

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL AGENTE NEUROPROTECTOR ISQ201 MEDIANTE REACCIÓN DE QUÍMICA CLICK EN UN MODELO CELULAR DE ISQUEMIA CEREBRAL.

Lorena Peracho-Benito; Alejandro Escobar-Peso; Emma Martínez-Alonso; Mercedes Gómez-Calcerrada; Alberto Alcázar

Grupo de Neuroproteínas e ictus, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Hospital U. Ramón y Cajal.
lorenaperacho95@gmail.com

ANTECEDENTES

La isquemia cerebral induce un estrés oxidativo que puede causar un daño irreversible a los componentes celulares. Las nitronas son compuestos con capacidad antioxidante al actuar como trampas de radicales, por ello han sido propuestas como potenciales agentes terapéuticos para el ictus isquémico. Nuestro laboratorio ha desarrollado la molécula ISQ201, una nitrona con demostrada capacidad antioxidante y neuroprotectora en modelos celulares y animales de isquemia cerebral, que actualmente se encuentra en estudios preclínicos para el tratamiento del ictus isquémico.

La química *click* es una metodología sintética caracterizada por reacciones fácilmente modulables, de alto rendimiento y compatibles con sistemas biológicos, entre otras propiedades. Un ejemplo de estas reacciones es la que se produce entre una nitrona (dipolo) y un alquino (dipolarófilo), dando lugar a un producto de cicloadición.

En este trabajo, hemos utilizado un alquino con marcaje fluorescente que permitiría la detección de la nitrona ISQ201 a través de la observación del correspondiente producto de cicloadición. Esto convierte a este tipo de reacciones de química *click* en una herramienta adecuada para un potencial estudio de la actividad biológica de ISQ201.

OBJETIVOS

Determinación de la actividad biológica de la nitrona ISQ201 en un modelo de isquemia cerebral mediante la detección de ISQ201 por medio de su producto de reacción con química *click*.

La reacción de química *click* se realizará entre ISQ201 y un alquino tensionado fluorescente (DBCO-Cy3) para la visualización por microscopía de fluorescencia del producto ISQ201-DBCO-Cy3. Las condiciones de la reacción de química *click* se determinarán y analizarán por espectrometría de masas MALDI-TOF.

RESULTADOS Y MÉTODOS

1. Detección de los materiales de partida ISQ201 y DBCO-Cy3 por MALDI-TOF MS

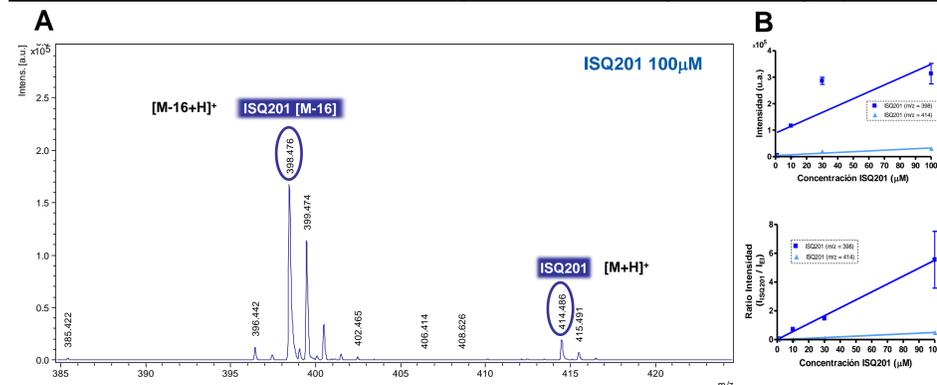
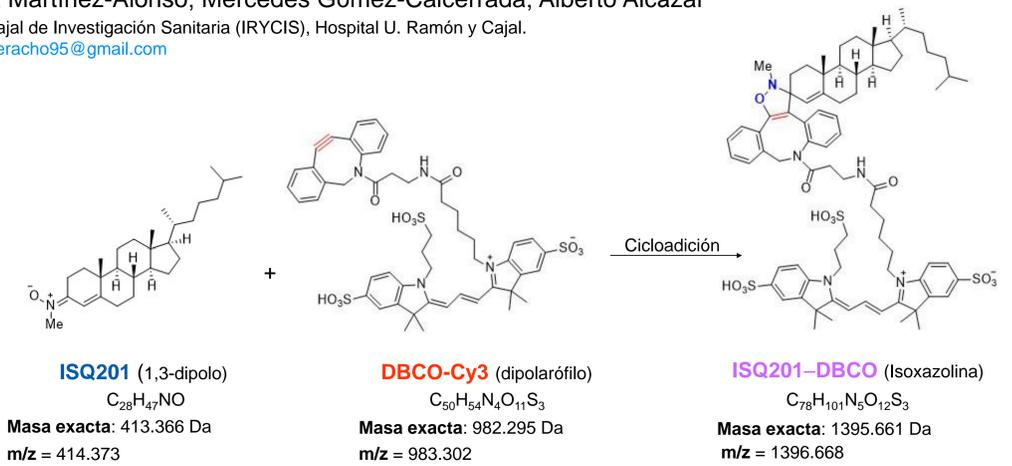


Figura 1. Análisis de ISQ201 por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) (A) Espectro de masas de ISQ201 (100 μM). Se representa la intensidad relativa en unidades arbitrarias (u.a.) de los picos de ISQ201 respecto a su m/z. El pico con mayor intensidad corresponde a su especie resultante de la pérdida del grupo hidroxilo (M - 16) (m/z = 398,478) y el pico minoritario corresponde al ion [M+H]⁺ (m/z = 414,486). (B) Relación de intensidad y concentración de ISQ201 (superior). Relación de intensidades (ratio) de ISQ201 y un estándar interno (EI) en función de la concentración de ISQ201 (inferior). Se utilizó un derivado de ISQ201 como EI (10 μM). La relación proporcional entre intensidad y concentración de ISQ201 es mayor en m/z = 398 que en m/z = 414. Los resultados representan la media ± SEM.



Esquema 1. Representación esquemática de la reacción de cicloadición entre ISQ201 y DBCO-Cy3 mediante una reacción de química *click*. Estructura química de ISQ201, DBCO-Cy3 y del producto de la reacción entre ambas moléculas. El 1,3-dipolo presente en la nitrona reacciona con la molécula dipolarófila para formar una isoxazolina (heterociclo de cinco átomos). Se muestra la masa exacta (M) de las moléculas (Da) y su [M+H]⁺ (m/z).

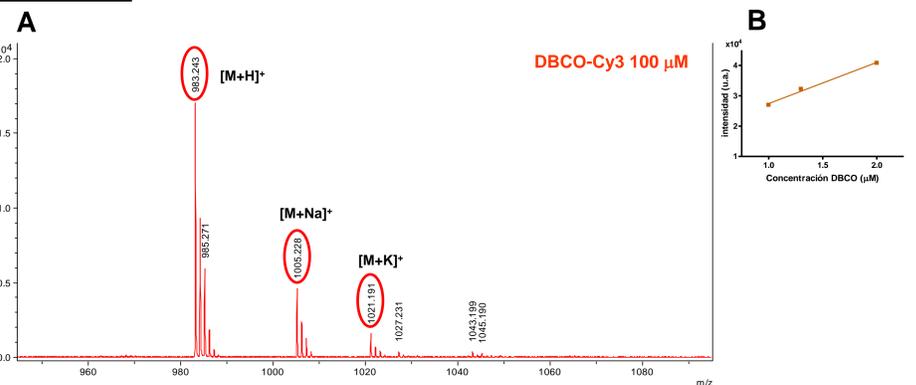


Figura 2. Análisis de DBCO-Cy3 por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) (A) Espectro de masas de DBCO-Cy3 (100 μM). Se representa la intensidad relativa de los picos de DBCO-Cy3 respecto a su m/z. El pico mayoritario corresponde al [M+H]⁺ (m/z = 983,243). También se observan picos resultantes de la ionización con un átomo de sodio (Na = 22,990 Da) [M+Na]⁺ (m/z = 1005,228), o la ionización con un átomo de potasio (K = 38,964 Da) [M+K]⁺ (m/z = 1021,191). (B) Relación intensidad y concentración de DBCO-Cy3 (μM). Se representa el logaritmo de la concentración de DBCO-Cy3 en el eje de abscisas. Se observa una relación proporcional entre la intensidad del pico m/z = 983 y la concentración de DBCO-Cy3 hasta una concentración de 100 μM.

2. Estudio de la formación del producto ISQ201-DBCO-Cy3 por MALDI-TOF MS

Condiciones de la reacción ensayadas : Estequiometría (ISQ201:DBCO): 1:1 (100 μM:100 μM), 1:5 (100 μM:500 μM), 5:1 (100 μM:20 μM) Temperatura (°C): 37 °C, 42 °C y 50 °C Tiempo (h): 1 h, 2 h, 3 h, 24 h

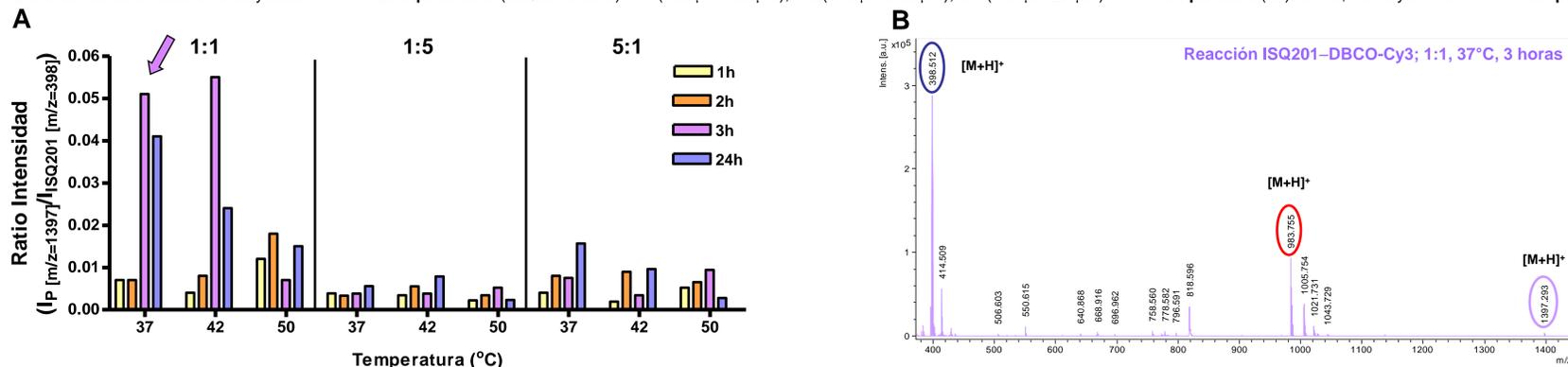


Figura 3. Comparación de condiciones de la reacción entre ISQ201 y DBCO-Cy3. Para determinar las condiciones con las que se obtenía mayor cantidad del producto de reacción se estableció el ratio entre las intensidades (I) de los picos correspondientes al producto (P) (m/z = 1397) e ISQ201 (m/z = 398). (A) Representación gráfica del ratio en las diferentes condiciones de reacción estudiadas. Los ratios más elevados se obtuvieron con las condiciones de estequiometría 1:1 y 3 h de reacción, tanto a 37 °C como a 42 °C. Se estableció la temperatura de la reacción a 37 °C (flecha), por encontrarse dentro del rango de temperatura fisiológica, para continuar con el ensayo en cultivos celulares, con un rendimiento estimado de la reacción del 20.7 % (I_P/I_{DBCO}). (B) Espectro de masas de la mezcla de reacción ISQ201-DBCO-Cy3 de las condiciones seleccionadas para el estudio. Se representa la intensidad relativa de los picos de las especies implicadas en la reacción respecto a su m/z. Los círculos indican los picos correspondientes a ISQ201 (azul) [M+H]⁺ (m/z = 398,512), DBCO-Cy3 (rojo) [M+H]⁺ (m/z = 983,755) y el producto de la reacción (morado) [M+H]⁺ (m/z = 1397,293).

3. Ensayo de la reacción ISQ201-DBCO-Cy3 en modelo experimental de isquemia cerebral

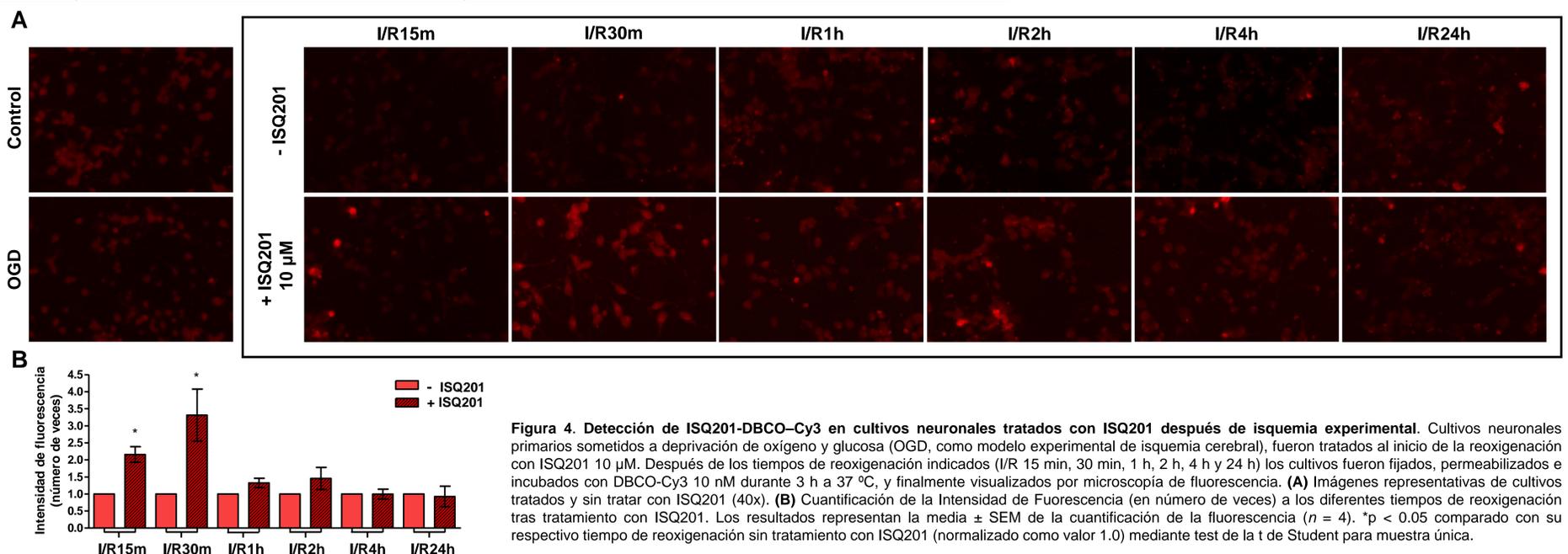


Figura 4. Detección de ISQ201-DBCO-Cy3 en cultivos neuronales tratados con ISQ201 después de isquemia experimental. Cultivos neuronales primarios sometidos a privación de oxígeno y glucosa (OGD, como modelo experimental de isquemia cerebral), fueron tratados al inicio de la reoxigenación con ISQ201 10 μM. Después de los tiempos de reoxigenación indicados (I/R 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 24 h) los cultivos fueron fijados, permeabilizados e incubados con DBCO-Cy3 10 nM durante 3 h a 37 °C, y finalmente visualizados por microscopía de fluorescencia. (A) Imágenes representativas de cultivos tratados y sin tratar con ISQ201 (40x). (B) Cuantificación de la Intensidad de Fluorescencia (en número de veces) a los diferentes tiempos de reoxigenación tras tratamiento con ISQ201. Los resultados representan la media ± SEM de la cuantificación de la fluorescencia (n = 4). *p < 0.05 comparado con su respectivo tiempo de reoxigenación sin tratamiento con ISQ201 (normalizado como valor 1.0) mediante test de la t de Student para muestra única.

CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado un método de detección específico del producto de reacción de química *click* entre las especies de reacción ISQ201 y DBCO-Cy3 mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, identificando los compuestos ISQ201 (m/z = 398 y 414), DBCO-Cy3 (m/z = 983) y el producto ISQ201-DBCO-Cy3 (m/z = 1397), demostrando dicha reacción de química *click* y la formación de su producto de reacción ISQ201-DBCO-Cy3.
- Entre las condiciones estudiadas de reacción, el mayor rendimiento se produjo con una estequiometría 1:1, durante 3 horas y a 37 °C, condiciones idóneas para su aplicación en un modelo celular de isquemia cerebral.
- La aplicación de esta técnica en un modelo experimental de isquemia cerebral en cultivos neuronales primarios tratados con ISQ201 ha permitido la detección específica e intracelular de ISQ201 y la determinación de su tiempo de actividad biológica entre 15 y 30 minutos.