

Detecção Intracelular de Proteínas Tirosina Fosfatases (PTPs) de Células de Câncer com 3,6-difosfato de fluoresceína

Maria Lair Sabóia de O. Lima (PG)^{1*}, Caroline C. S. Gonçalves (PQ)¹, e Anita J. Marsaioli (PQ)¹

¹Instituto de Química – UNICAMP - Brasil

*Tel./Fax: +55-19-3521-3067; e-mail: anita@iqm.unicamp.br

Palavras Chave: câncer, inibidores de fosfatase, sondas fluorogênicas.

Introdução

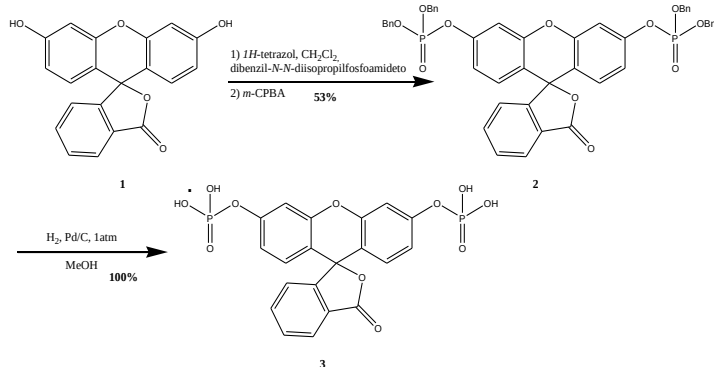
Desde 1983, quando o fosfato de *p*-nitrofenila, sensor cromogênico da atividade enzimática, foi hidrolisado por proteínas Tirosina Fosfatases (Protein Tyrosin Phosphatases - PTPs), outros substratos passaram a ser desenvolvidos e estudados a fim de explorar o potencial enzimático das PTPs.¹ A alternativa de um sensor fluorogênico é atrativa pela sua maior sensibilidade e por permitir localizar a sonda no interior da célula, ou seja, constatar a presença das PTPs através da fluorescência do produto.²

As PTPs são enzimas que estão envolvidas em diversos aspectos da atividade celular, tais como: proliferação, diferenciação e metabolismo e, por isso, é importante conhecer os diversos aspectos relacionados a elas.³

Estas enzimas são fundamentais na regulação das vias de transdução de sinal. Assim, problemas relacionados a esta enzima acarretam em várias doenças, como: câncer, síndromes metabólicas e doenças auto-imunes.⁴

Resultados e Discussão

No presente trabalho, a sonda fluorogênica 3,6-difosfato de fluoresceína (DPF, **3**) foi sintetizada segundo a metodologia descrita na literatura por Wahler e colaboradores para a fosforilação da umbeliferona, sendo a mesma adaptada pelo nosso grupo de pesquisa para a fosforilação da fluoresceína.⁵ (Esquema 1).



Esquema 1: Síntese da sonda fluorogênica DPF.

Esta sonda foi produzida com a finalidade visualizar intracelularmente a atividade e inibição de proteínas tirosina fosfatases. Este ensaio baseia-se na detecção fluorimétrica do ânion fluoresceína, liberado após a hidrólise enzimática, que pode ser observado no interior da célula por microscopia confocal (Figura 1).

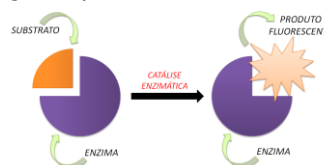


Figura 1: Conversão do substrato fluorogênico em produto fluorescente.

A fluoresceína (**1**) apresenta elevada fluorescência, sendo que a sua excitação máxima ocorre em 494 nm e a emissão em 521 nm (região do visível); apresenta um pKa de 6,4, e seu equilíbrio de ionização permite a sua aplicação em uma ampla faixa de pH (~4 a 10). Estas propriedades fazem da fluoresceína um esqueleto importante na síntese de diversas sondas fluorogênicas.⁶

Conclusões

A síntese da sonda fluorogênica **3** apresentou-se viável e com bom rendimento, nas condições estabelecidas. Estudos preliminares revelaram que esta sonda é viável para detectar atividade de PTP *in vitro* e *in vivo* estes deverão ser otimizados para melhor entendimento dos fenômenos

Agradecimentos

Capes, FAPESP, Petrobrás.

¹ Chernoff, J.; Li, H. C.; Cheng, Y. S.; Chen, L. B., *J. Biol. Chem.*, **1983**, 258, 7852-7857..

² Takakusa, H.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. A., *Chem. Eur. J.*, 2003, 9, 1479-1485.

³ Lee, Kyeong, Kangel, Jin Hyo, Xia, Yan, Chungl, Sang J., *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2011**, 11, 54-63.

⁴ Kumar, Sanjai, Zhou, Bo, Liang, Fubo, Wang, Wei-Qing, Huang, Zhonhui, Zhang, Zhong-Yin, PNAS, **2004**, vol. 101, nº 21, 7943-7948.

⁵ Wahler, D. et al. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8(14), 3211-3228.

⁶ Ali, M.; Dutta, P.; Pandey, S., *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114, 15042-15051.