

Desarrollo de Red-B, una nueva sonda de peroxinitrito para el estudio de las respuestas oxidativas dependientes del oxígeno

Josefina Pereyra^{1,2}; **Carolina Prolo**^{1,2}; **Rafael Radi**^{1,2}; **Natalia Rios**^{1,2}

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

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

INTRODUCCIÓN

En la última década ha habido un gran aumento en el desarrollo de sondas fluorescentes para la detección selectiva de oxidantes presentes en sistemas biológicos. El peroxinitrito (ONOO^-), producto de la reacción entre óxido nítrico (NO^\cdot) y superóxido (O_2^\cdot), es un agente nitrante y altamente oxidante capaz de generar daño a nivel molecular. La detección de peroxinitrito se ha conseguido con el desarrollo de sondas derivadas de ésteres y ácidos borónicos las cuales son cinéticamente selectivas para esta especie. Si bien las sondas derivadas de boronatos son ampliamente utilizadas, están limitadas por sus propiedades espectroscópicas, y su labilidad frente a cambios en el pH y cambios en la presión parcial de oxígeno. Por lo tanto, en este trabajo planteamos el desarrollo de un grupo nuevo sondas denominado Red-B (Red-Bl y sus análogos estructurales Red-BII y Red-BIII) para la detección de peroxinitrito que tienen en cuenta estos cambios a nivel del microambiente celular, permitiendo complementar y ampliar el uso de las sondas ya existentes.

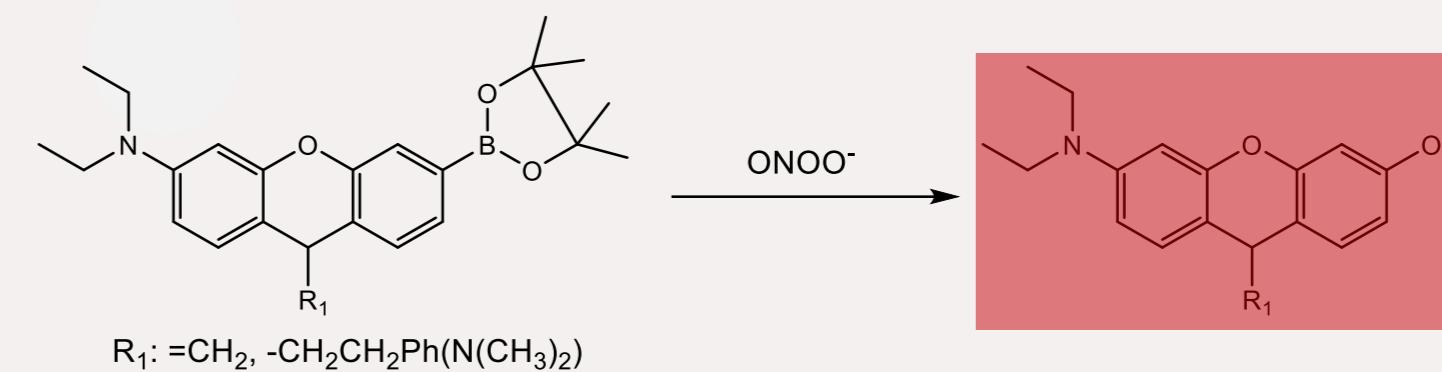
OBJETIVOS

Objetivo general:

Diseñar, sintetizar y caracterizar un nuevo grupo de sondas fluorescentes para la detección de peroxinitrito en células expuestas a distintas presiones parciales de O_2 .

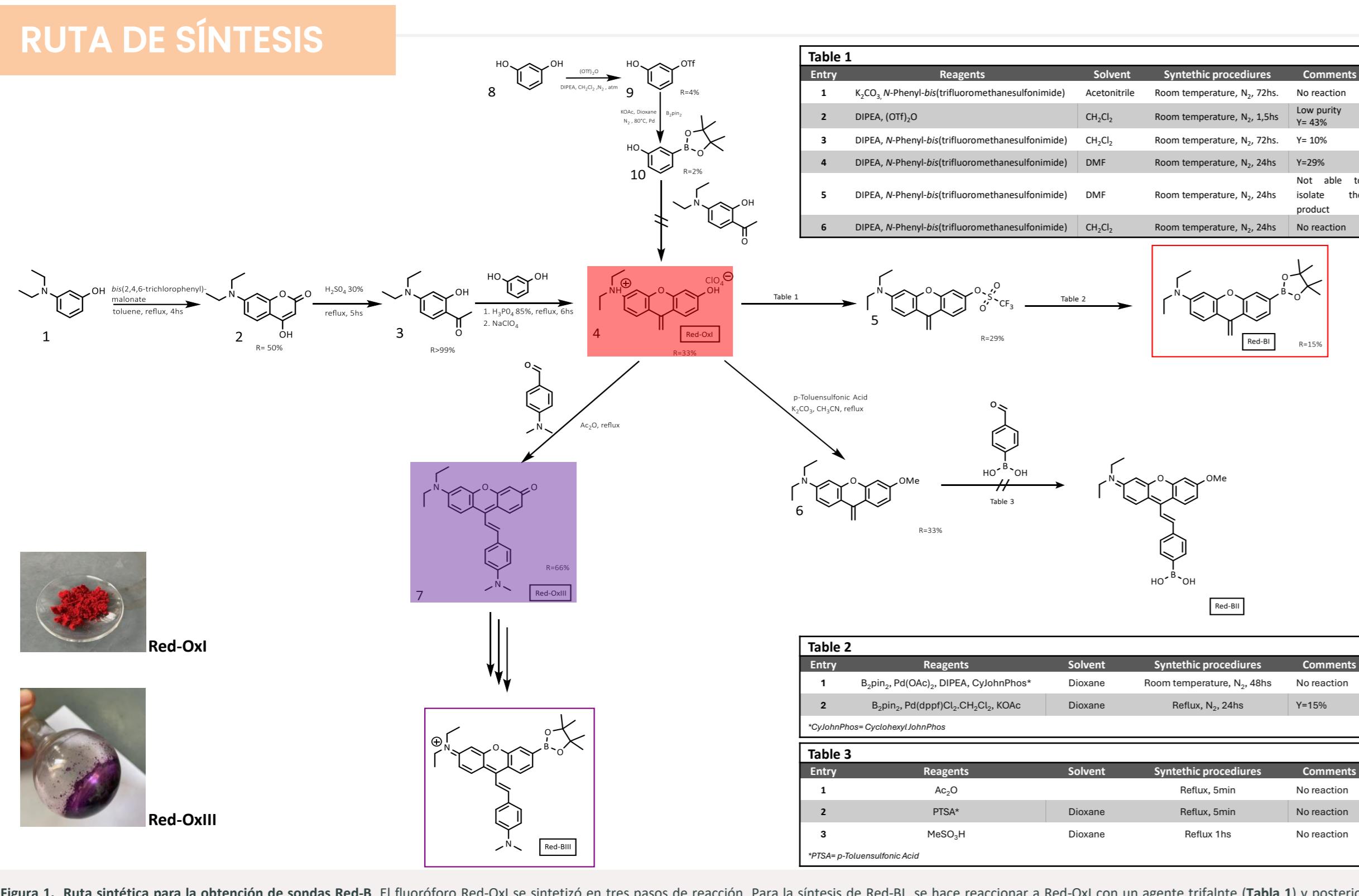
Objetivos específicos:

- Sintetizar 3 sondas derivadas de xanteno acoplando un éster o ácido borónico (Red-Bl, Red-BII y Red-BIII) para la detección de peroxinitrito en las distintas condiciones experimentales *in cellula*.
- Caracterizar las propiedades espectroscópicas de sus formas oxidadas (Red-Oxi y Red-OxIII) frente a cambios de pH y pO_2 .

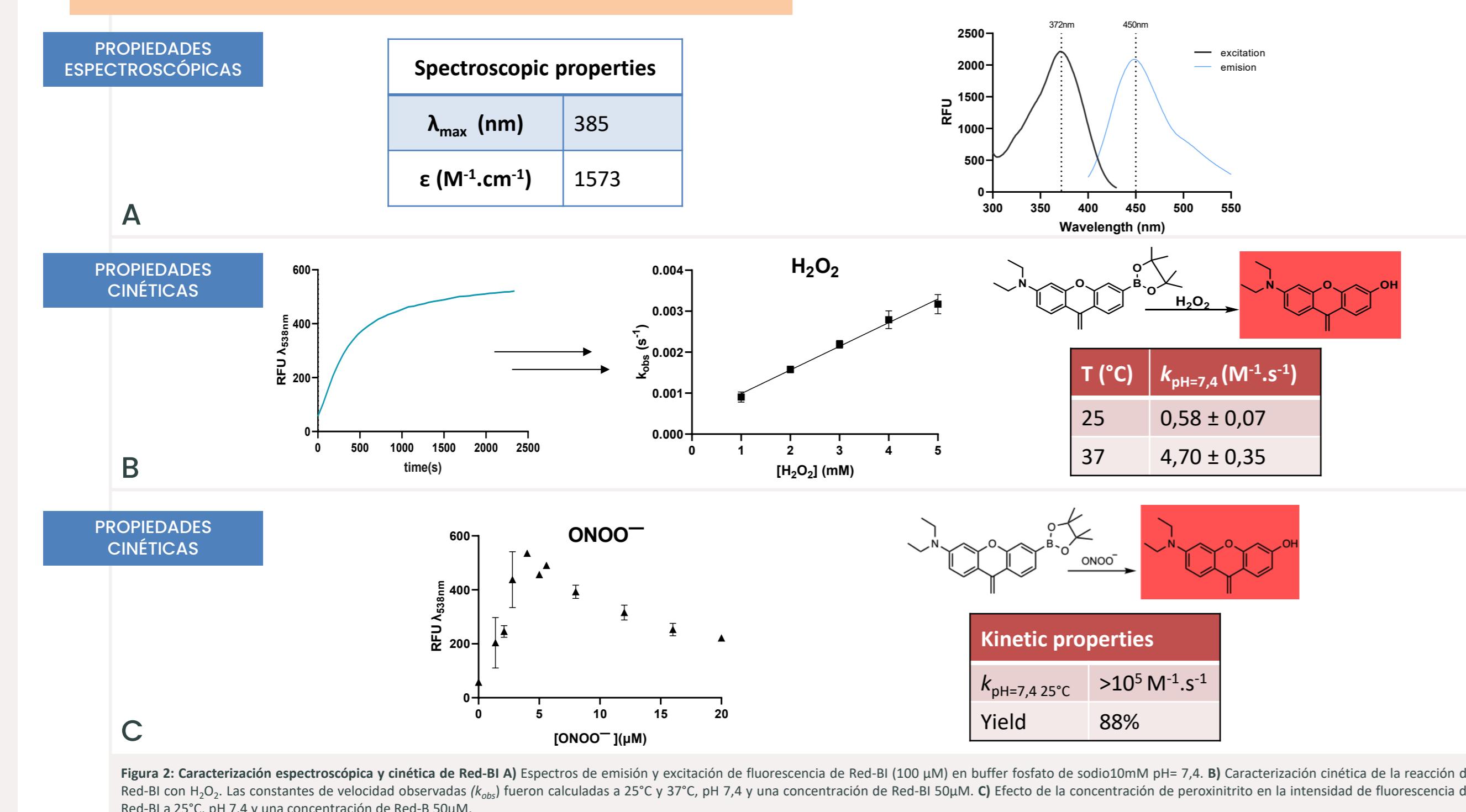


RESULTADOS

RUTA DE SÍNTESIS



CARACTERIZACIÓN DE LA SONDA Red-BI



CONCLUSIONES

- La sonda Red-BI fue sintetizada con éxito en 5 pasos de reacción con buen rendimiento.
- Red-Oxi fue caracterizado mostrando buenas propiedades espectroscópicas ($\lambda_{\text{exc}} = 51\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 538\text{nm}$, $\tau_F = (\tau_F = 0,29\text{ns} (44,25\%); \tau_F = 4,19\text{ns} (38,13\%), \tau_F = 1,3\text{ns} (17,63\%)$, $\Phi_F = 0,092$, $\epsilon = 67000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).
- Red-OxIII también fue caracterizado espectroscópicamente mostrando mayores longitudes de onda y menor rendimiento cuántico y absorbividad molar ($\lambda_{\text{exc}} = 530\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 565\text{nm}$, $\Phi_F = 0,045$, $\epsilon_M = 7133 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).
- Se determinó para Red-Oxi y Red-OxIII un $\text{pKa} = (5,68 \pm 0,59)$ y $(4,88 \pm 0,24)$ respectivamente, mostrando buena estabilidad en el entorno de pH fisiológico.
- Ambos fluoróforos Red-Oxi y Red-OxIII no muestran efecto quenching por el oxígeno de forma significativa a concentraciones estudiadas.
- La reacción de Red-BI con H_2O_2 es de 2º orden y se determinaron las constantes cinéticas a pH=7.4 $k_{25^\circ\text{C}} = (0,58 \pm 0,07)$, $k_{37^\circ\text{C}} = (4,70 \pm 0,35)$.
- La sonda Red-BI muestra reactividad con ONOO^- de forma dosis-dependiente, con un rendimiento alrededor del 88% y una constante de reacción estimada mayor a $10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.
- Futuros estudios permitirán validar la sonda como una herramienta para evaluar la formación de peroxinitrito en modelos celulares adaptados a un amplio rango de pO_2 a través de métodos espectroscópicos y de microscopía.

BIBLIOGRAFÍA

- Polo, C., Rios, N., et al. (2018). Fluorescence and chemiluminescence approaches for peroxinitrite detection. *FRBM*, 128, 59–68.
- Rios, N., et al. Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxinitrite fluxes using fluorescein-boronate, *IOI*, 284–295.
- Poronik, Y., et al. (2007). Substituted xanthylcyanines. III. Dyes containing non-symmetrically substituted xanthyl core. *Dyes and Pigments*, 72(2), 199–207.
- Chevallier, 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.

AGRADECIMIENTOS

