O-6

DESARROLLO DE UNA SONDA FLUORESCENTE ROJA (RED-B) PARA LA DETECCIÓN INTRACELULAR DE PEROXINITRITO

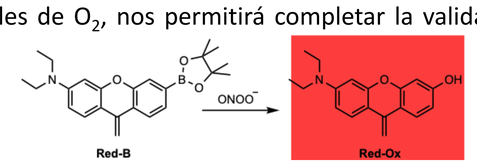
Josefina Pereyra [1,2] ; Carolina Prolo[1,2]; Rafael Radi[1,2]; María Noel Alvarez [2,3];Natalia Rios[1,2]

[1]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. [2]Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. [3]Unidad Académica de Educación Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

josefinapereyra@fmed.edu.uy

INTRODUCCIÓN

En la última década se han desarrollado 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 de biología redox debido a su capacidad para reaccionar en forma cinéticamente selectiva con esta especie. Los fluoróforos más utilizados hasta el momento presentan diferente grado de sensibilidad a cambios de pH, de presión parcial de O_2, y pueden sufrir autoxidación lo que puede afectar las determinaciones en algunos modelos experimentales. En el contexto del estudio de la formación de especies oxidantes en modelos celulares que contemplen cambios en el microambiente celular, es importante contar con sondas que sean estables frente a dichas variables fisicoquímicas. En este trabajo se describe la síntesis y caracterización de una nueva sonda, Red-B, diseñada a partir de un derivado de xanteno acoplando 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 O_2, nos permitirá completar la validación de la sonda para su futura aplicación.



OBJETIVOS

Objetivo general:

Diseñar, sintetizar y caracterizar una sonda fluorescente para la detección de peroxinitrito en células expuestas a distintas presiones parciales de O_2 .

Objetivos específicos:

- Sintetizar una sonda derivada de xanteno acoplando 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 pO_2
- Caracterización cinética de la reacción de Red-B frente a distintos oxidantes : H_2O_2 y $ONOO^-$
- Evaluar la citotoxicidad y la capacidad de Red-B para la detención de $ONOO^-$ en sistemas biológicos

RESULTADOS

Ruta de síntesis de Red-B

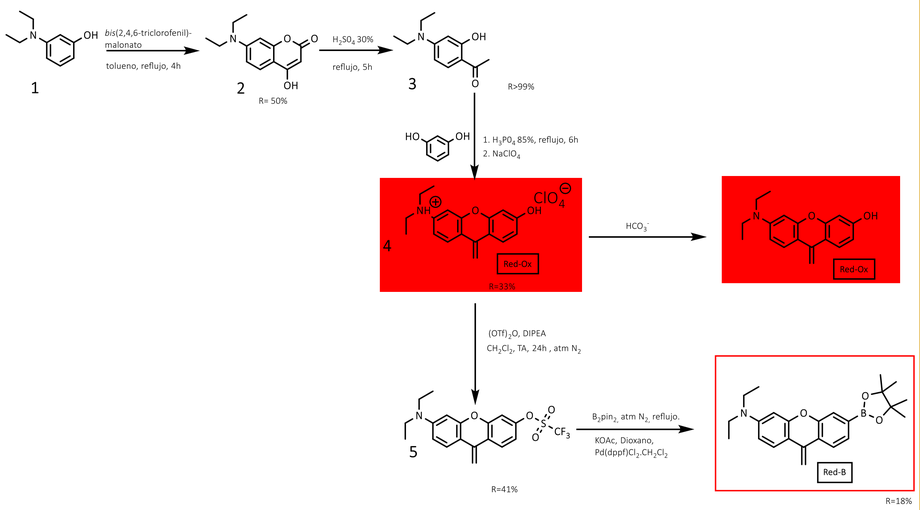


Figura 1. Ruta sintética para la obtención de Red-B. El fluoróforo Red-Ox se obtuvo en 3 pasos de reacción en forma de sal (4) con buen rendimiento. Se logró precipitar como amina libre (Red-Ox) a partir de la alcalinización con $NaHCO_3$. Posteriormente se hace reaccionar a RedOx con $(OTf)_2O$ para obtener el correspondiente derivado trifluorometanosulfonato (5) (R=40%). A dicho compuesto se lo trató con bis(pinacolato)diboro en presencia de catalizador de Pd para generar el correspondiente éster borónico (Red-B). Todos los productos fueron caracterizados por espectroscopía ^{1}H-RMN ,C^{13}-RMN y MS/MS.

Caracterización de Red-Ox

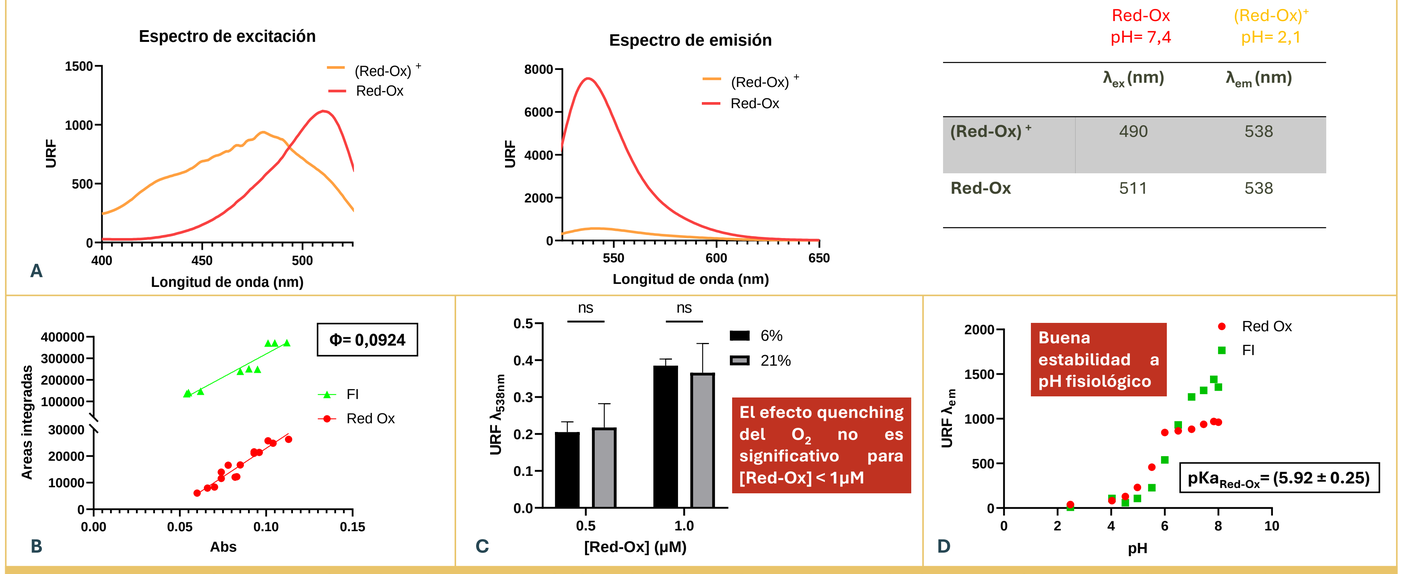


Figura 2. Caracterización espectroscópica de Red-Ox y evaluación de su dependencia frente a la variación el pH y pO_2. a) Espectros de fluorescencia de excitación y emisión de Red-Ox (10μM) en su forma protonada y desprotonada a pH 2,1 y 7,4 respectivamente. b) Cálculo del rendimiento cuántico (Φ) teniendo como referencia a fluoresceína (FI) a pH 12,5. c) Evaluación del efecto quenching de fluorescencia del O_2 exponiendo a RedOx (0,5 y 1μM) a diferentes pO_2 (6 y 21%) d) Dependencia de la fluorescencia con el pH para los fluoróforos Red-Ox y fluoresceína (FI).

Caracterización de Red-B

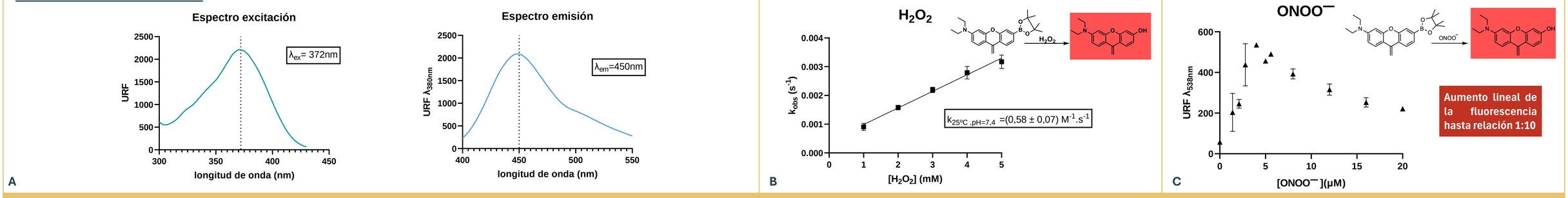


Figura 3. Caracterización espectroscópica y cinética de sonda Red-B. a) Espectros de emisión y excitación de fluorescencia de Red-B. b) Efecto de las concentraciones crecientes de H_2O_2 en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) a 25°C, pH 7,4 y una concentración de Red-B 50μM. c) Efecto de la concentración de peroxinitrito en la intensidad de fluorescencia de Red-B, a 25°C, pH 7,4 y una concentración de Red-B 50μM.

CONCLUSIONES

- La sonda Red-B fue sintetizada con éxito en 5 pasos de reacción con buen rendimiento.
- Red-Ox fue caracterizado por espectroscopia, mostrando propiedades óptimas (λ_{exc}= 511nm; λ_{em}= 538nm , Φ= 0,0924) .
- Se determinó para Red-Ox un pKa = (5,92 ± 0,25), mostrando entonces una baja dependencia con el pH en el rango fisiológico.
- Red-Ox no muestra efecto quenching por el oxígeno de forma significativa a concentraciones menores a 1μM del fluoróforo.
- La reacción de Red-B con H_2O_2 es de 2° orden y con una $k_{25°C,\ pH=7,4}$ =(0,58 ± 0,07).
- La sonda Red-B muestra reactividad con $ONOO^-$ de forma dosis-dependiente hasta una relación 10:1 con el oxidante.
- 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.

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Educación y Cultura | Dirección Nacional de Innovación, Ciencia y Tecnología

ANII AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

PEDECIBA MEC-UDELAR

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., *101*, 284–295.
- Poronik, Y. *et al.* (2007). Substituted xanthylocyanines. III. Dyes containing non-symmetrically substituted xanthylium 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.