.
- Rios, N., et al. Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxynitrite fluxes using fluorescein-boronate. *IOI*, 284–295.
- Poronik, Y. et al. (2007). Substituted xanthocyanines. III. Dyes containing non-symmetrically substituted xanthylum core. *Dyes and Pigments*, 72(2), 199–207.
- Chevalier, A. et al. (2014). Straightforward Access to Water-Soluble Unsymmetrical Sulfoxanthene Dyes: Application to the Preparation of Far-Red Fluorescent Dyes with Large Stokes' Shifts. *Chem. A Europ. Journal*, 20(27), 8330–8337.
- Dickinson, B. et al. (2010). A Palette of Fluorescent Probes with Varying Emission Colors for Imaging Hydrogen Peroxide Signaling in Living Cells. *JACS*, 132, 5906–5915.