

74391

CHALLIER, CECILIA

Fotoduplicados de sus partes constitutivas e historia de la A.P. de la

2015 74391



1914



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales



CREER...CREAR...CRECER

TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS QUÍMICAS

**FOTODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS
ANTIDIABÉTICOS E INFLUENCIA DE LA ALBÚMINA DE
SUERO HUMANO**

CECILIA CHALLIER

DIRECTOR: DRA. M. A. BIASUTTI

CO-DIRECTOR: N. A. GARCÍA

2015

MFi
Clasif:
T. 922

Este trabajo de Tesis fue realizado en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, y se presenta para optar por título de Doctor en Ciencias Químicas.

DIRECTOR DE TESIS: Dra. M. A. Biasutti



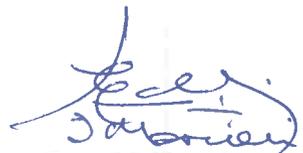
CO-DIRECTOR DE TESIS: Dr. N. A. García



JURADO ESPECIAL DE TESIS



Dr. G. A. Argüello
(UNC)



Dr. J. M. Marioli
(UNRC)



Dra. S. G. Bertolotti
(UNRC)

Río Cuarto-Marzo de 2015

AGRADECIMIENTOS

Fundamentalmente, a Dios, por su infinito amor y por haberme permitido llegar hasta donde llegué.

A los miembros del Jurado de Tesis, por guiar nuestros pasos durante este tiempo, demostrando siempre su interés y aportando sus opiniones y sugerencias, que han contribuido al enriquecimiento del trabajo que hemos realizado.

A la Dra. Alicia Biasutti y al Dr. Norman García, por introducirme y guiarme en este camino, por su dedicación y por compartir conmigo sus conocimientos y valiosas experiencias.

Muy especialmente a la Dra. Susana Criado, por su enorme colaboración, por aportar desinteresadamente sus ideas y su tiempo, que tanto han ayudado a la concreción de este trabajo de Tesis. Por enseñarme a transitar estos primeros tramos del camino con empeño, sacrificio, dedicación, prolijidad y responsabilidad, anteponiendo ante todas las cosas los valores humanos.

A la Dra. Paola Beassoni, a la Dra. Teresita Lisa y al Mic. Cristhian Boetsch, por colaborar con los resultados de acoplamiento molecular y por habernos dedicado su tiempo amablemente.

A la Dra. Liliana Sabini y a la Dra. Carola Sabini, por colaborar con nosotros en los estudios de citotoxicidad, y por abrirnos las puertas de su laboratorio tan gentilmente.

A la Dra. Patricia Allegretti, por su colaboración en este trabajo, y por su siempre buena disposición.

A mi familia: a mis padres Virginia y Oscar, que me inculcaron desde pequeña el sentido de la responsabilidad y el sacrificio. A Pablo, por acompañarme amorosamente en este camino, por su paciencia y sus consejos, por cuidarme con tanto amor y por ser mi pedacito de cielo aquí en la tierra. A Emi, Cande, Fede, a mi abuela y mi familia, por escucharme, por aconsejarme, por cuidar siempre de mí y por haberme dado su respaldo.

A mis amigos, la familia D'Andrea, por su apoyo incondicional y por ser mi segundo hogar.

A todos los compañeros del grupo de Fotoquímica, por compartir tantos buenos momentos en seminarios, congresos, en el laboratorio...

A mis compañeros de oficina: Rebe, Mari, Albi, Silvestre, Pauli, Linita, Poli, Dari, Mati C., Eze, Dani, Vale, Cris., Luci., Lu, Vicki, Lauri H, Lauri O., Nati, Lore M., Lore T., Clau, Memé, Nati T., Nahir, a todos los chicos del becario.. por compartir tantas buenas experiencias juntos...por todo el apoyo que me brindaron durante este tiempo.

A CONICET por el financiamiento económico.

A nuestra querida Universidad, por haberme dado la oportunidad de crecer y formarme.

A mi familia

*“La preferí a los cetros y los tronos,
En su comparación, tuve en nada la riqueza ...
Todo el oro a su lado, es un poco de arena...
Junto a ella la plata vale lo que el barro..
Me propuse tenerla por luz,
Porque el esplendor de La Sabiduría no tiene ocaso”*

Sb 7, 8-10

RESUMEN

Durante los últimos años se ha generado un gran interés por el estudio de la relación existente entre las especies reactivas de oxígeno (EROs) y enfermedades como cáncer, hipertensión, diabetes *mellitus*, etc. debido a situaciones de estrés oxidativo.¹⁻⁴ En particular, la diabetes *mellitus* está tomando una gran importancia en nuestros días, debido que afecta a un gran porcentaje de la población.⁵ En la mayoría de los casos, el tratamiento consiste en la administración de antidiabéticos (Andb) orales.^{6,7} Por otro lado, la sangre es el principal transporte de fármacos en el organismo, debido a la existencia de proteínas como la albúmina del suero humano (HSA) que cumplen esta función. HSA es además el componente antioxidante fundamental del plasma.⁸

Considerando la posibilidad de que los Andb y HSA se encuentren expuestos a altas concentraciones de EROs, es que resulta interesante estudiar la degradación de los Andb Gliclazida (Gli) y Glipizida (Glip) mediada por EROs y evaluar la influencia de HSA sobre dicho proceso. También es de relevancia determinar el efecto de glucosa sobre los procesos de asociación Andb-HSA y los procesos de fotooxidación de dichos sistemas, teniendo en cuenta las altas concentraciones de dicho carbohidrato presentes en un paciente diabético.⁵

El estudio de la interacción Andb-HSA se realizó mediante espectroscopía de fluorescencia y por acoplamiento molecular. Los resultados obtenidos por ambas técnicas fueron coincidentes y complementarios: ambos Andb se unen a la proteína en dos sitios, identificados como sitio II y sitio extra. En presencia de glucosa se observa un aumento en la afinidad de ambos Andb por HSA.

La participación de EROs en la degradación de los Andb, fue evaluada a través de estudios de fotooxidación sensibilizada por el pigmento natural Riboflavina (Rf). Los resultados indicaron la participación de oxígeno singlete ($O_2(^1\Delta_g)$) para ambos Andb y de anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para el caso de Glip. La cuantificación de la participación de $O_2(^1\Delta_g)$ en el proceso degradativo de Gli, Glip, HSA, Gli-HSA y Glip-HSA, se realizó mediante la fotodegradación en presencia del sensibilizador artificial Perinaftenona (PN). Los resultados indicaron que HSA podría generar un efecto protector sobre el sistema Andb-HSA frente a $O_2(^1\Delta_g)$, lo que se atribuye al proceso de asociación Andb-HSA. Este efecto también se observó en presencia de altas concentraciones de glucosa (hiperglucemia). Por otra parte, se identificaron por HPLC-masa dos productos de reacción de Gli con $O_2(^1\Delta_g)$, los que resultaron ser no tóxicos sobre cultivos de la línea celular Vero.

ABSTRACT

In recent years it has been great interest in the study of the relationship between reactive oxygen species (ROS) and the development of some diseases as cancer, diabetes *mellitus*, hypertension, due to oxidative stress scenario.¹⁻⁴ Diabetes mellitus is a world widely disseminated disease that has increased along the last years.⁵ The vast majority of cases of diabetes fall into two broad etiopathogenic categories: diabetes mellitus type I, and the more prevalent diabetes mellitus type II. In the last case, treatment consists in the administration of antidiabetic compounds (Andb).^{6,7} On the other hand, several drugs are carried in blood by human serum albumin (HSA), the most abundant circulating protein in blood serum. It is also known that this protein has significant antioxidant capability.⁸

In this context, since Andb and HSA may be exposed at high ROS concentrations, the study of ROS-mediated degradation of the antidiabetics Gliclazide (Gli) and Glipizide (Glip), and the influence of HSA on that process, is a very interesting topic. Besides, since patients suffering from diabetes are normally exposed to hyperglycemic conditions,⁵ the study of the influence of high glucose levels on the Andb-HSA binding process as well as in the ROS mediated degradation, also constitutes an objective of highly relevance.

The binding between Andb-HSA was studied employing fluorescence spectroscopic techniques and molecular docking experiments. Results obtained through both methods were coincident and complementary: both Andb bind to HSA on two sites, identified as site II and extra site. Under hyperglycemic conditions, an increment in binding constants was observed.

ROS-mediated degradation of Gli and Glip was evaluated through photodegradation experiments, sensitized by the natural pigment Riboflavin (Rf). The Rf-photosensitized oxidation of both Andb occurs through a mechanism mediated by singlet molecular oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$ and in the case of Gli, superoxide radical anion is also an intermediate species. Contribution of $O_2(^1\Delta_g)$ to degradation process of Gli, Glip, HSA Gli-HSA and Glip-HSA was quantified using the artificial sensitizer Perinaphtenone. Results showed that HSA could exert a protective effect on the Andb-HSA system against $O_2(^1\Delta_g)$, due to binding process. Same results were obtained under hyperglycemic conditions. On the other hand, two photoproducts derived of Gli- $O_2(^1\Delta_g)$ reaction were identified through HPLC-Mass spectrometry technique. Studies of cytotoxicity on Vero cells cultures, indicated that these photoproducts result no toxic.

Índice de Contenidos

Agradecimientos.....	iv
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
Índice de Contenidos.....	x
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tablas.....	xvii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I-1. ANTECEDENTES E IMPORTANCIA DEL TEMA.....	2
I-2. OBJETIVOS.....	8
I-2.1. General.....	8
I-2.2. Específicos.....	8
I-3. CONSIDERACIONES TEÓRICAS.....	9
I-3.1. Oxígeno.....	9
I-3.2. Especies reactivas de oxígeno (EROs).....	10
I-3.3. Balance redox.....	15
I-3.4. Oxígeno Singlete $O_2(^1\Delta_g)$	17
I-3.5. Fotooxidaciones sensibilizadas.....	29
I-3.6. Albúmina de Suero Humano (HSA).....	36
I-3.7. Acoplamiento molecular (<i>Docking</i>).....	39
I-3.8. Diabetes <i>mellitus</i> y antidiabéticos orales.....	41
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
II-1. Reactivos y solventes.....	47
II-2. Equipamiento.....	47
II-2.1. Espectroscopia de Absorción.....	47
II-2.2. Fluorescencia estacionaria.....	47
II-2.3. Fluorescencia resuelta en el tiempo.....	48

II-2.4. Fotólisis estacionaria	49
II-2.5. Detección de tiempos de vida y espectros de absorción de especies transitorias.....	50
II-2.6. Detección de tiempos de vida de $O_2(^1\Delta_g)$	52
II-2.7. Cromatografía HPLC-Espectrometría de Masa	53
II-3. Metodología.....	54
II-3.1. Determinación de los parámetros de <i>binding</i> de la interacción Gli-HSA y Glip-HSA. Modelo de isothermas de <i>binding</i>	54
II-3.2. Desactivación o <i>quenching</i> de fluorescencia de HSA por Gli y Glip	55
II-3.3. Análisis de tiempos de vida de fluorescencia	57
II-3.4. Análisis de parámetros termodinámicos de interacción	58
II-3.5. Acoplamiento molecular de HSA y Andb	59
II-3.6. Fotooxidación sensibilizada por Rf	60
II-3.7. Fotooxidación sensibilizada por PN.....	63
II-3.8. Estudios de la influencia de glucosa sobre la interacción Andb-HSA y los procesos de fotodegradación mediados por $O_2(^1\Delta_g)$	72
III. RESULTADOS	73
III-1: Caracterización del sistema andb-hsa.....	74
III-1.1. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS	75
III-1.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE Gli Y Glip CON HSA.....	76
III-1.2.1. Estudios mediante técnicas de fluorescencia	76
III-1.2.2. Estudio de la interacción Andb-HSA mediante ensayos de acoplamiento molecular (<i>docking</i>).....	84
III-1.3. CONCLUSIONES.....	94
III-2: Estudio del proceso de fotooxidación sensibilizada de los sistemas Andb, HSA y Andb-HSA	95
III-2.1. Fotooxidación sensibilizada por rf.....	96
III-2.1.1. Interacción de los Andb con los estados electrónicamente excitados de Rf.....	98
III-2.1.2. Fotooxidación estacionaria: Evaluación de la participación de EROs	101

III-2.2. fotooxidación sensibilizada por PN	103
III-2.2.1. Estudio de la interacción de los estados electrónicamente excitados de PN con HSA	104
III-2.2.2. Determinación de las velocidades relativas de consumo de oxígeno de los sistemas Andb y Andb-HSA.....	105
III-2.2.3. Determinación de las constantes de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ (k_t) .	106
III-2.2.4. Estudio de los productos de fotooxidación de Andb mediada por $O_2(^1\Delta_g)$	108
II-3. CONCLUSIONES	114
III-3: Estudio de la toxicidad <i>in vitro</i> de los productos de fotooxidación de Gli mediada por $O_2(^1\Delta_g)$	115
.....	115
III-3.1. Determinación de la Máxima Concentración no Citotóxica (MCNC).....	116
III-3.1.1. Soluciones de PN en ausencia de Gli.....	116
III-3.1.2. Soluciones de PN en presencia de Gli	117
III-3.1.2. Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC_{50}) por ensayo de captación de Rojo Neutro (RN).....	118
III-3. CONCLUSIONES	123
III-4: ESTUDIOS DE LA INFLUENCIA DE GLUCOSA SOBRE LA INTERACCIÓN Andb-HSA Y LOS PROCESOS DE FOTODEGRADACIÓN MEDIADOS POR $O_2(^1\Delta_g)$	124
III-4.1. Estudio de la influencia de Glucosa en la interacción Andb-HSA.....	125
III-4.1.1. Estudio del efecto de glucosa sobre HSA.....	125
III-4.1.2. Estudio de la interacción Andb-HSA en presencia de glucosa	126
III-4.1.3. Determinación de los parámetros de <i>binding</i> del sistema Andb-HSA en presencia de glucosa	127
III-4.2. ESTUDIOS DE LA INFLUENCIA DE GLUCOSA SOBRE LOS PROCESOS DE FOTODEGRADACIÓN MEDIADOS POR $O_2(^1\Delta_g)$	129
III-4.2.1. Determinación de las velocidades relativas de consumo de oxígeno de los sistemas Andb y Andb-HSA.....	129
III-4.2.2. Determinación de las constantes de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ (k_t) .	131
III-4.3. CONCLUSIONES	134

V.CONCLUSIONES.....	135
V. APÉNDICE	138
V-1. Estructuras químicas de los compuestos antidiabéticos	139
V-2. Estructuras químicas de aminoácidos fotooxidables	139
V-3. Estructuras químicas de sensibilizadores empleados	140
V.BIBLIOGRAFÍA	141

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura de HSA. (Extraído de bibliografía, referencia 21).	37
Figura 2: Estructura química de los antidiabéticos Gliclazida (Gli) y Glipizida (Glip).	44
Figura 3: A: Espectros de absorción de: Gli normalizado a 226 nm (3×10^{-5} M), Glip normalizado a 225 nm (5×10^{-6} M) y HSA normalizado a 280 nm (3×10^{-6} M, inserto), en solución reguladora de pH 7,4 B: Espectro de emisión de HSA 1×10^{-5} M en solución amortiguadora pH 7,4; $\lambda_{exc} = 295$ nm.75	75
Figura 4: Espectros de emisión de fluorescencia de HSA (1×10^{-5} M), $\lambda_{exc} = 295$ nm, solución reguladora de pH 7,4; en presencia de diferentes concentraciones ($0-1 \times 10^{-4}$ M) de A: Gli y B: Glip.	76
Figura 5: Gráficos del análisis clásico de Stern-Volmer a diferentes temperaturas. A: sistema Gli-HSA. B: sistema Glip-HSA.....	77
Figura 6: Isotermas de binding para la interacción Gli-HSA a diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$): A: 12,6. B: 18,6. C: 26,2. D: 35,2.....	79
Figura 7: Isotermas de binding para la interacción Glip-HSA a diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$): A: 12,6. B: 17,6. C: 26,6. D: 35,5.....	80
Figura 8: Gráfico de la ecuación de Van't Hoff para el cálculo de parámetros termodinámicos de interacción Glip-HSA.	82
Figura 9: A: Cavidades detectadas por "Pocket Finder" de ICM en HSA (Código pdb: 2BXD). B: Identificación de los sitios empleados para realizar acoplamiento molecular con Gli y Glip (sitio I, sitio II y sitio extra).	84

Figura 10: A: Ubicación de Warfarina en el sitio I de HSA empleando el método de Docking a validar. B: Estructuras de Warfarina en el sitio I de HSA. En blanco y rojo: Warfarina cristalográfica. En azul: Warfarina obtenida por acoplamiento molecular.....	85
Figura 11: Acoplamiento molecular localizado de Gli en el sitio I de HSA.	86
Figura 12: A: Acoplamiento molecular de Gli (representada en colores por tipo de átomo: turquesa para carbono, amarillo para azufre, azul para nitrógeno y rojo para oxígeno) en el sitio II de HSA. B: imagen del sitio II con Gli en su interior y los residuos aminoacídicos más próximos al Andb.	87
Figura 13: Acoplamiento molecular de Gli en el sitio extra: la mejor conformación se muestra en A y una conformación alternativa se muestra en B . Gli se representa coloreada por tipo de átomo y el sitio de <i>binding</i> está representado por superficies sólidos y transparentes. En los paneles inferiores se observan los residuos aminoacídicos más próximos al Andb.	88
Figura 14: Superposición de ligandos co-cristalizados (Azapropazona e Indometacina) que se unen al sitio extra en colores por tipo de átomo y en rojo Gli: A: en la conformación de la Figura 13 A. B: en la conformación alternativa de la Figura 13 B.....	89
Figura 15: Acoplamiento molecular ciego de Gli en el sitio extra de HSA. A y B: Conformaciones posibles de Gli cuando se une al sitio extra. Las estructuras en colores por tipo de átomo corresponden a ligandos co-cristalizados (Azapropazona e Indometacina) en este sitio de HSA.	89
Figura 16: Acoplamiento molecular de Glip mapeando el sitio I de HSA.	90
Figura 17: A: Acoplamiento molecular de Glip (representada en colores por tipo de átomo) en el sitio II de HSA. B: imagen del sitio II con Glip en su interior y los residuos aminoacídicos más próximos al Andb.	90
Figura 18: Acoplamiento molecular de Glip en el sitio extra: la mejor conformación se muestra en A y una conformación alternativa se muestra en B . Glip se representa coloreada por tipo de átomo y el sitio de <i>binding</i> está representado por superficies sólidas y transparentes. Los paneles inferiores muestran los residuos aminoacídicos más cercanos al Andb en cada conformación. .	91
Figura 19: Superposición de ligandos co-cristalizados (Azapropazona e Indometacina) que se unen al sitio extra (en colores por tipo de átomo) y Glip (en rojo); A: cuando Glip se encuentra en la conformación de la Figura 18A y B: cuando Glip se encuentra en la conformación alternativa de la Figura 18B.	92
Figura 20: Acoplamiento molecular ciego de Glip en el sitio extra de HSA. A y B: Conformaciones posibles de Glip cuando se une al sitio extra. Las estructuras en colores por tipo de átomo	

corresponden a ligandos co-cristalizados (Azapropazona e Indometacina) en este sitio de HSA.	92
Figura 21: Espectros de absorción en función del tiempo de irradiación aeróbica del sistema A: Gli 1×10^{-4} M. B: Glip 1×10^{-4} M. Los espectros de ambos Andb fueron determinados vs. el solvente: Rf ($A_{445nm} \sim 0,5$)/solución reguladora de pH 7,4+CH ₃ OH (2%).	96
Figura 22: Espectros de absorción del Rf (en solución reguladora de pH 7,4+ CH ₃ OH 10%) sin irradiar e irradiada 7 minutos, en ausencia y en presencia de Gli 5×10^{-4} M. Estas determinaciones se realizaron en solución saturada con argón.	97
Figura 23: A: Principal: Gráfico de <i>Stern-Volmer</i> para la desactivación de $^1Rf^*$ (fluorescencia estacionaria) por Gli Inserto: Gráfico de <i>Stern-Volmer</i> para la desactivación de $^1Rf^*$ (fluorescencia estacionaria) por Glip. B: Gráfico de <i>Stern-Volmer</i> para la desactivación del $^1Rf^*$ (fluorescencia resuelta en el tiempo) por Gli y Glip. $\lambda_{exc} = 445nm$; $\lambda_{em} = 520nm$. [Rf] = 0,02 mM en solución reguladora de pH 7,4/CH ₃ OH (10%).	98
Figura 24: Gráfico de <i>Stern-Volmer</i> para la desactivación de $^3Rf^*$ por Gli y Glip $\lambda_{exc} = 355nm$ [Rf] = 0,02 mM en solución reguladora de pH 7,4/CH ₃ OH (10%) saturada con argón.	99
Figura 25: Espectro de especies transitorias de: A: Principal: Rf 0,02 mM (negro) tomados a 2 μs después del pulso láser y Rf 0,02 mM + Gli $5 \times 10^{-4}M$ (azul), tomado a 20 μs después del pulso láser en solución reguladora de pH 7,4/CH ₃ OH (10%), saturada con argón. Inserto: Espectros de especies transitorias de Rf 0,02 mM (negro) y 0,02 mM Rf+ Gli $5 \times 10^{-4}M$ (azúl), tomados a 2 μs y a 20 μs después del pulso láser, respectivamente, normalizados a 670nm. B: Principal: Espectro de especies transitorias de Rf 0,02 mM (negro) tomados a 2 μs después del pulso láser y Rf 0,02 mM + Glip $5 \times 10^{-4} M$ (rojo), tomado a 20 μs después del pulso láser, en solución reguladora de pH 7,4/ CH ₃ OH (10%), saturada con argón. Inserto: Espectros de especies transitorias de Rf 0,02 mM (negro) y Rf 0,02 mM + Glip $5 \times 10^{-4}M$ (rojo), tomados a 2 μs y a 20 μs después del pulso láser, respectivamente, normalizados a 670nm.	100
Figura 26: Consumo de oxígeno por: A: Gli (5×10^{-4} M) y B: Glip (2×10^{-4} M) bajo irradiación sensibilizada por Rf en presencia de inhibidores específicos de EROs: NaN ₃ (5×10^{-3} M), SOD y CAT (1mg/100ml). Las soluciones fueron preparadas en solución reguladora de pH 7,4/CH ₃ OH (10%), en presencia de Rf ($A_{445nm} = 0,5$).	101
Figura 27: Gráfico de <i>Stern-Volmer</i> para la desactivación del estado triplete electrónicamente excitado de PN por HSA en solución reguladora de pH 7,4.	104

Figura 28: Consumo de oxígeno por los sistemas: A: Gli (5×10^{-4} M), HSA (1×10^{-5} M) y Gli-HSA (5×10^{-4} M- 1×10^{-5} M) y B: Glip (2×10^{-4} M), HSA (1×10^{-5} M) y Glip-HSA (2×10^{-4} M- 4×10^{-6} M) en solución reguladora de pH 7,4/CH ₃ OH (10%), PN ($A_{365\text{ nm}} \sim 0,5$) bajo irradiación estacionaria.	105
Figura 29: Gráficos de Stern-Volmer para la desactivación total de O ₂ ($^1\Delta_g$) por: A: HSA, B: Gli, C: Glip, D: Gli-HSA y E: Glip-HSA en solución reguladora de pH 7,4/CD ₃ OD (10%). En los sistemas que contienen la proteína, la concentración de la misma fue constante e igual a 1×10^{-5} M.	107
Figura 30: Estructura química de Gli. PM: 323,4. Compuesto detectado en la muestra sin irradiar.	109
Figura 31: Posible estructura química de fotoproducto I. M: 195 uma. Compuesto detectado en la muestra irradiada durante 60 minutos, a un $t_R = 3,9$ minutos.	110
Figura 32: Posible estructura química de fotoproducto II. M: 387 uma. Compuesto detectado en la muestra irradiada durante 60 minutos a $t_R = 13,2$ minutos.	111
Figura 33: Estructura química propuesta del compuesto detectado a $t_R = 13,9$ min. (M+H) ⁺ = 706,3 uma. Compuesto detectado en la muestra irradiada durante 90 minutos.	112
Figura 34: Aspectos morfológicos de células Vero en monocapas. A: cultivo sin tratar (control). B: cultivo tratado con una concentración citotóxica de solución de PN (4,9 $\mu\text{g/mL}$) irradiada durante 60 minutos.	117
Figura 35: Curvas de supervivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por captación de RN, luego del tratamiento con solución de PN ($\text{PN}_{\text{stock}} = 9,9 \mu\text{g/ml}$) y solución Gli/PN (Gli _{stock} =161,7 $\mu\text{g/ml}$; PN _{stock} =9,9 $\mu\text{g/ml}$); A: sin irradiar, B: irradiadas durante 60 minutos y C: irradiadas durante 90 minutos.	120
Figura 36: Curvas de supervivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por captación de RN, luego del tratamiento con soluciones de Gli/PN (Gli _{stock} =1617 $\mu\text{g/mL}$; PN= 0,5 $\mu\text{g/ml}$); A: sin irradiar, B: irradiadas por 45 minutos y C: irradiadas por 75 minutos.	122
Figura 37: A: Espectros de emisión de HSA 1×10^{-5} M ($\lambda_{\text{exc}} = 295\text{nm}$) en solución reguladora de pH 7,4 en presencia de diferentes concentraciones de glucosa ($0 - 1,3 \times 10^{-2}$ M). B: Espectros de emisión de L-triptófano 1×10^{-5} M ($\lambda_{\text{exc}} = 295\text{nm}$) en solución reguladora de pH 7,4 en presencia de agregados de glucosa en concentraciones ($0 - 1,3 \times 10^{-2}$ M).	125
Figura 38: Espectros de emisión de HSA 1×10^{-5} M / glucosa $1,2 \times 10^{-2}$ M ($\lambda_{\text{exc}} = 295\text{nm}$) en solución reguladora de pH 7,4 en presencia de agregados ($0 - 1 \times 10^{-4}$ M) de A: Gli y B: Glip.	126
Figura 39: Gráficos del análisis clásico de Stern-Volmer. A: sistema Gli-HSA y B: sistema Glip-HSA. Estudios en presencia de glucosa $1,2 \times 10^{-2}$ M.	127

Figura 40: Isotermas de <i>binding</i> para la interacción A: Gli-HSA y B: Glip-HSA en presencia de glucosa $1,2 \times 10^{-2}$ M.....	128
Figura 41: Gráficos de <i>Stern-Volmer</i> para la desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por: A: Gli, B: Gli-HSA, C: Glip, D: Glip-HSA en solución reguladora de pH 7,4/CD ₃ OD (10%)/glucosa $1,7 \times 10^{-2}$ M. En los sistemas que contienen la proteína, la concentración de la misma fue constante e igual a 1×10^{-5} M.....	132
Figura 42: Estructuras químicas de Gliclazida (Gli) y Glipizida (Glip).....	139
Figura 43: Estructuras químicas de aminoácidos fotooxidables.....	139
Figura 44: A: Estructura química de Rf: 7,8-dimetil-10 (1'-D-ribitilo) isoaloxazina. B: Estructura química de Perinaftenona (PN).....	140

Índice de Tablas

Tabla 1: Tiempos de vida de fluorescencia de HSA con agregados de Gli a 25°C ($\lambda_{exc} = 295$ nm).	78
Tabla 2: Tiempos de vida de fluorescencia de HSA con agregados de Glip a 25°C ($\lambda_{exc} = 295$ nm).	78
Tabla 3: Constantes de <i>binding</i> para las interacciones Gli-HSA y Glip-HSA a diferentes temperaturas.....	81
Tabla 4: Parámetros termodinámicos de interacción Glip-HSA.....	83
Tabla 5: Constantes de velocidad de desactivación de $^1Rf^*$ (1k_q) y $^3Rf^*$ (3k_q) por Gli y Glip en solución reguladora de pH 7,4/CH ₃ OH (10%). τ_0 $^1Rf^* = 5$ ns. NQ: no se observó <i>quenching</i>	99
Tabla 6: Velocidades relativas de consumo de oxígeno (v_r) del sistema Andb/Rf/solución reguladora de pH 7,4/ CH ₃ OH (10%) en ausencia y presencia de inhibidores específicos: NaN ₃ (5×10^{-3} M), SOD y CAT (1mg/100mL).....	102
Tabla 7: Velocidades relativas de consumo de oxígeno (v_r) y constante de velocidad de desactivación total (k_t) de $O_2(^1\Delta_g)$ por los sistemas Gli (5×10^{-4} M), HSA (1×10^{-5} M), Gli-HSA (5×10^{-4} M- 1×10^{-5} M), Glip (2×10^{-4} M) y Glip-HSA (2×10^{-4} M- 4×10^{-6} M) en solución reguladora de pH 7,4/CH ₃ OH (10%), PN ($A_{365\text{ nm}} \sim 0,5$). Los valores de k_t fueron obtenidos en solución reguladora de pH 7,4/CD ₃ OD (10%), PN ($A_{355\text{ nm}} \sim 0,3$).	106

Tabla 8: Fracción de supervivencia (FS) promedio para cultivos de células Vero tratadas con soluciones de PN ($PN_{stock}=9,9 \mu\text{g/mL}$) a diferentes tiempos de irradiación: 0, 60 y 90 minutos. Los porcentajes fueron promediados sobre tres determinaciones independientes	119
Tabla 9: Fracción de supervivencia (FS) promedio para cultivos de células Vero tratadas con soluciones Gli/PN, ($Gli_{stock}=161,7 \mu\text{g/mL}$; $PN_{stock}=9,9 \mu\text{g/mL}$) a diferentes tiempos de irradiación: 0, 60 y 90 minutos. Los porcentajes fueron promediados sobre tres determinaciones independientes.	119
Tabla 10: CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de PN para soluciones de PN y soluciones Gli/PN, a diferentes tiempos de irradiación: 0, 60 y 90 minutos.	120
Tabla 11: Fracción de supervivencia promedio para cultivos de células Vero tratadas con soluciones de Gli/PN ($Gli_{stock}=1617 \mu\text{g/mL}$; $PN=0,5 \mu\text{g/mL}$) a diferentes tiempos de irradiación: 0, 45 y 75 minutos. Los porcentajes fueron promediados sobre cuatro determinaciones independientes	121
Tabla 12: Parámetros de <i>binding</i> para las interacciones Gli-HSA y GliP-HSA en ausencia y en presencia de glucosa $1,2 \times 10^{-2}$ M.	128
Tabla 13: Velocidades relativas de consumo de oxígeno, con PN como sensibilizador, para Gli, HSA y Gli-HSA en ausencia y en presencia de glucosa a diferentes concentraciones. s/d: sin datos.	130
Tabla 14: Velocidades relativas de consumo de oxígeno, con PN como sensibilizador, para GliP, HSA y GliP-HSA en ausencia y en presencia de glucosa a diferentes concentraciones. s/d: sin datos.	130
Tabla 15: Constantes de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por Gli, GliP, HSA, Gli-HSA y GliP-HSA en ausencia y en presencia de glucosa. s/d: sin datos.	132

I. INTRODUCCIÓN

I-1. ANTECEDENTES E IMPORTANCIA DEL TEMA

Durante los últimos años el interés por el estudio de las especies reactivas de oxígeno (EROs) ha crecido notablemente, debido a la existencia de un fuerte vínculo entre dichas especies y el desarrollo de un gran número de enfermedades.¹⁻⁴ Es más, se ha intentado profundizar en el conocimiento de los mecanismos de generación y atenuación de estas especies a nivel celular. Estas investigaciones revelaron, por un lado, las capacidades celulares de producir cantidades moderadas de EROs debido a la participación de las mismas en procesos fisiológicos importantes como en la eliminación de microorganismos, en la señalización celular, etc.⁹ Además, quedó en evidencia¹⁰ que existen varios procesos metabólicos que generan EROs como subproductos. Sin embargo, se sabe² que la célula cuenta con diferentes mecanismos a través de los cuales puede mantener las concentraciones de EROs a niveles no tóxicos (balance oxidativo), debido a la gran reactividad que presentan estas especies. No obstante, se demostró¹ que bajo ciertas condiciones se producen fallas en el mantenimiento de este balance oxidativo, que causan un incremento anormal en las concentraciones de EROs en las células, también conocido como situación de estrés oxidativo. Actualmente, se encuentran cada vez más evidencias que vinculan estrechamente a las altas concentraciones de EROs con el desarrollo de enfermedades como cáncer¹¹, resistencia a insulina¹², diabetes *mellitus*², enfermedad cardiovascular¹³, arterosclerosis¹⁴, envejecimiento celular¹⁵, entre otras.

En relación a este último punto, cabe destacar la importancia que la diabetes *mellitus* está tomando en nuestros días. Se sabe⁵ que esta enfermedad afecta a un 8,3% de la población mundial adulta y se estima que aumentará a un 10% en 2035. A su vez, el 80% del total de pacientes diabéticos posee diabetes *mellitus* de tipo II. Parte del tratamiento en este caso consiste en la administración de Antidiabéticos orales (Andb), como lo son los compuestos pertenecientes a la familia de las sulfonilureas.^{6,7} Estos Andb actúan estimulando la liberación de insulina en el organismo. Los más empleados en la actualidad son compuestos que pertenecen a la segunda generación de sulfonilureas, tales como Gliclazida, Glipizida, Glibenclamida y Glimepirida.¹⁶

Teniendo en cuenta la estrecha relación existente entre la diabetes y las condiciones de estrés oxidativo, es que resultaría interesante evaluar los procesos de degradación de los Andb en presencia de EROs. En este sentido, se han encontrado en bibliografía algunas investigaciones relacionadas a procesos de degradación de compuestos Andb. Se puede citar el trabajo de Bansal *et al.*¹⁷ quienes estudiaron los procesos de degradación de Glipizida en condiciones extremas de pH, temperatura, en presencia de altas concentraciones de H₂O₂ y bajo irradiación UV, como así

también la identificación de los productos de degradación, mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Los autores detectaron la formación de varios productos de degradación bajo diferentes condiciones experimentales ensayadas. Además, encontraron que la degradación de Glipizida es susceptible al pH y a la temperatura en solución, mientras que en estado sólido no se observó efecto de dichas variables.

Por otro lado, se encuentran los aportes realizados por Selvaag *et al.* quienes estudiaron la toxicidad de los productos de fotodegradación por irradiación UVA directa de un grupo de Andb orales. Los resultados indicaron toxicidad *in vivo* e *in vitro* para los productos derivados de Clorpropamida, Tolbutamida y Glimidina,¹⁸ mientras que no se observó toxicidad para los productos derivados de Glipizida y Glibenclamida.¹⁹

Recientemente se publicaron estudios de fotodegradación directa con radiación UV y sensibilizada por Rosa de Bengala (RB) de otro Andb denominado Tolazamida, perteneciente a la familia de las sulfonilureas.²⁰ Los resultados indicaron que no ocurre degradación sensibilizada por RB de Tolazamida, por lo que se descartó la posible interacción con $O_2(^1\Delta_g)$. En los experimentos de irradiación con luz UV del Andb se detectaron productos de oxidación de naturaleza radicalaria, derivados de la ruptura homolítica del carbono carbonílico del grupo amida. Estos productos, en presencia de lípidos, demostraron capacidad de abstraer hidrógenos y causar peroxidación lipídica. Los resultados obtenidos para estos mismos ensayos realizados en ausencia de oxígeno, confirmaron que este compuesto se podría comportar como un sensibilizador que probablemente reacciona vía mecanismos exclusivamente radicalarios.

Por otro lado, la sangre es el principal transporte de medicamentos y sustancias hacia los tejidos del organismo, y está constituida por un conjunto de proteínas que cumplen esta función fundamental. La albúmina del suero humano, HSA (Human Serum Albumin), es una de las proteínas más abundantes de la sangre y representa aproximadamente el 60% del total de proteínas en el plasma.²¹ Está involucrada en el transporte de una gran cantidad de sustancias, tales como bilirrubina, medicamentos, ácidos grasos, hormonas, etc.²²⁻²⁴ Sin embargo, ha quedado en evidencia que HSA representa además el componente antioxidante fundamental del plasma, ya que se demostró que más del 70% de la actividad de captura de radicales libres en el suero sanguíneo se debe a HSA y que ésta proteína actúa en general como blanco principal para las especies oxidantes generadas en procesos de estrés oxidativo.²⁵ Estudios previos indicaron que estas propiedades antioxidantes de la proteína derivan, por un lado, de sus capacidades de unión a determinados componentes o *binding*. Específicamente, se sabe²⁶ que metales como Cu(I), que

puede participar en la generación de radical oxhidrilo, posee una gran afinidad por el extremo N-terminal de HSA. Unido a la proteína, Cu(I) tiene menor posibilidad de participar en la generación de dicho radical. También se propuso que los ácidos grasos poliinsaturados unidos a HSA pueden encontrarse protegidos frente a reacciones de oxidación.^{27,28} Además, se descubrió que la proteína posee un único residuo de cisteína (Cis34) cuyo grupo -SH se encuentra reducido y que el mismo es capaz de reaccionar con el radical oxhidrilo e incluso regenerarse, siendo de esta manera un regulador redox muy importante.^{29,30} También se demostró la preferencia que posee el ácido hipocloroso (HOCl) por HSA.³¹ En todos los casos, se señaló que un aspecto favorable frente a estas condiciones, es la gran abundancia que HSA presenta en el plasma sanguíneo.²⁵

Los procesos de *binding* entre HSA y diferentes ligandos han sido muy estudiados durante las últimas décadas a través de una gran variedad de métodos.³²⁻⁴⁵ Uno de los principales motivos que ha llevado a dichos estudios, consiste en el conocimiento y caracterización de las interacciones ligando-HSA para comprender los aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos de los medicamentos.⁴⁶⁻⁴⁸ No obstante, el aspecto antioxidante de HSA relacionado a su capacidad de *binding* y su efecto sobre las interacciones con medicamentos aún no ha sido muy explorado. Uno de los primeros resultados que significó un gran avance para el estudio de las interacciones, surgió de las investigaciones realizadas por Sudlow *et al.* quienes propusieron la existencia de dos sitios de unión o *binding* en HSA denominados sitio I y sitio II, mediante experimentos de desplazamiento de pruebas fluorescentes.^{49,50} Posteriormente, utilizando fragmentos de HSA generados por digestión de tripsina y pepsina, Bos *et al.* propusieron que los sitios I y II de HSA se encontraban localizados en los dominios II y III de la proteína (Figura 1, sección I-3.6), respectivamente.⁵¹ De esta manera, la mayoría de los trabajos publicados desde entonces, se han centrado en el estudio de las interacciones ligando-HSA en estos dos sitios principales, empleando fundamentalmente técnicas de espectroscopia de fluorescencia, UV-Visible, desplazamiento de pruebas fluorescentes, ultracentrifugación y diálisis, entre otras.⁵²⁻⁶⁵ Sin embargo, con el avance de las técnicas de cristalografía y de difracción de rayos X, se comenzó a conocer con mejor detalle no sólo la estructura de HSA, sino también las estructuras de la proteína co-cristalizada con diferentes ligandos.⁶⁶⁻⁷⁰ Este nuevo panorama advirtió sobre la existencia de otras cavidades en las que se pueden establecer interacciones.⁷¹⁻⁷⁵ Además, cabe destacar la importancia que están teniendo en nuestros días las herramientas computacionales aplicadas a varios sectores de la ciencia como complementos fundamentales en la búsqueda del conocimiento. En este contexto, el empleo de técnicas de simulación computacional, como las de

acoplamiento molecular o *docking*, han contribuido en gran medida a la comprensión de la naturaleza de las interacciones, complementando los resultados experimentales y ampliando los esquemas iniciales de interacción ligando-HSA.⁷⁶⁻⁸³

En el caso particular de la interacción entre Andb y HSA, se han publicado algunas investigaciones realizadas por Seedher y Kanojia, quienes estudiaron la asociación de los Andb Gliclazida, Repaglinida, Glipizida y Glimepirida con HSA.^{84,85} Estos autores encontraron que Gliclazida y Repaglinida se unen solo al sitio II de HSA, mientras que Glipizida y Glimepirida se unen a los sitios I y II de la proteína. En general, la cuantificación de las constantes de *binding* en estos estudios se realizó mediante técnicas de fluorescencia y la identificación de los sitios involucrados, mediante desplazamiento de pruebas fluorescentes. Respecto de esta última técnica, es importante tener en cuenta que si bien ha sido ampliamente utilizada en la predicción de los sitios involucrados en la asociación ligando-HSA, presenta algunas debilidades. Estos experimentos se basan en la utilización de pruebas moleculares fluorescentes que se unen específicamente a los sitios I o II de HSA o a ambos. Experimentalmente se observan los espectros de emisión de la prueba fluorescente inicialmente unida a HSA en presencia del ligando. Si ocurre alguna modificación en la emisión, es probable que dicho ligando esté desplazando a la prueba fluorescente de su sitio de unión, y que por lo tanto el ligando se una al sitio en cuestión. Los cambios que se detectan son similares a los que se observan cuando la prueba fluorescente pasa de un entorno hidrofóbico hacia un medio polar.⁴⁹ Sin embargo, una dificultad que puede generar una interpretación errónea de los resultados, es el hecho de que los cambios en la emisión de las pruebas fluorescentes pueden ocurrir igualmente por otras causas que no sean el desplazamiento competitivo del sitio de *binding*. Puede ocurrir un desplazamiento no competitivo de la prueba, o cambios en su rendimiento cuántico de fluorescencia, debido a cambios conformacionales que ocurran en HSA por interacción del ligando con otros sitios de *binding*.⁴⁹ Además, esta metodología queda limitada a la investigación de la asociación ligando-HSA únicamente en los sitios I y II.

Por su parte, la espectroscopia de fluorescencia ha sido y sigue siendo una técnica muy utilizada en estas investigaciones, ya que es una de las más versátiles y sensibles en el estudio de las interacciones entre una proteína y un ligando.⁸⁶ En el caso particular de HSA, la técnica se aplica excitando al único residuo triptófano ($\lambda_{exc} = 295 \text{ nm}$), cuya emisión de fluorescencia puede desactivarse en presencia del ligando. De este modo, la ventaja que se presenta, es que la interpretación de los resultados es mucho más sencilla debido a que la información proviene desde un único fluoróforo, que además resulta sensible a los cambios que ocurren en su entorno.

Otros estudios sobre la interacción Andb-HSA propusieron⁸⁷ que Acetoxamida y Tolbutamida se unen a los sitios I y II de HSA con afinidades similares y constantes de *binding* del orden de 10^4 - 10^5 M⁻¹. Estos resultados han sido obtenidos mediante cromatografía de afinidad de alta eficacia.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que la diabetes es una enfermedad caracterizada por niveles anormalmente altos de glucosa en sangre, que pueden generar alteraciones patológicas muy importantes en los pacientes diabéticos.⁸⁸ En estas condiciones de hiperglucemia no controlada, pueden ocurrir reacciones no enzimáticas de los grupos cetona o aldehído de glucosa con los grupos amino de proteínas, formando de esta manera los llamados productos de glicación avanzada, también conocidos como AGEs (Advanced Glycated End Products).^{89,90} Estos productos no solo pueden causar perjuicios en las funciones biológicas de las proteínas, sino que además se ha informado su contribución a las condiciones de estrés oxidativo, ya que son capaces de inducir la generación intracelular de EROs.⁹¹

En este contexto, surgen las principales motivaciones de este trabajo de tesis. Considerando la posibilidad de que los Andb y HSA se encuentren expuestos a altas concentraciones de EROs (asociadas al escenario de estrés oxidativo ligado a la diabetes), los antecedentes que indicaron la sensibilidad de algunos Andb a reacciones fototóxicas y los indicios que relacionaron las propiedades antioxidantes de HSA a sus capacidades de *binding*, es que resulta sumamente interesante estudiar los procesos de degradación sensibilizada de los Andb Gliclazida (Gli) y Glipizida (Glip), ya que no se cuenta con un estudio detallado y completo que caracterice los procesos de degradación de estos Andb mediados por EROs. También evaluar qué influencia ejerce sobre dicho proceso, el *binding* o interacción de estos compuestos con HSA, considerando los indicios ya existentes de las interacciones Andb-HSA e incursionando además, en la búsqueda de nuevas evidencias experimentales que permitan explorar un panorama más amplio del modelo de interacción Andb-HSA.

Por otro lado, es importante además, estudiar la generación de productos de oxidación derivados de la interacción de los Andb con EROs que sean eventualmente tóxicos para la salud.

Finalmente, teniendo en cuenta que los Andb y HSA pueden encontrarse en microentornos comunes caracterizados por la presencia de altas concentraciones de glucosa y los escenarios de estrés oxidativos que estas condiciones puede generar en pacientes diabéticos, es de relevancia estudiar el efecto que este carbohidrato puede tener tanto en el proceso de asociación Andb-HSA

como en la fotodegradación mediada por $O_2(^1\Delta_g)$, proceso degradativo fundamental del sistema en estudio.

I-2. OBJETIVOS

I-2.1. GENERAL

- ❖ Estudiar el potencial proceso de degradación mediado por EROs de compuestos antidiabéticos e investigar la influencia de HSA en dicho proceso.

I-2.2. ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterizar la asociación de Gliclazida (Gli) y Glipizida (Glip) a HSA mediante la determinación de constantes de asociación o *binding*, detección del número de sitios involucrados en la unión y determinación de los parámetros termodinámicos de interacción.
- ❖ Identificar y caracterizar los sitios de unión de Gli y Glip a HSA mediante estudios teóricos de acoplamiento molecular (*docking*).
- ❖ Estudiar la cinética y los mecanismos de degradación sensibilizada de los sistemas Gli, Glip, HSA, Gli-HSA y Glip-HSA mediados por EROs, en presencia del pigmento natural Riboflavina y del sensibilizador artificial Perinaftena.
- ❖ Identificar los productos de fotooxidación mediada por oxígeno singlete de los Andb.
- ❖ Evaluar la potencial toxicidad de los productos de fotooxidación de los Andb *in vitro*.
- ❖ Investigar la influencia de glucosa sobre los procesos de *binding* entre los Andb y HSA, como así también sobre la fotooxidación sensibilizada por Perinaftena de los sistemas Andb y Andb-HSA.

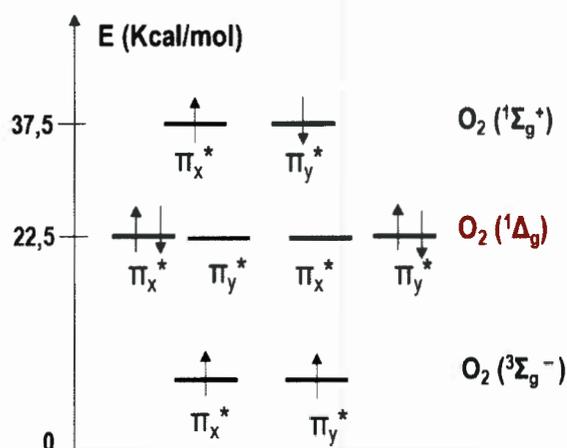
I-3. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

I-3.1. OXÍGENO

El oxígeno apareció en la tierra hace aproximadamente 2 billones de años gracias a la evolución de las cianobacterias,⁹² microorganismos capaces de realizar fotosíntesis. Si bien en la actualidad solo representa el 21% de los gases presentes en la atmósfera, el oxígeno en su estado fundamental es vital para la mayoría de los organismos. A través de la respiración celular, el oxígeno es capaz de generar una cantidad considerable de energía que permite el desarrollo de la vida y evolución en los seres vivos.

A pesar de ser una molécula sencilla, oxígeno posee propiedades inusuales respecto del comportamiento magnético, espectroscópico y reactivo. La explicación a este fenómeno proviene de la configuración electrónica de esta molécula. Dos átomos de oxígeno con sus seis electrones se unen para formar una molécula cuya configuración electrónica (siguiendo la regla de Hund) en su estado fundamental puede ser descrita de la siguiente manera: O_2 (Fundamental): (core) $(\pi_x)^2(\pi_y)^2(\pi_x^*)^1(\pi_y^*)^1$

Como puede notarse, todos los electrones, con excepción de los que ocupan los orbitales π^* , se encuentran apareados. Estudios previos^{93,94} indicaron que esta configuración podría generar tres estados electrónicos: un triplete $O_2(^1\Sigma_g^-)$ y dos estados excitados singletes $O_2(^1\Delta_g)$ y $O_2(^1\Sigma_g^+)$, dependiendo de la posición que tomen los electrones en los orbitales de antienlace π^* y sus estados de espín correspondientes (Esquema 1):



Esquema 1: Diagrama de los posibles estados de espín de los electrones del HOMO del oxígeno.

Los estados $O_2(^1\Delta_x)$ y $O_2(^1\Delta_y)$ que se obtienen cuando los electrones se encuentran apareados en los orbitales $(\pi_x^*)^2$ o $(\pi_y^*)^2$ respectivamente, se encuentran degenerados y generalmente se los refiere como al estado "singlete" u $O_2(^1\Delta_g)$.

Los estados excitados $O_2(^1\Delta_g)$ y $O_2(^1\Sigma_g^+)$ se encuentran respectivamente a 22,5 y 37,5 Kcal/mol por encima del estado fundamental (Esquema 1).⁹⁵ Los tiempos de vida radiativos de $O_2(^1\Delta_g)$ y $O_2(^1\Sigma_g^+)$ son de $2,7 \times 10^3$ seg y 7,1 seg respectivamente, los que pueden considerarse relativamente largos.⁹⁶ Sin embargo, estos tiempos de vida no son observables bajo condiciones normales de presión o en solución, puesto que ocurren desactivaciones químicas y colisionales muy eficientes de ambos estados excitados. Para el caso de $O_2(^1\Delta_g)$, se ha indicado que éste podría interactuar con el solvente de manera que la transición $O_2(^1\Delta_g)$ a $O_2(^3\Sigma_g^-)$ sea posible, aunque según las reglas de selección, la misma estaría prohibida.

Como se mencionó anteriormente, $O_2(^3\Sigma_g^-)$ presenta una configuración electrónica en la que sus últimos dos electrones se encuentran desapareados (configuración de espín triplete). De esta manera, la posibilidad de que ocurra una reacción entre $O_2(^3\Sigma_g^-)$ y otras moléculas se encuentra bajo la restricción que imponen las reglas de selección, ya que la mayoría de las moléculas en estado fundamental poseen apareados sus electrones de valencia (configuración de espín singlete).^{97,98}

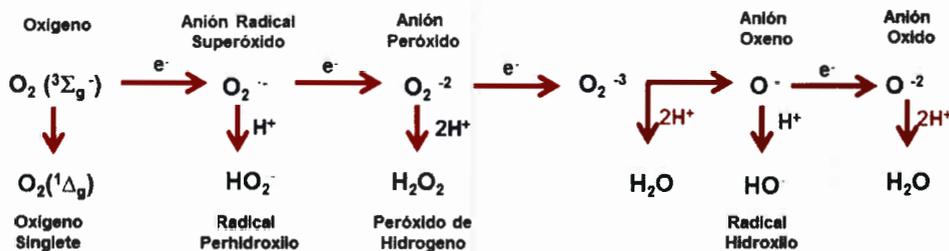
De los estados electrónicamente excitados de oxígeno, puede decirse que si bien se conoce^{99,100} que $O_2(^1\Sigma_g^+)$ presenta reactividad frente a algunas moléculas, $O_2(^1\Delta_g)$ constituye el estado excitado de mayor participación en reacciones con una gran variedad de moléculas, muchas de las cuales pertenecen a biomoléculas de gran importancia.^{101,102} En la siguiente sección se discutirá en mayor profundidad éste aspecto.

I-3.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs)

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) se definen como una serie de moléculas derivadas de oxígeno, que se caracterizan por ser muy reactivas. Entre ellas se distinguen especies radiolíticas como el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical oxidrilo (HO^{\bullet}), radical peroxilo (RO_2^{\bullet}) y radical perhidroxilo (HO_2^{\bullet}), y especies no radicalarias como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete ($O_2(^1\Delta_g)$), ácido hipocloroso ($HOCl$) y ozono (O_3). La razón por la que estas especies son muy reactivas puede atribuirse a su gran poder oxidante, o bien a que son especies radicalarias. Por definición, un radical es una especie que existe en estado independiente y posee uno o más electrones desapareados. Dado que los electrones tienden a estar más estables apareados en un

orbital, las especies radicalarias tienden a ser más reactivas. En este sentido, dos radicales pueden reaccionar aportando sus electrones para formar un enlace covalente, o pueden reaccionar con especies no radicalarias. En este último caso, el radical puede tomar un electrón desde la molécula y completar el par, donar su electrón o unirse a ella. Una característica común de estas reacciones es que siempre se forma un radical y suelen seguir mecanismos de reacción en cadena.¹⁰³

Desde un punto de vista netamente químico, la formación de estas EROs ocurre por reducción secuencial del oxígeno mediante reacciones de transferencia de electrones al mismo, generando de esta manera anión radical superóxido, peróxido de hidrógeno y/o radical hidroxilo (Esquema 2).¹⁰⁴



Esquema 2: Generación de diferentes EROs por transferencia de energía o por reducción secuencial de oxígeno.

A su vez, existen otros procesos que dan lugar a la formación de especies no radicalarias como $O_2({}^1\Delta_g)$, que serán comentados a continuación.

Teniendo en cuenta que este trabajo de tesis se encuentra orientado a los sistemas biológicos, en la siguiente sección se describirán los procesos de formación y reactividad de radical anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, específicamente a nivel celular. Por su parte, ya que dentro de los objetivos de este trabajo se encuentra el estudio de los procesos de fotodegradación sensibilizada de los sistemas Andb, HSA y Andb-HSA, mediados por $O_2({}^1\Delta_g)$, la descripción de las características, generación, desactivación y detección se realizará en mayor detalle en una sección especialmente dedicada a esta ERO.

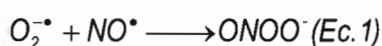
I-3.2.1. Anión Radical Superóxido:

El anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se forma en la célula principalmente durante el proceso de respiración celular en las mitocondrias.^{105,106} En este proceso, ocurre la transferencia de electrones a través de un complejo de proteínas asociadas a la membrana interna de la mitocondria, denominado cadena transportadora de electrones. Recientemente, se ha demostrado la generación de $O_2^{\cdot-}$ a través de estos complejos proteicos.^{107,108} Entre ellos se encuentran el complejo I (Nicotinamida adenina dinucleótico reducido co-enzima Q reductasa, NADH coQ reductasa), el complejo II (succinil dehidrogenasa) y el complejo III (ubiquinol citocromo c reductasa). Aparentemente, los electrones que están involucrados en la cadena respiratoria se escapan de los transportadores y llegan al oxígeno, reduciéndolo hasta $O_2^{\cdot-}$.

Existen algunas enzimas que también contribuyen a la formación de $O_2^{\cdot-}$. Un ejemplo son las enzimas Nox, un complejo de proteínas denominadas NADPH oxidasas.¹⁰⁹ Estas enzimas actúan mediante estímulos celulares transfiriendo electrones al oxígeno, formando $O_2^{\cdot-}$ como producto. Estas enzimas son primordiales en el sistema defensivo frente a microorganismos en leucocitos, en células del tejido endotelial vascular, en células musculares y en fibroblastos.¹¹⁰

Por otro lado, algunas moléculas como glucosa se pueden oxidar en presencia de oxígeno, transfiriéndole un electrón y dando origen al radical $O_2^{\cdot-}$. Este hecho se relaciona con los escenarios de estrés oxidativo característicos en los pacientes diabéticos, cuyos tejidos se encuentran expuestos a altas concentraciones de glucosa por largos períodos de tiempo.¹¹¹ Los tioles también se pueden oxidar en presencia de oxígeno, generando radicales de azufre, $O_2^{\cdot-}$ y OH^{\cdot} . Este proceso se favorece a pH alcalino y en presencia de iones metálicos como los iones de cobre e iones de hierro.^{112,113}

A pesar de su naturaleza radicalaria, $O_2^{\cdot-}$ no presenta una gran reactividad en solución acuosa.¹¹⁴ Sin embargo, su poder reactivo se encuentra, en la selectividad con que reacciona.¹¹⁵ Por ejemplo, $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con el radical NO^{\cdot} para formar peroxinitrito ($ONOO^-$):

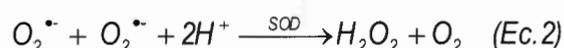


Este producto se protona rápidamente a pH fisiológico para formar ácido peroxinitroso ($ONOOH$), un agente altamente oxidante que es capaz de reaccionar con ADN, proteínas y otras biomoléculas importantes.¹¹⁶ Además, se sabe que $O_2^{\cdot-}$ inactiva algunas enzimas que son importantes en el metabolismo de aminoácidos y en la producción de energía. Estas enzimas son complejos de Fe-S, que al ser inactivadas u oxidadas por $O_2^{\cdot-}$ liberan iones Fe al medio.¹¹⁵ De esta

manera, estos iones pueden quedar disponibles para participar en la reacción Fenton, que será detallada más adelante. De esta manera, la importancia de la formación de $O_2^{\cdot-}$ en las células proviene de las transformaciones potenciales que este radical puede tener en especies mucho más reactivas. A continuación se detallará la generación y características de otras EROs y su relación con $O_2^{\cdot-}$.

I-3.2.2. Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2)

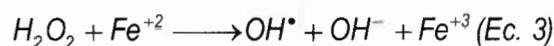
En las células, la mayor parte de H_2O_2 se forma a través de la reacción catalizada por la enzima Superóxido Dismutasa (SOD). Su función es la desactivación específica de $O_2^{\cdot-}$ formando como productos O_2 y H_2O_2 , tal como se muestra en la siguiente reacción:



A pesar de ser un producto de desactivación de otra especie (el anión radical superóxido), la producción de H_2O_2 es importante porque también cumple con algunas funciones fisiológicas en la célula. No solo en la defensa inmune frente a agentes patógenos sino que además se sabe que es necesario como co-factor de la tiroperoxidasa, una enzima importante en la etapa final de síntesis de la hormona tiroides.¹¹⁷ Otras fuentes generadoras de H_2O_2 son ciertas enzimas involucradas en el empaquetamiento de proteínas en el retículo endoplasmático de células eucariotas, como es el caso de la disulfuro polimerasa y oxidoreductina 1. Su función es catalizar reacciones de transferencia de electrones empleando flavina adenina dinucleótido (FAD) y oxígeno, donde éste último actúa como aceptor final de los electrones produciendo H_2O_2 .¹¹⁸

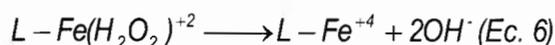
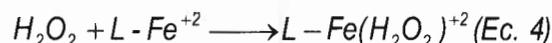
Por otro lado, se ha sugerido la formación de H_2O_2 mediante una reacción catalizada por la enzima xantín-oxidasa a partir de H_2O y O_2 .¹¹⁹

H_2O_2 se caracteriza por ser una especie poco reactiva debido a que no es radicalaria. Sin embargo, al igual que $O_2^{\cdot-}$, es selectivo en su reactividad. Por ejemplo, en presencia de iones $Fe(II)$ es capaz de generar una especie mucho más reactiva mediante una reacción conocida como reacción Fenton:¹²⁰



Existen muchas evidencias experimentales que indican que la reacción ocurre con el ion $Fe(II)$ acomplejado a un ligando (L), que puede ser una molécula de EDTA, fosfato o algún quelante

biológico. En este mecanismo se ha propuesto la formación de un intermediario “peróxido-ferroso” que aún se encuentra acomplejado al ligando: ¹²¹



Como se puede observar, el intermediario $L-Fe(H_2O_2)^{+2}$ puede generar el radical OH^\bullet (Ec. 5) o el anión hidroxilo (Ec. 6). Las velocidades con que pueden ocurrir estos procesos y en consecuencia la producción de radical OH^\bullet , dependerán por un lado de la accesibilidad del H_2O_2 y por ende de la naturaleza del quelante, como también del pH del medio.

Otra reacción en la que participa H_2O_2 es la llamada reacción *Haber-Weiss*, un ejemplo específico de la reacción Fenton en la que también se involucra el radical $O_2^{\bullet-}$:



Esta reacción también puede ser catalizada por $Cu(I)$ y es una de las reacciones que (como se indicó previamente) le otorga al $O_2^{\bullet-}$ una potencial toxicidad debido a la formación de OH^\bullet .

También se ha observado que mediante la acción de la enzima mieloperoxidasa, H_2O_2 puede interactuar con Cl^- para formar ácido hipocloroso ($HClO$), una especie muy oxidante implicada en el sistema inmune del organismo.¹²²

Por otro lado, se sabe que la acumulación de H_2O_2 puede ser dañina porque es capaz de causar destrucción a nivel de ácidos nucleicos (ADN) y membranas celulares por liberación de iones Ca^{+2} en el interior celular, lo que activa el funcionamiento de nucleasas y proteasas dependientes de este ion.¹²³

1-3.2.3. Radical Hidroxilo (OH^\bullet)

El radical hidroxilo (OH^\bullet) se puede formar en medios biológicos por absorción de radiación de alta energía de las moléculas de agua. Existe una ruptura homolítica a nivel del enlace $OH-H$ que genera los radicales H^\bullet y OH^\bullet . Sin embargo, las fuentes más importantes de radical OH^\bullet son la reacción Haber-Weiss y la reacción Fenton (Ec. 7 y Ec. 3, Introducción, sección 1-3.2.2).

OH^\bullet es conocido como una de las especies más reactivas en los organismos vivos. Puede reaccionar fácilmente con proteínas y ácidos nucleicos, combinándose y formando otras especies



radicalarias.¹²⁴ Es tan reactivo que una vez generado *in vivo*, presenta un tiempo de vida que se encuentra en la escala de los microsegundos.¹⁰³ Además, OH^\cdot es capaz de abstraer hidrogeno, por ejemplo, de los carbonos de cadenas de ácidos grasos poliinsaturados, reacción más conocida como peroxidación. Las cadenas carbonadas de los fosfolípidos de las membranas celulares son blancos muy comunes de OH^\cdot . Estas reacciones dan lugar a la formación de los radicales centrados en el carbono, que a su vez, pueden combinarse con oxígeno para dar los radicales peroxilo. Estos pueden iniciar una reacción en cadena que ataca a las cadenas carbonadas adyacentes causando un gran daño oxidativo en los sistemas biológicos. Incluso, puede abstraer hidrogeno de los grupos tioles reducidos. Estos a su vez, se pueden combinar con oxígeno y formar especies sulfuradas (RSO^\cdot y RSO_2^\cdot) de naturaleza radicalaria, que son muy importantes a nivel celular por su potencial efecto destructivo.¹²⁵⁻¹²⁷

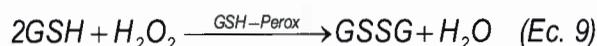
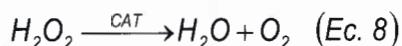
I-3.3. BALANCE REDOX

Tal como fue indicado anteriormente, se ha propuesto que las EROs cumplen importantes funciones en determinados procesos fisiológicos y por tal motivo son importantes para el funcionamiento normal de la célula. Entre algunos de los ejemplos, se sabe que O_2^\cdot y H_2O_2 intervienen en la fisiología vascular normal, regulando el diámetro vascular en respuesta a factores ambientales de estrés.¹²⁸ Por otro lado, en situaciones de hipoxia se liberan EROs que funcionan como señalizadores celulares que desencadenan una serie de respuestas funcionales que tienden a subsanar dicha situación.¹²⁹ Además, las EROs participan en la respuesta inflamatoria que desactiva a patógenos, siendo de esta manera una herramienta fundamental del sistema inmune.¹³⁰ También se sabe que las EROs participan como señalizadores químicos en la regulación génica y en la transcripción de determinados genes mediante la estabilización de cromatina.¹³¹ Estos son sólo algunos ejemplos de la función que cumplen estas especies en procesos fisiológicos importantes.

Sin embargo, también se ha relacionado a las EROs en el desarrollo de determinados cuadros patológicos. En condiciones de altas concentraciones de glucosa, como ocurre en el caso de la resistencia a insulina y la diabetes, se sabe que existe un incremento en la producción de EROs a través de diferentes mecanismos bioquímicos, como la autooxidación de gliceraldehidos, activación de proteínquinasa C, producción de sorbitol y metilglioxal y fosforilación oxidativa.¹³² Este incremento desmedido en EROs afecta principalmente a las células secretoras de insulina (células beta del páncreas).¹³³ Por otro lado, se sabe que las EROs están vinculadas al desarrollo

de cáncer a través no sólo de la generación de mutaciones en el material genético o activación de oncogenes, sino que también se ha comprobado que actúan como señalizadores químicos que permiten el desarrollo de la carcinogénesis.¹³⁴ En el caso de la hipertensión, recientes investigaciones han indicado que cantidades anormales de $O_2^{\cdot-}$ pueden causar una reducción en la biodisponibilidad de óxido nítrico que funciona como vasodilatador. También se sabe que un exceso de EROs puede causar efectos tóxicos sobre las células del cerebro, estando así relacionadas con enfermedades como Parkinson y mal de Alzheimer.¹³⁵

Como puede observarse, las EROs son importantes para que una gran variedad de procesos fisiológicos puedan ocurrir normalmente, pero también pueden ser realmente nocivas para el organismo. Es por ello que un verdadero equilibrio en las concentraciones de EROs resulta vital. Por este motivo, las células cuentan con sistemas de control que les permiten mantener un equilibrio en las concentraciones de EROs. El mecanismo de defensa principal está representado por un conjunto de enzimas denominadas Catalasa (CAT), Glutación Peroxidasa (GSH) y Superóxido Dismutasa (SOD).¹²³ Las dos primeras desactivan a H_2O_2 (Ec. 8 y Ec. 9) mientras que la última desactiva a $O_2^{\cdot-}$ (Ec. 2, Introducción, sección I-3.2.2). Las reacciones involucradas en la desactivación de H_2O_2 son las siguientes:



SOD comienza con el ciclo de atenuación dismutando $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . Seguidamente, CAT desactiva a H_2O_2 formando agua y oxígeno (Ec. 8) y/o Glutación peroxidasa (GSH-perox) puede desactivar H_2O_2 produciendo agua,¹³⁶ (Ec. 9) con la consecuente oxidación de Glutación reducido (GSH) a oxidado (GSSG). Se ha propuesto que GSH es más eficiente en esta desactivación ya que se encuentra en los mismos compartimientos celulares (citósol y mitocondria) que SOD. Otra defensa primaria frente a EROs es la existencia de proteínas que acomplejan Fe (Transferrina) o proteínas del suero como albúmina, que acomplejan Cu. Estas proteínas poseen una alta afinidad por dichos metales, de manera que su existencia en el plasma como iones libres se reduce al mínimo.^{31,137} De esta manera, la posibilidad de catalizar la reacción con H_2O_2 y formar OH^{\cdot} se encuentra minimizada (reacción Fenton).

Por otro lado, existen mecanismos secundarios de defensa que involucran la participación de compuestos denominados antioxidantes, que son capaces de reaccionar con las EROs y atenuarlas en productos no dañinos. Un ejemplo es la existencia de α -tocoferol (Vitamina E), un

compuesto natural liposoluble que se encuentra en membranas celulares y en lipoproteínas del plasma, que funciona como un antioxidante de cadena abierta. Su reacción con especies radicalarias (por ejemplo derivadas de la lipoperoxidación) da lugar a la formación de un radical que es poco reactivo. Se ha propuesto además, que dicho radical puede regenerar α -tocoferol mediante su reacción con ácido ascórbico (Vitamina C) o GSH.¹³⁸ Otros compuestos también se caracterizan por su capacidad antioxidante. Entre ellos se encuentran los carotenos, ácido úrico y polifenoles.

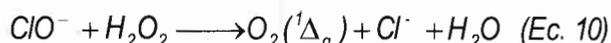
I-3.4. Oxígeno SINGLETE $O_2(^1\Delta_g)$

I-3.4.1. Generación de $O_2(^1\Delta_g)$

La generación de esta especie a nivel celular puede ocurrir a través de procesos químicos o por sensibilización, que se comentarán a continuación.

I-3.4.1.a. Procesos Enzimáticos

Dentro de los procesos químicos no sensibilizados se encuentran las reacciones catalizadas por enzimas como mieloperoxidasa y eosinofilo peroxidasa,¹³⁹⁻¹⁴¹ presentes en ciertos tipos celulares como eosinófilos¹⁴² y macrófagos.¹⁴³ En el caso específico de la reacción catalizada por mieloperoxidasa, H_2O_2 y ácido hipocloroso reaccionan como se muestra en la siguiente ecuación:

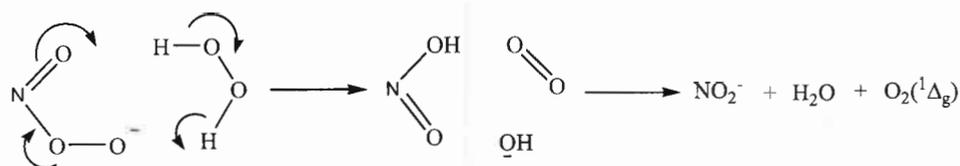


La producción de $O_2(^1\Delta_g)$ ocurre a partir del anión peróxido de cloro ($ClOO^-$) que es un intermediario en la reacción. La generación de esta especie a través de estos procesos se encuentra ligada al sistema de defensa celular frente a agentes patógenos.

I-3.4.1.b. Reacción de H_2O_2 con peroxinitrito

H_2O_2 también puede reaccionar con peroxinitrito (Esquema 3),¹⁴⁴ un compuesto biológico formado por interacción de los radicales $O_2^{\cdot-}$ y NO^{\cdot} (Ec. 1, Introducción, sección I-3.2.1), para formar $O_2(^1\Delta_g)$.

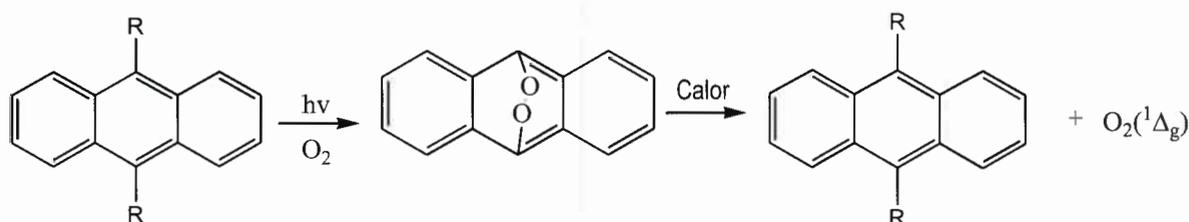
Los estudios de esta reacción sugieren que $ONOO^-$ reacciona en su configuración *cis* con H_2O_2 en un mecanismo concertado.



Esquema 3: Mecanismo de reacción de peroxinitrito (ONOO^-) con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para la formación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

1.3.4.1.c. Descomposición térmica de endoperóxidos

Los endoperóxidos se forman por reacción de compuestos derivados de antraceno, principalmente con oxígeno, mediante procesos sensibilizados.¹⁴⁵ La descomposición térmica de estos endoperóxidos (Esquema 4) genera $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.¹⁴⁶

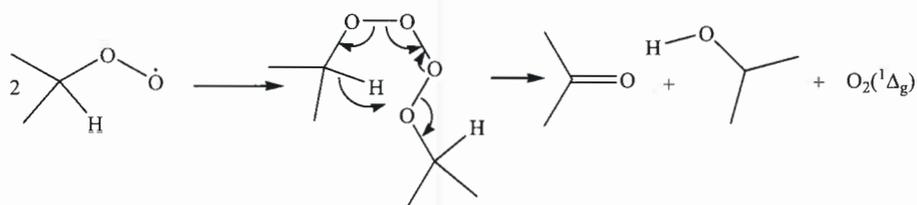


Esquema 4: Formación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por descomposición térmica de endoperóxidos.

Se sabe que la reacción avanza mediante un mecanismo concertado de ruptura de los enlaces C-O. Además, se ha indicado que la mayor parte de la energía de activación de esta reacción es utilizada eficientemente para generar la excitación electrónica y consecuente producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.¹⁴⁶

1.3.4.1.d. Autodescomposición de radicales hidroperoxilo

La autodescomposición de radicales sec-butilhidroperoxilo es capaz de generar $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ como se propone en el siguiente esquema.¹⁴⁷

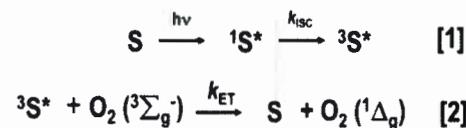


Esquema 5: Formación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por auto-descomposición térmica del radical sec-butil hidroperoxido.

Esta misma reacción también ocurre en el caso de los radicales hidroperoxilo de ácido linoleico. En las células de mamíferos, las membranas celulares y microsomas se encuentran formadas por ácidos grasos insaturados como el linoleico. En presencia de especies radicalarias, dichos ácidos grasos pueden sufrir peroxidación lipídica y generar radicales hidroperoxilo. La autodescomposición de éstos es capaz de producir de esta manera $O_2(^1\Delta_g)$.

I-3.4.1.e. Sensibilización

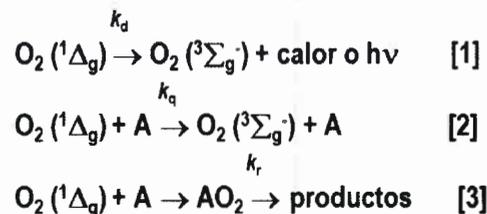
Los procesos sensibilizados para la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ ocurren según se muestra en el Esquema 6. En el proceso [1], el sensibilizador, que generalmente puede ser un colorante o pigmento, es capaz de absorber radiación de una determinada longitud de onda ($h\nu$) produciéndose la especie electrónicamente excitada singlete ($^1S^*$). Esta última, a través de un proceso de inversión de espín o entrecruzamiento de sistema (k_{ISC}), genera la especie electrónicamente excitada triplete ($^3S^*$). Por último, $^3S^*$ transfiere su energía (k_{ET}) al oxígeno ($O_2(^3\Sigma_g^-)$) formando como consecuencia $O_2(^1\Delta_g)$, como se describe en el proceso [2].



Esquema 6: Esquema cinético de la generación fotosensibilizada de $O_2(^1\Delta_g)$. S: sensibilizador; k_{ISC} : constante de velocidad de entrecruzamiento de sistemas; k_{ET} : constante de velocidad de transferencia de energía.

I-3.4.2. Desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$

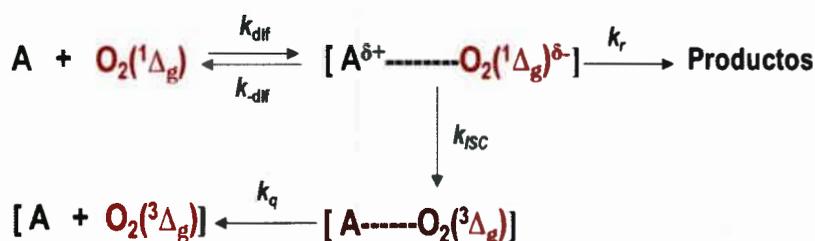
Independientemente de su origen, $O_2(^1\Delta_g)$ puede desactivarse a través de varios procesos tal como se muestra en el siguiente esquema.



Esquema 7: Esquema cinético de los procesos de desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$. A: sustrato fotooxidable. k_d : constante de velocidad de desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ por colisiones con el solvente; k_q constante de velocidad de desactivación física de $O_2(^1\Delta_g)$ por un sustrato A y k_r constante de velocidad de desactivación química de $O_2(^1\Delta_g)$ por un sustrato A.

Como se observa en el Esquema 7, una vez formado, $O_2(^1\Delta_g)$ puede decaer al estado fundamental espontáneamente (k_d , proceso [1]). No obstante, en presencia de un determinado sustrato (A), $O_2(^1\Delta_g)$ también puede desactivarse por vía física (k_q , proceso [2]), química (k_r , proceso [3]), o ambas. Los detalles respectivos a estos procesos de desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ se realizarán más adelante.

En este contexto, es interesante comentar que existen varias evidencias que sugieren un mecanismo en el que $O_2(^1\Delta_g)$ puede ser desactivado por ciertos compuestos al formar un complejo de encuentro (Esquema 8), que posee un carácter parcial de transferencia de carga, en el que $O_2(^1\Delta_g)$ actúa como aceptor de electrones¹⁴⁸.



Esquema 8: Diagrama descriptivo de la formación y reacciones del complejo de encuentro entre $O_2(^1\Delta_g)$ y un sustrato fotooxidable A.

Este complejo de encuentro ha sido propuesto para compuestos como sulfuros,^{149,150} aminas,^{149,150, 151} alquenos,¹⁵¹ índoles,^{152, 153} furanos,¹⁵³ fenoles^{149,154, 155} y éteres enólicos.¹⁵⁶

Gorman *et al.*^{153,155,156} han propuesto que dicho mecanismo ocurre para $O_2(^1\Delta_g)$ con compuestos orgánicos dentro de los límites en los que $k_r \gg k_{ISC}$ (desactivación reactiva) y $k_{ISC} \gg k_r$ (desactivación física). El balance entre estas constantes de velocidad está determinado por la función acoplamiento espín-órbita y factores de entropía. Las evidencias experimentales que favorecen este mecanismo, indican que el complejo de encuentro se forma en un equilibrio rápido y reversible.

Por otro lado, dado el carácter de separación de cargas que se ha planteado para el complejo de encuentro que se forma, es importante considerar que su formación tendrá una gran dependencia con la capacidad dadora de electrones del sustrato, puesto que este factor podría modificar las restricciones de entropía del estado de transición, como los requerimientos de reorganización del solvente.

I-3.4.2.a. Desactivación espontánea

$O_2(^1\Delta_g)$ decae al estado fundamental de manera espontánea, mediante un proceso radiativo o no radiativo (proceso [1] del Esquema 7).

I-3.4.2.b. Desactivación física de $O_2(^1\Delta_g)$

Este tipo de desactivaciones (proceso [2] del Esquema 7) ocurre a través de un mecanismo de transferencia de energía de $O_2(^1\Delta_g)$ a un sustrato determinado (polienos y compuestos altamente conjugados^{149,150}). Esta vía está permitida por espín y solo se requiere que el sustrato posea una energía de triplete menor a 22,5 Kcal/mol.

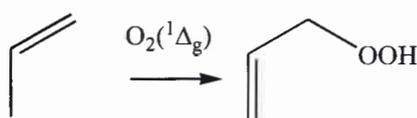
I-3.4.2.c. Desactivación reactiva de $O_2(^1\Delta_g)$

En este tipo de desactivaciones, $O_2(^1\Delta_g)$ reacciona químicamente con el sustrato (k_r , proceso [3] del Esquema 7). Los electrones de $O_2(^1\Delta_g)$ están apareados en un orbital mientras que el otro queda vacío, razón por la que la mayoría de las reacciones químicas que sufre esta especie involucran dos electrones. Así su reactividad es muy similar a la de los compuestos insaturados. Ejemplos de este tipo de reacciones son las adiciones de $O_2(^1\Delta_g)$ a dienos en moléculas orgánicas heterocíclicas para formar endoperóxidos.¹⁵⁷ Aquí cabe señalar las reacciones de cicloadición del tipo [2+2] produciendo dioxetanos, como también cicloadiciones [4+2]. También puede reaccionar con olefinas que contengan átomos de hidrogeno alílicos para formar hidroperóxidos. Estas últimas son típicas en el caso del colesterol y ácidos grasos insaturados. Este tipo de reacciones serán detalladas a continuación.

Reacciones típicas de $O_2(^1\Delta_g)$

❖ Reacciones tipo "eno"

$O_2(^1\Delta_g)$ puede reaccionar uniéndose a olefinas alquílicas, con migración del doble enlace. Como resultado se forman hidroperóxidos alílicos que pueden ser convertidos fácilmente a compuestos carbonílicos α,β insaturados y alcoholes alílicos.¹⁵⁸

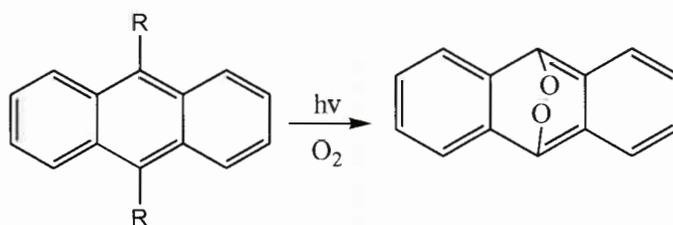


Esquema 9: Reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ con dobles enlaces tipo "eno".

Se han propuesto⁹⁸ varios mecanismos para esta reacción, los que involucran la formación de un "peróxido" o un biradical. Sin embargo, se suele decir que este tipo de reacciones sigue un mecanismo concertado tipo "eno".

❖ Reacciones de cicloadición tipo [4+2]

$O_2(^1\Delta_g)$ puede reaccionar también con alquenos o hidrocarburos aromáticos en las típicas reacciones de cicloadición [4+2], para formar endoperóxidos.

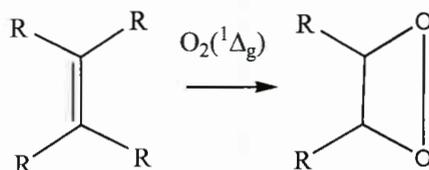


Esquema 10: reacciones de cicloadición [4+2] con $O_2(^1\Delta_g)$.

Se ha postulado que el mecanismo de estas reacciones involucra la formación de un birradical singlete, con la posterior formación del ciclo. Sin embargo, en el caso de aromáticos se ha propuesto que el mecanismo es concertado.¹⁵⁹

❖ Reacciones de cicloadición tipo [2+2]

$O_2(^1\Delta_g)$ puede reaccionar con alquenos por cicloadición tipo [2+2]. En solventes polares, esta reacción favorece la formación de dioxetanos. Además, es una reacción típica de olefinas ricas en electrones.¹⁶⁰⁻¹⁶²



Esquema 11: reacciones de cicloadición [2+2] con $O_2(^1\Delta_g)$.

La mayoría de los dioxetanos formados suelen descomponerse rápidamente a compuestos carbonílicos en una reacción exotérmica que está acompañada de luminiscencia.

Estos mecanismos de desactivación pueden competir entre sí y la velocidad con que ocurra cada uno dependerá de las características del medio como también de la naturaleza del sustrato.

Teniendo en cuenta que en los objetivos de este trabajo de tesis se encuentra el estudio de la influencia de HSA en los procesos de degradación mediada por $O_2(^1\Delta_g)$ de Andb, a continuación se describirán brevemente algunos ejemplos de las reacciones típicas de $O_2(^1\Delta_g)$ que fueron presentadas en la sección anterior, con compuestos de importancia biológica como aminoácidos y proteínas.

Ejemplos de reacciones típicas de $O_2(^1\Delta_g)$ con sustratos de importancia biológica

$O_2(^1\Delta_g)$ puede reaccionar con biomoléculas fundamentales como ADN, lípidos, colesterol, proteínas y aminoácidos. Una aplicación actual en medicina que emplea estas propiedades reactivas de $O_2(^1\Delta_g)$ es la terapia fotodinámica (PDT: *Photodynamic Therapy*).¹⁶³ En ella, se utiliza a esta ERO como agente capaz de eliminar células cancerosas. A pesar de existir muchos avances sobre las posibles aplicaciones de esta terapia, se sigue investigando respecto de algunos detalles que se necesita mejorar, como las estrategias de generación de esta ERO en las células y los métodos de reconocimiento de las células "blanco".¹⁶⁴

Un aspecto muy importante que debe tenerse en cuenta en los estudios relacionados a la reactividad de $O_2(^1\Delta_g)$ con moléculas de interés biológico, es que el comportamiento de esta especie en el medio celular puede ser muy diferente del que se conoce en solución. Es por ello que en los últimos tiempos ha crecido el interés en las investigaciones sobre la reactividad y características de $O_2(^1\Delta_g)$ en medios celulares.^{163,165-167} Un conocimiento que surge como ejemplo, a partir de dichos estudios, es la existencia de una gran heterogeneidad espacial y temporal que controla los parámetros de difusión y tiempo de vida (τ_Δ) de $O_2(^1\Delta_g)$.¹⁶⁸ En principio, se había indicado que el τ_Δ en medios celulares podía estar entre los 10-300 ns, valores razonables bajo la hipótesis de que en la célula se concentran una gran variedad de agentes desactivadores de esta especie. Sin embargo, estudios recientes han determinado valores de τ_Δ mucho mayores (entre 1-3 μ s para $O_2(^1\Delta_g)$ generado en células cultivadas en medios acuosos).¹⁶⁹ A partir de estos resultados se puede observar que $O_2(^1\Delta_g)$ en la célula no es desactivado tan eficientemente y que los agentes desactivantes no se encuentran en tan altas concentraciones como se creía.¹⁷⁰

❖ Reacciones de $O_2(^1\Delta_g)$ con aminoácidos y proteínas

Se sabe que las proteínas son un blanco muy común para $O_2(^1\Delta_g)$ debido a su gran abundancia, a la existencia de grupos cromofóricos en las estructuras proteicas y a sus altas velocidades de reacción con esta especie.^{171,172}

En este contexto, existen varias investigaciones enfocadas en la fotodegradación sensibilizada de aminoácidos y proteínas, a partir de las cuales se ha determinado que los aminoácidos que pueden interactuar considerablemente con $O_2(^1\Delta_g)$ son Tyr, Trp, His, Met y Cys (Figura 42, Apéndice, sección V-1).¹⁷³⁻¹⁷⁷ Los mecanismos y cinética de fotodegradación de los mismos presentan una gran dependencia con el sensibilizador, las concentraciones de las especies involucradas, el solvente y el pH.¹⁷⁸ Desde el punto de vista químico, puede decirse que cada uno de estos cinco aminoácidos pertenece al grupo de compuestos químicos que son susceptibles a intervenir en reacciones fotosensibilizadas: tioles, sulfuros, imidazoles, indoles y fenoles.¹⁷⁸ Si bien las reacciones comienzan en estos centros reactivos, se sabe que también pueden ocurrir reacciones a oscuras que incluyen la participación de los grupos amino y carboxilo de estos aminoácidos.¹⁷⁸ A continuación se comentarán algunos detalles que se conocen respecto de las reacciones de $O_2(^1\Delta_g)$ con cada uno de estos aminoácidos.

❖ Reacciones con Triptófano (Trp)

La degradación de Trp por $O_2(^1\Delta_g)$ produce una mezcla compleja de productos que depende de las condiciones de reacción. La reacción inicial de $O_2(^1\Delta_g)$ con Trp puede generar como intermediarios un dioxetano formado por adición al doble enlace de los carbonos C2 y C3 del anillo indol de Trp y un hidroperóxido por unión al C3.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ La descomposición por ruptura de los enlaces C2-C3 de estos intermediarios genera N-formilcirunenina, mientras que por cierre de ciclo se forma 3 α -Hidroperoxipirrolindol y 3 α -Hidroxipirrolindol.

Los principales productos de esta reacción son N-formilcirunenina y cinurenina, los cuales han sido detectados como productos de reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ con Trp libre y en proteínas.¹⁷⁹ Estos productos son fotosensibilizadores muy eficientes de $O_2(^1\Delta_g)$, de manera que una vez iniciada la reacción con Trp, una exposición prolongada a la radiación podría generar un incremento en las concentraciones de $O_2(^1\Delta_g)$.¹⁸² En investigaciones previas se pudo determinar un valor de $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la constante de velocidad de reacción de Trp con $O_2(^1\Delta_g)$ (k_r), en agua.¹⁸³ Sin embargo, estos estudios también indicaron que la componente física (k_q) es la mayor contribuyente a la desactivación de esta ERO por Trp. De esta manera se cree que Trp juega un papel muy

importante en la protección de las proteínas frente a $O_2(^1\Delta_g)$. Sin embargo, un aspecto no favorable de la interacción reactiva de Trp con esta especie es la inevitable formación de N-formilcinurenina y cinurenina, que a su vez son buenos sensibilizadores de $O_2(^1\Delta_g)$.

❖ Reacciones con Tirosina (Tyr)

La reacción de Tyr con $O_2(^1\Delta_g)$ ocurre en el anillo fenólico del aminoácido, especialmente desde su forma aniónica. Es por ello que la velocidad de reacción depende en gran medida del pH del medio. Si bien el anillo fenólico también reacciona en su forma protonada, la velocidad con que lo hace es mucho menor a las velocidades con que reaccionan otros aminoácidos¹⁸⁴ e incluso se ha reportado que la desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ en estas condiciones es netamente física.¹⁸³

El principal producto de reacción de Tyr con $O_2(^1\Delta_g)$ es el ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-2,3,3 α ,6,7,7 α -hexahidro-1H-indol-2-carboxílico (HOHICA). En la reacción se ha sugerido que en primer lugar se forma un endoperóxido inestable que produce rápidamente hidroperóxidos. Estos se caracterizan por ser muy inestables térmicamente, por lo que a temperatura ambiente se descomponen y forman HOHICA.¹⁸⁵ Posteriormente, se ha reportado que este producto puede oxidarse para formar ceto-compuestos descarboxilados.

En el caso de la reacción de Tyr con $O_2(^1\Delta_g)$ en péptidos, se estima que el proceso donde se cierra el ciclo para formar HOHICA es mucho más lento, debido a que la participación del N en el enlace peptídico lo vuelve menos nucleofílico para que ocurra la reacción de ciclación. Por ello, el principal producto de reacción con $O_2(^1\Delta_g)$ en estos casos es el hidroperóxido que luego se descompone para formar el correspondiente alcohol.

❖ Reacciones con Histidina (His)

La reacción de His con $O_2(^1\Delta_g)$ ocurre en el anillo imidazol del aminoácido, mediante la formación de uno o varios endoperóxidos que pueden descomponerse para formar finalmente una mezcla compleja de productos entre los que se encuentran ácido aspártico, urea y derivados de asparragina.^{186,187} Estas reacciones implican la ruptura de la estructura cíclica y se ha propuesto que ocurre mediante un mecanismo radicalario.¹⁸⁸

Por otro lado, se sabe¹⁸⁹ que la velocidad de reacción aumenta con el pH y que en solución acuosa a pH 7,1 el valor de k_r es de $3,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Debido a que los pasos iniciales de la reacción no implican la participación del grupo α -amino que se encuentra involucrado en la unión peptídica, se cree que este mecanismo de reacción podría ser el que ocurre para His en proteínas.¹⁷¹

Por otro lado, estudios previos han develado un aumento en la componente de desactivación física (k_q) cuando His forma dipéptidos. Es por ello que His resulta menos expuesta a posibles fotooxidaciones cuando se encuentra unida a otros aminoácidos.¹⁹⁰

❖ Reacciones con Metionina (Met)

El valor de k_r de la reacción¹⁸⁹ de Met con $O_2(^1\Delta_g)$ es de $0,86 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,1. Además, se sabe¹⁷¹ que la estequiometría depende fundamentalmente del pH, siendo 1:1 a pH fisiológico.

Se ha propuesto que el mecanismo de la reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ con Met libre a pH <6 produce una especie zwitterónica que luego puede reaccionar con otra molécula de Met generando dos moles de sulfóxido (Ec. 11).¹⁹¹



También se ha indicado que a pH >7 y en presencia de ciertos sensibilizadores, se forma un intermediario con una estructura cíclica formada por N y S, que luego se descompone para generar Met=O y H_2O_2 . En general, un aspecto interesante del comportamiento reactivo de este aminoácido, es el que las desactivaciones de $O_2(^1\Delta_g)$ ocurren exclusivamente por vías reactivas a pH neutro.¹⁹⁰

Respecto del comportamiento del aminoácido en proteínas o péptidos, es posible afirmar que las reacciones antes propuestas serán únicamente posibles en Met libre, ya que la reacción implica el grupo amino que participa en el enlace peptídico. Además, en estudios con dipéptidos de Met se ha encontrado una mayor reactividad para Met como aminoácido libre respecto de los dipéptidos.¹⁹⁰

❖ Reacciones con Cisteína (Cys)

La reacción con Cys presenta una fuerte dependencia con el pH e involucra la generación de disulfuro y ácido cisteico, entre otros productos que todavía no han sido caracterizados.^{174,192,193}

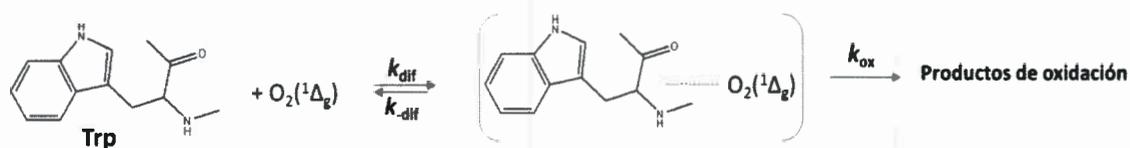
Por otro lado, se cree que el rendimiento de estos productos puede variar dramáticamente desde Cys libre a Cys en proteínas, donde existen impedimentos estéricos bastante importantes.¹⁶⁸

Tal como fue indicado anteriormente en algunos casos, se puede observar que la reactividad de los aminoácidos incorporados a proteínas frente a $O_2(^1\Delta_g)$ puede ser diferente de la reactividad del aminoácido libre. Con excepción de los que se encuentran en los extremos terminales de la proteína, todos los aminoácidos poseen sus grupos carboxilo y amino bloqueados en los enlaces correspondientes en la cadena polipeptídica, modificando de esta manera su susceptibilidad frente a las reacciones con $O_2(^1\Delta_g)$. Además, el entorno que la proteína le proporciona a los aminoácidos también puede influenciar su comportamiento reactivo, dependiendo del nivel de exposición que posea en la estructura tridimensional de la proteína.¹⁹⁴

Las reacciones de $O_2(^1\Delta_g)$ con los aminoácidos de una proteína pueden llegar a causar serios daños, específicamente en sus funcionalidades. En este sentido, es importante recordar la estrecha relación estructura-función que existe en las proteínas. Si bien se sabe que las fotodegradaciones mediadas por $O_2(^1\Delta_g)$ no han reportado rupturas a nivel de los enlaces peptídicos, se ha indicado pérdida de actividad enzimática debido a la reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ con aminoácidos de sitio activo.¹⁹⁵ Otros ejemplos son el aumento en la sensibilidad térmica de proteínas fibrosas luego de intervenir en reacciones de fotooxidación, modificaciones conformacionales, cambios en la difusión y solubilidad, entre otros.¹⁷⁴ La extensión en el daño causado por las reacciones con $O_2(^1\Delta_g)$ dependerá de la reactividad de los aminoácidos que puedan ser claves en el mantenimiento de la estructura proteica.

Por otro lado, es importante destacar la existencia de endoperóxidos que pueden generarse por reacción de Tyr, His y Trp con $O_2(^1\Delta_g)$ en proteínas bajo irradiación sensibilizada de una variedad de moléculas. Tal como fue comentado anteriormente, estos endoperóxidos a su vez, pueden descomponerse para formar radicales que aumentan el daño local. Además, al ser formados sobre las complejas estructuras de las proteínas, que brindan un mayor ocultamiento e impedimentos estéricos, estos peróxidos tienen distinta accesibilidad y en consecuencia, una reactividad diferente. Es por ello que no pueden ser removidos tan fácilmente y por tanto, tienen tiempos de vida relativamente largos en la célula.¹⁹⁶

En este contexto, resulta interesante volver a la discusión que se realizó en la sección anterior respecto del comportamiento particular que $O_2(^1\Delta_g)$ posee en los entornos celulares. En recientes investigaciones se estudió la reactividad de esta ERO con residuos de Trp ubicados en entornos muy diferentes en determinadas proteínas.^{197, 168} Los resultados fueron interpretados en función del siguiente esquema:



Esquema 12: Mecanismo propuesto para la reacción de Trp en proteínas con $O_2(^1\Delta_g)$ por formación de complejo de encuentro. k_{dif} : constante de velocidad difusional; k_{-dif} : constante de velocidad de ruptura del complejo de encuentro; k_{ox} : constante de velocidad de formación de productos oxidados.

Teniendo en cuenta la expresión de la constante de velocidad de reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ que resulta del modelo propuesto en el Esquema 12, (k_r):

$$k_r = \frac{k_{dif} k_{ox}}{k_{-dif} + k_{ox}} \quad (\text{Ec. 12})$$

se establecen dos situaciones claras: cuando $k_{ox} \gg k_{-dif}$, se tiene que $k_r \sim k_{dif}$ y se dice que la velocidad de reacción se encuentra en el límite difusional. En estos casos se ha indicado que debido al carácter de transferencia de carga que el complejo de encuentro posee, uno de los factores que más influye en la velocidad de reacción global es la polaridad del entorno y cómo la presencia de ciertos aminoácidos puede afectar la distribución de carga del complejo de encuentro. Aquellas proteínas que poseen residuos aminoácidos que proporcionan un entorno más polar son las que presentaron mayor reactividad.¹⁹⁷

Por otro lado, cuando $k_{ox} \ll k_{-dif}$, se tiene que $k_r \sim k_{ox} \cdot (k_{dif}/k_{-dif})$, es decir que la magnitud de la constante de reacción (k_r) está modulada por la constante de equilibrio difusional y el sistema se encuentra en condiciones de "pre-equilibrio".^{197,198} En este caso, se ha propuesto que cambios en la viscosidad local como así también la accesibilidad de Trp a $O_2(^1\Delta_g)$ son los factores que afectan la velocidad de reacción.

De esta manera, puede decirse que la cinética de reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ se encuentra muy influenciada por el entorno que la biomolécula le ofrece respecto de la polaridad, viscosidad y accesibilidad de sus residuos aminoácidos reactivos.¹⁹⁸

I-3.4.3. Detección de $O_2(^1\Delta_g)$

Una de las formas de detectar $O_2(^1\Delta_g)$ consiste en la utilización de moléculas atraparoras de dicha especie, que forman productos de oxidación característicos.¹⁵⁷ Un ejemplo que es muy aplicable en medios biológicos es el uso de colesterol, que forma 5- α -hidroperóxido, como único producto. También suelen utilizarse ciertas aminas que producen compuestos n-oxil en un mecanismo a oscuras,¹⁹⁹ y que pueden detectarse con técnicas de EPR (*Electronic Paramagnetic Resonance*).

Por otro lado, existen compuestos como Azida de sodio (NaN_3), 1,4-diazabicyclo [2,2,2] octano (DABCO), entre otros, que pueden inhibir la reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ con un dado sustrato. La participación de esta ERO puede detectarse cualitativamente si en presencia de estos inhibidores se observa una disminución en la velocidad de reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ con el sustrato en cuestión.²⁰⁰

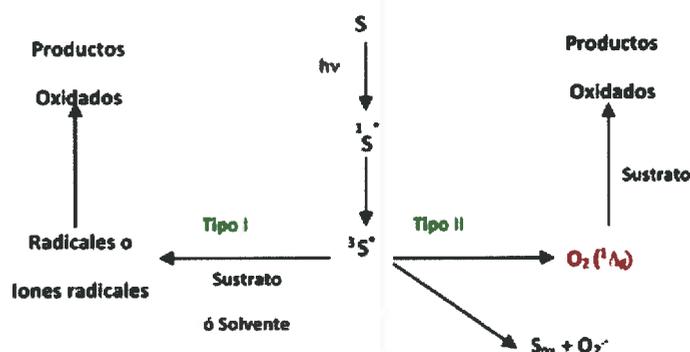
Por último, el método más directo para confirmar la presencia de $O_2(^1\Delta_g)$ consiste en la detección de la señal de fosforescencia a 1270 nm. El perfil del espectro de emisión de fosforescencia de esta especie es único y presenta un máximo localizado a 1275 nm. Una ventaja de este método es que la emisión de fosforescencia de la mayoría de las especies se encuentra localizada a $\lambda < 1000$ nm de manera que la detección a 1270 nm reduce al mínimo las posibles interferencias.¹⁷⁰ A pesar que la señal de fosforescencia es débil en solución debido al corto tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$, es detectable tanto por técnicas en estado estacionario²⁰¹ como por técnicas resueltas en el tiempo.²⁰²⁻²⁰⁵

Dado que en este trabajo de tesis se estudia la degradación sensibilizada de Andb libres y unidos a HSA, a continuación se realizará una descripción general de la cinética y mecanismos de los procesos de fotooxidación sensibilizados. Posteriormente se presentarán las propiedades y características fundamentales de HSA y los Andb utilizados en esta tesis (Introducción, secciones I-3.6 y I-3.8).

I-3.5. Fotooxidaciones sensibilizadas

Los procesos de fotosensibilización ocurren cuando una sustancia química denominada "sensibilizador" o "fotosensibilizador" absorbe radiación e interacciona desde sus estados electrónicamente excitados con otra especie química (transparente a esta radiación), la cual sufre modificaciones fotofísicas o fotoquímicas como resultado de dicha interacción.²⁰⁶

El primer paso de estas reacciones comienza con la generación de la especie singlete electrónicamente excitada del sensibilizador ($^1S^*$), la que a través de un proceso de entrecruzamiento de sistemas (*Intersystem crossing*, ISC) da lugar a la especie triplete electrónicamente excitada ($^3S^*$). En presencia de oxígeno el sensibilizador triplete excitado puede reaccionar por dos caminos competitivos: mecanismos Tipo I o Tipo II.^{157,207} A continuación se explicarán cada uno de estos procesos y las herramientas experimentales a través de las cuales es posible distinguir entre la ocurrencia de uno y otro.



Esquema 13: Diagrama descriptivo de las posibles vías de fotooxidación Tipo I y Tipo II.

I-3.5.1. Mecanismos Tipo I

En este caso, el sensibilizador reacciona directamente con el sustrato o solvente a través de la transferencia de un átomo de hidrógeno o un electrón, dando lugar a especies radicalarias. Estas últimas pueden reaccionar a su vez con oxígeno para generar productos oxidados (Esquema 13). Los sustratos susceptibles a esta vía son aquellos que presentan una mayor facilidad de abstraer hidrógenos, o los que son ricos en electrones, como por ejemplo aminas aromáticas, fenoles, compuestos sulfhidrúlicos.

I-3.5.2. Mecanismos Tipo II

En este mecanismo, el triplete excitado del sensibilizador le transfiere su energía al oxígeno, produciendo $O_2(^1\Delta_g)$, el cual debido a su gran reactividad, es capaz de producir peróxidos y especies oxidadas a través de su reacción con moléculas orgánicas de altas densidades electrónicas, tal como fue discutido previamente (Introducción, sección I-3.4.2.c). Además, la reacción de transferencia de electrones desde el estado electrónicamente excitado triplete del

sensibilizador hacia oxígeno para producir $O_2^{\cdot-}$ también es considerada dentro de este mecanismo (Esquema 13).¹⁵⁷

Una particularidad en este caso es que el solvente juega un rol muy importante desde dos puntos de vista: por un lado, en la influencia que la naturaleza del solvente tiene sobre el tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ ²⁰⁸ y por otro lado, en la distribución de productos que puede resultar, cuando dos o más reacciones compiten por $O_2(^1\Delta_g)$.

I-3.5.3. Metodología para discernir entre reacciones Tipo I y Tipo II

Siempre existe una competencia entre los mecanismos de fotooxidación Tipo I y Tipo II. El que una reacción siga por una vía o por la otra depende del sensibilizador, del sustrato fotooxidable y de las concentraciones relativas de oxígeno, sustrato y sensibilizador. Las reacciones del mecanismo Tipo I son muy dependientes de la concentración. En este sentido se puede notar que si la concentración de oxígeno es alta, como ocurre en los medios biológicos, lo más probable es que las reacciones sigan el mecanismo Tipo II, mientras que si las concentraciones del sustrato son elevadas, lo harán por el mecanismo Tipo I.

Cuando se están estudiando procesos de degradación fotosensibilizada, resulta muy importante conocer a través de qué tipo de mecanismo ocurren, de manera que los resultados obtenidos puedan ser interpretados a la luz de esta información. A continuación, se describirán algunas herramientas metodológicas que pueden ser útiles en el discernimiento del mecanismo de fotooxidación, sobre todo cuando no se cuenta con el equipamiento para la detección de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ a 1270 nm, que es el método más directo para confirmar la participación de esta especie en un proceso de fotooxidación.

I-3.5.3.a. Efecto de desactivadores específicos de $O_2(^1\Delta_g)$

Puede evaluarse el efecto de compuestos inhibidores de $O_2(^1\Delta_g)$ y $O_2^{\cdot-}$ sobre la velocidad de fotooxidación de un dado sustrato. Tal como se mencionó en la sección I-3.4.3, ejemplos de agentes desactivadores para $O_2(^1\Delta_g)$ son 1,4-diazabicyclo [2,2,2] octano (DABCO),²⁰⁹ azida sódica^{172,210} o compuestos carotenoides de más de nueve enlaces dobles.^{211,212} Por su parte, la enzima superóxido dismutasa (SOD) puede ser empleada como inhibidor específico de $O_2^{\cdot-}$.¹²³

I-3.5.3.b. Comparación de las velocidades de fotooxidación en H₂O y D₂O

Para evidenciar la participación de O₂(¹Δ_g) en una reacción, trabajando a concentraciones bajas del sustrato (de manera que éste no afecte el decaimiento de dicha especie), se podrá observar que la velocidad de fotooxidación del sustrato será mayor en D₂O que en H₂O, ya que el tiempo de vida de O₂(¹Δ_g) es mayor en solventes deuterados.¹⁷² Dado que el tiempo de vida de O₂⁻ también es mayor en este solvente,²⁰⁷ esta metodología también puede ser útil para evidenciar la participación de dicha ERO en el proceso de fotooxidación.

I-3.5.3.c. Competencia entre el sustrato fotooxidable y oxígeno por el estado electrónicamente excitado triplete del sensibilizador

Si el sustrato interacciona con el estado electrónicamente excitado triplete del sensibilizador, la presencia de oxígeno puede inhibir dicha reacción. Por su parte, si el oxígeno tiende a interaccionar más fuertemente con el estado triplete del sensibilizador, la formación de O₂(¹Δ_g) predomina y si el sustrato tiende a reaccionar mayormente con esta especie, la velocidad de fotooxidación será independiente de la concentración de oxígeno. De esta manera, para definir entre ambas situaciones se puede realizar un experimento de fotooxidación en las mismas condiciones (sensibilizador, irradiación, concentración del sustrato) en presencia y en ausencia de oxígeno (por ejemplo, bajo atmósfera de nitrógeno o argón) y comparar las velocidades de fotooxidación en cada caso.

I-3.5.4. Sensibilizadores

Los sensibilizadores más comunes incluyen colorantes tales como rosa de bengala, azul de metileno, rodaminas; pigmentos como clorofilas, flavinas, porfirinas; hidrocarburos aromáticos, coenzimas complejos organometálicos, etc. En general, los sensibilizadores más efectivos deben reunir las siguientes características:^{148,213}

I-3.5.4.a. Características de absorción

Los sensibilizadores más efectivos son aquellos que absorben luz en la región visible del espectro electromagnético, en el intervalo comprendido entre los 380 y 900 nm. Por otro lado, la longitud de onda a la cual absorbe el sensibilizador debe ser mayor que la del sustrato y sus coeficientes de extinción molar deben ser mayores para así lograr altas absorbancias a bajas

concentraciones. De esta manera se evita la formación de dímeros o complejos con el sustrato en el estado fundamental.

1-3.5.4.b. Estabilidad fotoquímica

El sensibilizador debe ser fotoestable durante una reacción fotosensibilizada. Sin embargo, en caso de irradiaciones prolongadas, la pérdida de una cierta cantidad del sensibilizador es inevitable. Lo ideal es elegir un sensibilizador que sea estable bajo las condiciones experimentales. Es también muy importante que en el caso de investigar la cinética de fotooxidación de un sustrato mediada por $O_2(^1\Delta_g)$, el sensibilizador sea neutral en el sentido que tanto en su estado fundamental como excitado, no reaccione ni con el solvente ni con el sustrato fotooxidable.

1-3.5.4.c. Solubilidad

El sensibilizador idealmente debe ser soluble en el medio de reacción.

1-3.5.4.d. Rendimiento cuántico de triplete

Dado que la eficiencia en el proceso de obtención de $O_2(^1\Delta_g)$ depende del proceso de transferencia de energía desde el estado triplete electrónicamente excitado del sensibilizador al oxígeno, lo ideal es que el sensibilizador posea un rendimiento cuántico de entrecruzamiento de sistema lo más próximo a la unidad posible, asegurando así una óptima población de estados tripletes.

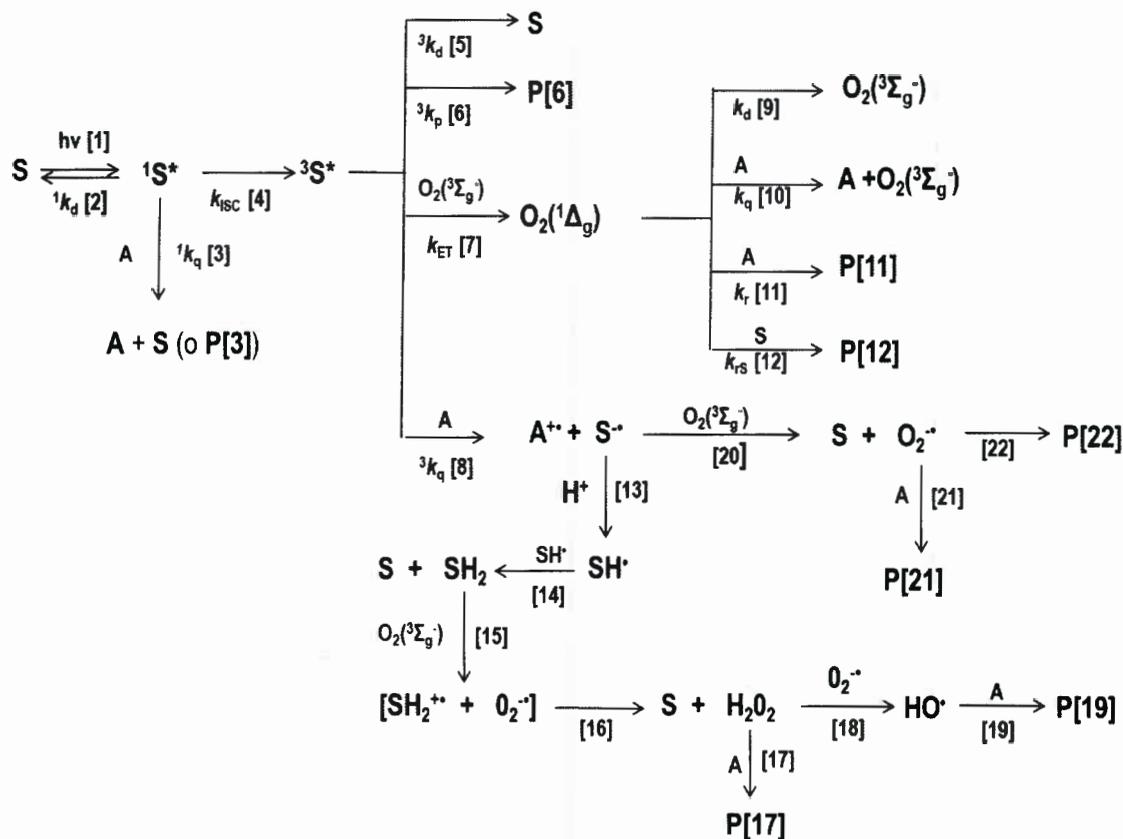
1-3.5.4.e. Velocidad de transferencia de energía

Las constantes de velocidad de transferencia de energía dependen de la diferencia de energía entre el estado triplete electrónicamente excitado del sensibilizador y el estado del $O_2(^1\Delta_g)$. Por ende, es condición fundamental que el sensibilizador tenga una energía de estado triplete mayor que la de $O_2(^1\Delta_g)$ (22.5 Kcal/mol) y que el tiempo de vida del triplete del sensibilizador sea lo suficientemente largo como para permitir que la interacción entre dicha especie y el oxígeno ($O_2(^3\Sigma_g^-)$, Esquema 1) ocurra eficientemente.

La elección del sensibilizador depende de las características del sistema que se desea estudiar. Si se desea estudiar la fotooxidación del sustrato mediada por $O_2(^1\Delta_g)$ (mecanismo Tipo I), es necesario que el sensibilizador posea las características señaladas anteriormente. En cambio, cuando se desea estudiar la fotooxidación mediada por otras EROs, debe elegirse un sensibilizador que origine dichas especies.

I-3.5.5. Mecanismos cinéticos de fotooxidaciones sensibilizadas

Los procesos de fotooxidación sensibilizados pueden describirse, en general, mediante el mecanismo que se muestra en el siguiente esquema cinético:



Esquema 14: Esquema cinético de procesos fotosensibilizados: A: sustrato fotooxidable; Constantes de velocidad (k): 1k_d : desactivación natural del sensibilizador (S) en su estado singlete electrónicamente excitado ($^1S^*$); 1k_q : desactivación de $^1S^*$ por A; k_{isc} : entrecruzamiento de sistemas; 3k_d : desactivación natural del estado triplete electrónicamente excitado de S ($^3S^*$); 3k_p : formación de productos desde $^3S^*$; k_{ET} : transferencia de energía; 3k_q : desactivación de $^3S^*$ por A; k_d : desactivación natural de $O_2(^1\Delta_g)$; k_q desactivación física de $O_2(^1\Delta_g)$ por A; k_r desactivación química de $O_2(^1\Delta_g)$ por A; k_{rs} desactivación química de $O_2(^1\Delta_g)$ por S.

El proceso comienza cuando el sensibilizador (S) absorbe la radiación y forma su estado singlete electrónicamente excitado ($^1S^*$) [1], el cual puede decaer naturalmente [2] al estado fundamental, ser desactivado por un sustrato fotooxidable (A) [3] o bien formar su estado triplete electrónicamente excitado ($^3S^*$) [4] por entrecruzamiento de sistemas. Por su parte, $^3S^*$ puede decaer a su estado fundamental [5], formar algún producto [6], transferirle su energía al oxígeno para dar $O_2(^1\Delta_g)$ [7] o bien, interaccionar con A [8] a través de la transferencia de un electrón

formando las especies $A^{+\bullet}$ y S^{\bullet} . El $O_2(^1\Delta_g)$ formado en [7], puede desactivarse por las siguientes vías: desactivación natural [9], desactivación física por el sustrato A [10] o reacción química ya sea por A [11] o por el sensibilizador [12], procesos que ya fueron descritos en la sección I-3.4.2.

Por otra parte, el radical S^{\bullet} [13] puede interactuar con algún sustrato rico en hidrógenos para formar el radical SH^{\bullet} . En presencia de otro radical idéntico, ocurre una desproporción para formar S y la especie totalmente reducida SH_2 [14]. SH_2 puede reoxidarse en presencia de oxígeno, previa formación de un complejo [15], para producir H_2O_2 [16]. Este último, puede reaccionar con el radical $O_2^{\bullet-}$ [18] para producir el radical OH^{\bullet} . A su vez, las especies OH^{\bullet} y H_2O_2 pueden reaccionar con A mediante los procesos [17] y [19], respectivamente.

Por otro lado cabe mencionar que pueden ocurrir reacciones de asociación entre el sensibilizador y el sustrato A en ausencia de luz, llamadas reacciones “a oscuras”, que no están incluidas dentro del esquema cinético anterior. Como producto de estas reacciones pueden formarse complejos o agregados que son excitables por la luz y que siguen por mecanismos de fotooxidación paralelos.

Un aspecto muy importante del diseño experimental en estudios de fotooxidaciones sensibilizadas, consiste en la elección del sensibilizador. Actualmente, existen una gran variedad de sensibilizadores con diferentes características respecto de solubilidad, generación de determinadas EROs, etc. Sin embargo, la elección de uno u otro dependerá de las cualidades del sistema que se esté estudiando.

En este trabajo de tesis se escogió en primer lugar, al sensibilizador natural Riboflavina (Rf). Se sabe que Rf puede sensibilizar fotooxidaciones mediante mecanismos Tipo I y Tipo II, siendo de esta manera capaz de generar diferentes EROs.²¹⁴ Existen varios factores que afectan la naturaleza y la magnitud con que ocurren las reacciones resultantes de la interacción de Rf con la luz. Entre ellos se encuentran la polaridad del solvente²¹⁵, el pH del medio,^{216,217} el tipo de solución reguladora,^{218,219} fuerza iónica,²²⁰ concentración de oxígeno²²¹, intensidad y longitud de onda de la radiación.^{222,223}

Rf un pigmento natural que forma parte del complejo de las vitaminas B, siendo también conocida como vitamina B2 (Figura 43 A, Apéndice, sección V-2). Se encuentra presente en el organismo en varias formas. Rf es el grupo prostético de las enzimas “flavinas”, como Flavina Mononucleótido (FMN) o Flavina-Adenina Dinucleótido (FAD), A su vez, Rf como vitamina B2 es

fundamental en el desarrollo y respiración de los glóbulos rojos de la sangre, producción de anticuerpos, y también participa en la regulación del crecimiento y desarrollo del cuerpo.^{224,225}

Se ha comprobado que la vitamina B2, luego de su exposición a luz visible puede causar fotooxidaciones aeróbicas mediadas por EROs que afectan a uno o varios de los aminoácidos fotooxidables Tyr, Trp, Met, Cys e His.^{148,226}

Además, se ha postulado que Rf es un posible sensibilizador de fotodegradaciones *in vivo* de proteínas, ácidos grasos y bases púricas, entre otros sustratos de relevancia biológica.¹⁷⁷⁻²²⁷⁻²²⁹ De hecho, se ha informado que Rf puede inducir fotorreacciones en el cuerpo, especialmente en zonas expuestas a la radiación visible.^{230,231}

En segundo lugar, en esta tesis se eligió el sensibilizador artificial Perinaftena (PN) (Figura 43 B, Apéndice, sección V-2) como generador exclusivo de $O_2(^1\Delta_g)$. Respecto de las propiedades que posee este sensibilizador, cabe destacar su alta eficiencia de generación de estado triplete electrónicamente excitado (rendimiento cuántico de generación de estado triplete, $\phi_T=1,0$ en agua).^{232,233} Por otro lado, su rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ se encuentra cercano a la unidad para solventes de características muy diferentes.^{233,234} Por tal motivo PN es considerado un generador universal de $O_2(^1\Delta_g)$.

I-3.6. ALBÚMINA DE SUERO HUMANO (HSA)

HSA es una de las proteínas extracelulares más abundantes del plasma sanguíneo. Constituye alrededor del 60% de la masa de proteínas plasmáticas y alcanza una concentración de aproximadamente 40 mg/ml en la sangre.^{235,236}

HSA es una proteína que cumple múltiples funciones en el organismo. Por un lado, transporta numerosos compuestos como ácidos grasos libres, bilirrubina, y una gran cantidad de fármacos, los que pueden unirse de manera reversible, o irreversible a través de enlaces covalentes.²¹ La unión o *binding* de dichos compuestos a la proteína aumenta su solubilidad en el plasma, disminuye su toxicidad y hasta puede resultar en una protección del ligando frente a posibles oxidaciones. La unión reversible de ligandos suele ser estereoselectiva; De allí que HSA es de gran utilidad en la separación de drogas enantioméricas que poseen diferentes actividades terapéuticas.²¹ Por otro lado, HSA posee una actividad catalítica muy importante, que se caracteriza por tener diferentes tipos de actividad hidrolítica, entre las que se destaca su actividad como estearasa,²³⁷ enolasa²³⁸ y como tioestearasa.²³⁹

HSA es una proteína de cadena simple, que es sintetizada y se libera desde las células del organismo. No posee grupos prostéticos y está unida covalentemente a carbohidratos y lípidos. Está constituida por 585 aminoácidos y tiene una masa²³⁷ de aproximadamente 66500 Da. Estudios de cristalografía de rayos X han demostrado que la proteína nativa posee alrededor del 67% de estructura hélice alfa y ausencia de láminas beta.^{235,240,241} Además, estudios combinados de modelado hidrodinámico y depolarización de fosforescencia han indicado que la estructura cristalina sugerida de HSA es muy similar a la estructura de la proteína en solución.²⁴²

HSA posee tres dominios, denominados I, II y III; cada uno de los cuales se encuentra subdividido en dos subdominios A y B. En general toda la estructura consiste en hélices alfa que se comunican a través de bucles flexibles y se estabilizan por puentes disulfuro que se forman a partir de todos los residuos Cys que posee, excepto el de Cys34.

La mayoría de los compuestos que se unen reversiblemente a HSA, lo hacen en algunos sitios de mayor afinidad, aunque existen sitios que se han categorizado de baja o muy baja afinidad. Estudios realizados sobre una gran variedad de compuestos, mediante el desplazamiento de pruebas fluorescentes, han revelado que la mayoría se unen principalmente a dos sitios de unión, denominados sitio I y sitio II, con constantes del orden de 10^4 - 10^6 M⁻¹.

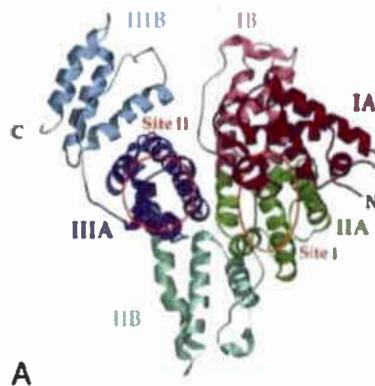


Figura 1: Estructura de HSA. (Extraído de bibliografía, referencia 21).

El sitio I está ubicado en el subdominio IIA de la proteína, es flexible y espacioso. En él, se encuentran una gran cantidad de sitios individuales de *binding*, que en algunos casos pueden ser independientes entre sí, mientras que en otros se encuentran muy influenciados uno por otro. Existen evidencias que indican que este sitio es también muy adaptable, puesto que moléculas de diferente naturaleza pueden unirse al mismo.^{237,54} En general, las moléculas que tienen mayor afinidad por este sitio son ácidos dicarboxílicos o moléculas heterocíclicas con carga negativa.

Una particularidad que presenta el sitio I, es que en él se encuentra ubicado el único triptófano (Trp214) que posee HSA. La parte interior del sitio está revestida por cadenas aminoacídicas hidrofóbicas, mientras que la entrada al mismo está rodeada de residuos cargados positivamente.²³⁵

El sitio II se encuentra ubicado en el subdominio IIIA de HSA. Su estructura interna es similar a la del sitio I, sin embargo es menos flexible y menos espacioso. Las moléculas que tienen mayor afinidad por este sitio son ácidos carboxílicos aromáticos con un grupo ácido cargado negativamente en un extremo de la molécula como los antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs).

Existen estudios que indican que ambos sitios en HSA son muy adaptables y contienen sub-compartimentos que en algunos casos, se encuentran disponibles a través de cambios conformacionales inducidos por la interacción con el ligando.⁷⁰ También se ha indicado la existencia de otros sitios de *binding* secundarios, distribuidos ampliamente entre los dominios de HSA.⁷⁰

En el marco del estudio de las interacciones entre ligandos y proteínas, es que resulta importante destacar el rol que ha desarrollado la bioinformática en este ámbito. En los últimos años, se ha incrementado de manera notable el desarrollo de herramientas informáticas y el análisis de información derivada de estructuras 3D y dinámica de proteínas, con el objetivo de avanzar sobre el desarrollo de nuevos fármacos.^{243,244} Los pasos fundamentales en la proteómica informática consisten en desarrollar un modelo computacional de la estructura de una proteína por homología o predicciones *ab initio*, y luego estudiar la posible interacción de diferentes ligandos con dicha proteína (acoplamiento molecular o *Docking*).²⁴⁵ Mediante este método, también pueden estudiarse interacciones proteína-proteína.

A continuación se describirán brevemente algunos conceptos importantes para la comprensión del método de acoplamiento molecular.

I-3.7. ACOPLAMIENTO MOLECULAR (*DOCKING*)

Acoplamiento molecular es un término empleado por esquemas computacionales que intentan buscar, la mejor interacción entre dos moléculas: un ligando y una proteína, o dos proteínas. La información inicial necesaria para encontrar esta condición de asociación óptima, responde a las coordenadas atómicas de las dos moléculas interactuantes. Es decir que se necesitan dos estructuras para realizar acoplamiento molecular: la estructura de la proteína que actuará como receptor y la del ligando. La primera generalmente proviene de estructuras 3D, generadas a partir de datos experimentales obtenidos por cristalografía o en algunos casos por resonancia magnética nuclear (RMN), que se encuentran archivadas en bancos de datos cibernéticos (*Protein Data Bank*).²⁴⁶ Aquí se pueden encontrar estructuras de la proteína cristalizada bajo diferentes condiciones, en archivos que se caracterizan por su extensión "pdb". Puede ser una estructura nativa, es decir, cristalizada libre en solución; o *pseudo-nativa*, cuando se co-cristaliza con un ligando, diferente al que se encuentra en estudio. En el caso del ligando, existen bases de datos como "PubChem"²⁴⁷ o "ZINC"²⁴⁸, entre otras, que contienen una considerable biblioteca de estructuras de moléculas pequeñas o ligandos. Muchas de ellas han sido determinadas experimentalmente, mientras que otras lo han sido teóricamente.

Sin embargo, en la práctica es conveniente además contar con información bioquímica, como el conocimiento de los sitios de unión o *binding*, donde eventualmente el ligando se puede asociar. Esta información facilita en gran medida las predicciones de acoplamiento molecular. Aun así, es necesario considerar las posibilidades de interacción en otras cavidades o sitios que posea la proteína

Cuando se realizan experimentos de acoplamiento molecular, es muy importante poder validar el método que se está empleando, para así poder estar seguros que los resultados obtenidos para el sistema en estudio sean confiables. Para ello, se suelen realizar experimentos como el descrito anteriormente: se reconstruyen estructuras proteína-ligando co-cristalizadas utilizando el método de acoplamiento a validar. Si los resultados coinciden con la información cristalográfica, puede decirse que el método es confiable.

En general, existen dos formas de realizar acoplamiento molecular:

- Acoplamiento molecular localizado
- Acoplamiento molecular ciego.

En el caso de ser acoplamiento localizado se delimita un espacio de la proteína donde se quiere evaluar la localización del ligando, como estrategia para disminuir los tiempos de cálculo y

para explorar los confórmeros de menor energía de manera más precisa. Para ello es necesario contar con la información respectiva del sitio de *binding* o de las regiones donde se puede unir el ligando, o del mecanismo de interacción. Por otro lado, se realiza un experimento de acoplamiento molecular ciego, cuando uno no cuenta con datos experimentales o información que prediga la región o el sitio donde el ligando se va a unir en la proteína. En este caso, se debe buscar aleatoriamente y en forma estadísticamente aceptable en el espacio conformacional, la trayectoria del ligando que finalmente proporcione la mejor conformación. Existen algunas herramientas informáticas como aplicaciones del programa VMD,²⁴⁹ o *PocketFinder*²⁵⁰ del programa ICMPro, que explorando las superficies, permiten detectar cavidades o bolsillos hidrofóbicos de la proteína para así analizar las zonas de posible interacción según los conocimientos fisicoquímicos del ligando y de los residuos que forman esas zonas de interés en la proteína. A partir de esta información se pueden plantear restricciones en la optimización de la energía y el muestreo será más acotado. En este tipo de acoplamiento, se exploran sitios de interacción desconocidos o nuevos en un sistema, mientras que en el acoplamiento localizado el espacio de interacción se conoce de antemano y puede por este motivo ser acotado.

A medida que se ha ido profundizando en este ámbito, se han desarrollado una serie de programas de acoplamiento molecular, que funcionan en base a algoritmos que han ido evolucionando en el tiempo.²⁵¹⁻²⁵⁸ Las cuestiones fundamentales del acoplamiento molecular son: la representación del sistema, la búsqueda en el espacio conformacional y la calificación de las posibles soluciones. Esto último se logra mediante el empleo de una función de puntuación (“*scoring*”). En la mayoría de los casos esta función puede ser un campo de fuerza que evalúe las energías de cada interacción posible. Por otro lado, debido a la demanda de tiempo de cálculo computacional de estas tres cuestiones, se debe decidir por el uso de una función de puntuación más sofisticada, con un método de búsqueda más acotado; o el empleo de una función de puntuación más sencilla, con un método de búsqueda extensivo.²⁵⁹

El acoplamiento molecular simula fundamentalmente la interacción en la superficie de la proteína, razón por la que es muy importante la búsqueda de una forma adecuada para representar esta superficie. Se pueden encontrar representaciones por modelos matemáticos como los descriptores geométricos de forma, o por cuadrículas. Además, se puede definir si la estructura de la proteína será rígida o flexible.

Por otro lado, es fundamental definir un buen método de búsqueda, para lo que debe tenerse en cuenta dos aspectos importantes: la rapidez y la efectividad con que se busca sobre el espacio conformacional de relevancia.

Por su parte, la función de puntuación que permite calificar las posibles condiciones de asociación, debe ser lo suficientemente rápida como para aplicarse a una gran cantidad de posibles soluciones. Si esta función es un campo de fuerza, debe incluir y determinar las contribuciones de todos los parámetros energéticos necesarios: las energías debidas a las interacciones de Van der Waals, puente de hidrogeno y coulómbicas. Las interacciones de Van der Waals son importantes porque permiten estabilizar uniones entre los residuos de los aminoácidos que participan en la unión con el ligando. Los puentes de hidrogeno pueden participar tanto en las interacciones de aquellos residuos de la proteína que posean grupos capaces de formar dichos puentes con el ligando, como también pueden estar presentes si existen moléculas de agua que participen en el *binding*. Las interacciones electrostáticas cuentan por las posibles interacciones entre grupos cargados (como residuos con grupos cargados positiva o negativamente que interactúen con algún grupo cargado del ligando). Por último la energía relacionada a la desolvatación es muy importante también porque permite tener en cuenta que en la interacción proteína-ligando, habrá moléculas de agua que serán desalojadas tanto del sitio de *binding* como de los alrededores del ligando.

I-3.8. DIABETES MELLITUS Y ANTIDIABÉTICOS ORALES

I-3.8.1. Definición y clasificación

Diabetes *mellitus* (DM) es un conjunto de desórdenes metabólicos que se caracterizan por niveles anormalmente altos de glucosa en la sangre (hiperglucemia), causados por problemas en la secreción de insulina, por acción ineficiente de dicha hormona, o ambos procesos. Esta situación de hiperglucemia crónica puede llegar a causar una destrucción y pérdida de funcionamiento a largo plazo de ciertos órganos como riñones, corazón, ojos, arterias, entre otros.

Existen varios tipos de DM y sus causas están relacionadas con una conjugación de factores genéticos y ambientales.²⁶⁰ En general, esta enfermedad puede comenzar con una destrucción autoinmune de las llamadas células beta del páncreas, cuya función es la secreción de insulina. En consecuencia se genera una progresiva deficiencia de la hormona. Por su parte, otra causa asociada al desarrollo de la enfermedad, es la ineficiencia en la acción que la insulina posee en ciertos tejidos. Esta situación causa problemas en el metabolismo de proteínas, carbohidratos,

grasas y lípidos. La deficiencia de insulina en el organismo, como la ineficiencia en la acción de la hormona sobre los tejidos, son causas que muchas veces coexisten en el mismo paciente.²⁶¹

Existen diferentes tipos de diabetes: DM tipo I, DM tipo II, DM gestacional y otros tipos específicos. La DM tipo I se produce principalmente por ausencia de secreción de insulina, debido a la eliminación autoinmune de las células beta del páncreas. La velocidad de destrucción de estas células puede ser variable, desde muy rápida en pacientes jóvenes y niños, hasta más lenta en pacientes adultos. Por lo general se diagnostica en pacientes jóvenes y solo representa el 10% del total de pacientes que padecen la enfermedad.²⁶² Por su parte, la DM tipo II se genera por una producción deficitaria de insulina que generalmente va acompañada de una resistencia a la hormona en los tejidos. La diferencia fundamental con la DM tipo I es que la deficiencia en la secreción de insulina no se debe a la eliminación de las células beta del páncreas, sino que proviene de la incapacidad de ciertos tejidos celulares para utilizar dicha hormona. La mayoría de los pacientes con DM tipo II presentan obesidad. Sin embargo, muchos de los pacientes que no presentan estas características, poseen acumulaciones de grasas centralizadas en la zona abdominal. En este sentido, se sabe que la obesidad es una causa de la resistencia a la insulina.²⁶¹ La DM tipo II es uno de los casos más comunes que alcanza al 85-95% de los pacientes diabéticos y su diagnóstico generalmente aparece a edades avanzadas.

La DM gestacional ocurre durante los primeros meses del embarazo, y lo más común es que sólo sea un desorden metabólico momentáneo. Sin embargo, muchas de las pacientes que sufren este trastorno, suelen tener propensión a cuadros de DM tipo II en el futuro.²⁶²

También existen otros tipos de alteraciones relacionadas, que son estados metabólicos intermediarios entre una homeostasis normal de glucosa y diabetes. Estos estados se denominan glucemia alterada en ayunas (Impaired Fasting Glycaemia, IFG) e intolerancia a la glucosa (Impaired Glucose Tolerance, IGT). Ambos son estados "pre-diabetes" que reflejan la alta probabilidad de desarrollar DM de algún tipo y/o enfermedad cardiovascular.^{263,264}

I-3.8.2. Síntomas y tratamiento

Los síntomas asociados a la diabetes consisten en polidipsia (gran necesidad de ingerir líquidos), poliuria (aumenta la frecuencia de veces que se orina), polifagia (sensación de hambre excesivo), pérdida de peso sin razón justificable, visión borrosa, infecciones recurrentes, entre otros.²⁶² Generalmente, los síntomas no son severos en los primeros estadios y llegan a manifestarse marcadamente mucho después de que haya comenzado la enfermedad, cuando la

hiperglucemia existente ya ha causado modificaciones patológicas y fisiológicas. En estas condiciones, un síntoma que alerta sobre la posibilidad de la existencia de DM es un cuadro de altas concentraciones de cuerpos cetónicos en sangre (cetoacidosis), causado por combinación de hiperglucemia y alguna infección u otras situaciones de estrés.²⁶⁵

El tratamiento específico para DM tipo I consiste fundamentalmente en el suministro de insulina mediante inyecciones subcutáneas varias veces al día o inyecciones continuas mediante un dispositivo denominado bomba de insulina. Se ha indicado que el uso de este tipo de terapia fundamental garantiza glucemias controladas y otras mejoras en el cuadro general de este tipo de diabetes.²⁶⁶ En estos casos, los controles glucémicos, el ejercicio y el control de las cantidades de insulina en función de la actividad física y el índice glucémico de los alimentos, representan los pilares fundamentales del tratamiento de este tipo de diabetes.

Los tratamientos para la DM tipo II apuntan a tres procesos fundamentales que regulan los niveles glucémicos luego de una ingesta de glucosa: la estimulación de la secreción de insulina, la supresión de la gluconeogénesis (fundamentalmente hepática) mediada por insulina y estimulación del consumo de glucosa por tejidos periféricos como el músculo, inducida por insulina. En este sentido, se ha propuesto que el suministro de agentes que puedan reducir la velocidad de generación anormal de glucosa es efectivo dentro del tratamiento de este tipo de DM. Sin embargo, los medicamentos que estimulan la secreción de insulina son los más eficaces.²⁶⁷ Ejemplos de estos medicamentos orales son las sulfonilureas y glinidinas.^{268,269} Las sulfonilureas se han empleado desde 1950 como antidiabéticos orales. Los compuestos de la primera generación como acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida y tolazamida aún se utilizan. Sin embargo, los de segunda generación actualmente prevalecen en su uso. Entre estos últimos se encuentran Glibenclamida, Glimepirida, Gliclazida y Glipizida. En general, estas sulfonilureas actúan estimulando la liberación de insulina de las células beta del páncreas.¹⁶ Por su parte, las glinidinas (nateglidina y repaglidina) se han diferenciado de las sulfonilureas en que tienen un efecto de menor duración, y por esta razón poseen menor riesgo de generar situaciones de hipoglucemia (niveles muy bajos de glucosa en sangre). Además, se las suele administrar a pacientes que presentan disfunciones renales.²⁷⁰

I-3.8.3. Sulfonilureas

Las sulfonilureas han sido desde hace muchos años el tratamiento fundamental como agentes hipoglucemiantes en pacientes con DM tipo II.²⁶⁷ Su función es estimular la liberación de insulina en el páncreas. Su mecanismo de acción comienza cuando se unen a receptores específicos ubicados sobre las células beta del páncreas. Esta interacción produce el cierre de canales K^+ -ATP dependientes y por lo tanto, una disminución en la concentración de iones K^+ en el interior celular. Esto genera una depolarización de la membrana celular y un incremento en el flujo de iones hacia el interior celular, que activa un sistema en el citoesqueleto que induce la liberación de insulina.²⁷¹

Desde el punto de vista químico, las sulfonilureas han de considerarse como ácidos orgánicos muy débiles, ya que poseen cierto carácter ácido en los grupos NH. Los valores de pKa estimados varían entre 5,8 y 6,8 en solución.⁷ De esta forma, puede decirse que a pH fisiológico (pH = 7,4) estos antidiabéticos se encuentran en sus formas completamente ionizadas. A pesar de esto, son compuestos de gran carácter hidrofóbico y por ello presentan baja solubilidad en medios acuosos.⁷ En general, las sulfonilureas de segunda generación se caracterizan por poseer mayor lipofilicidad que las de primera generación, y por tanto, mayor duración en su efecto.²⁶⁸ En este sentido, se ha propuesto una relación entre la lipofilicidad de las sulfonilureas y la interacción con sus receptores específicos de membrana en las células beta del páncreas: a mayor lipofilicidad, mayor interacción con los receptores, lo que mejora su acción terapéutica.²⁷²

A continuación se muestran las estructuras químicas de las sulfonilureas utilizadas en este trabajo de tesis: Gliclazida y Glipizida.

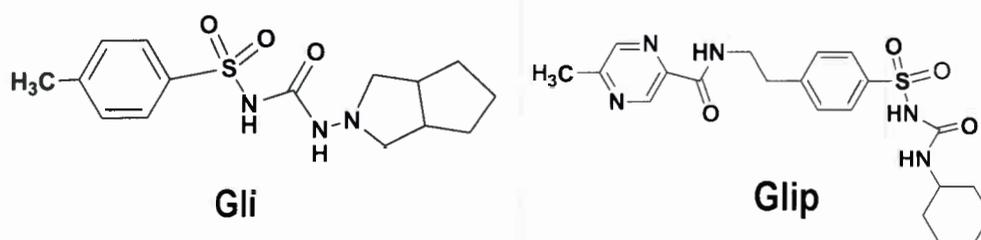


Figura 2: Estructura química de los antidiabéticos Gliclazida (Gli) y Glipizida (Glip).

En el caso de Gli, se puede destacar la presencia del grupo perhidrociclopenta[c]pirrol, que se encuentra unido al N6. Existen evidencias experimentales que indican la posibilidad de

formación de puentes de hidrógeno entre este grupo y el grupo NH de Gli.²⁷³ En el caso de Glip, se puede destacar la presencia de los grupos 5-metil pirazina que se encuentra unido al anillo aromático mediante un conector amido, y el grupo ciclohexano unido al N6 del grupo sulfonilurea.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II-1. REACTIVOS Y SOLVENTES

Los reactivos Gliclazida (Gli), Glipizida (Glip), Albúmina de Suero Humano (HSA) libre de ácidos grasos, Perinaftenona (PN), Riboflavina (Rf), Catalasa de hígado bovino (CAT), Superóxido Dismutasa de eritrocitos bovinos (SOD), Azida de Sodio (NaN_3), D-(+)-Glucosa, L-Triptófano, Glutamina y Sulfato de Gentamicina, Azul Tripán, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y utilizados sin purificación previa. Medio sintético de GIBCO; Suero fetal bovino (SFB) de Natocor y Thioglicolato de Difco.

En las experiencias se utilizó como solvente una solución reguladora de pH fisiológico (pH 7,4) utilizando 50 mL de una solución de KH_2PO_4 0,1 M y 39,1 mL de una solución de NaOH 0,1 M, ambas preparadas en agua bidestilada. En el caso de las determinaciones de los tiempos de vida de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, se utilizó como solvente una solución reguladora de pD 7,4, empleando 50 mL de una solución de KH_2PO_4 0,1 M y 29,1 mL de una solución de NaOH 0,1 M (pH = 7,00), preparadas en agua deuterada. El ajuste de pD se realizó²⁷⁴ teniendo en cuenta que $\text{pD} = \text{pH} + 0,4$. En el caso de los experimentos de citotoxicidad, se utilizaron soluciones reguladoras utilizando NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KPO_4H_2 y NaCO_3H . Las sales mencionadas fueron obtenidas de Anedra. Metanol (CH_3OH): calidad HPLC, fue provisto por Sintorgan. Metanol deuterado (CD_3OD) y agua deuterada (D_2O) fueron obtenidas de Sigma Aldrich.

II-2. EQUIPAMIENTO

II-2.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN

Los espectros de absorción se realizaron en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A, el cual posee un detector que presenta arreglo de diodos. La fuente de excitación consiste en una lámpara de deuterio, y su intervalo de detección está comprendido entre 190 y 820 nm. Se utilizaron celdas de cuarzo de paso óptico de 1cm.

II-2.2. FLUORESCENCIA ESTACIONARIA

Las medidas de emisión de fluorescencia estacionaria fueron realizadas en un espectrofluorómetro Fluor Max™, cuya fuente de excitación es una lámpara de xenón, libre de ozono, de 150W. Su detector consiste en un tubo fotomultiplicador sensible hasta 850 nm.

Los espectros fueron registrados utilizando celdas de cuarzo para fluorescencia de 1cm de paso óptico.

El equipo consta de un *software* de análisis DM 3000 3.2.

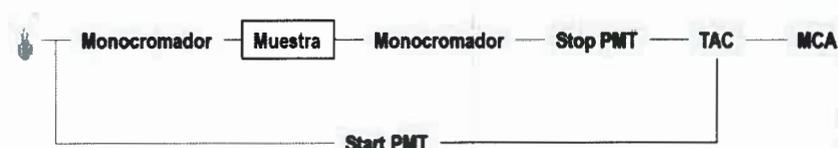
Todas las determinaciones se realizaron con control de temperatura utilizando un termostato LabTech LBC-R08.

II-2.3. FLUORESCENCIA RESUELTA EN EL TIEMPO

La determinación de los tiempos de vida del estado singlete electrónicamente excitado, se realizó utilizando un equipo de conteo de fotón único (*Single Photon Counting*, SPC) Edinburgh Analytical Instrument FL-900 CDT. La técnica se basa en el concepto de que la distribución de probabilidades para la emisión de un fotón aislado, luego de la excitación de la muestra, describe el perfil de intensidad de emisión en el tiempo para los fotones emitidos luego de una excitación.²⁷⁵ Para poder tener un perfil de decaimiento lo más exacto posible, se debe hacer un gran muestreo estadístico de la distribución temporal de los fotones emitidos. Para ello, la muestra es repetitivamente excitada por una fuente de excitación pulsada. En nuestro caso, el equipo está provisto de diodos pulsados que son emisores de luz a distintas longitudes de onda (LEDs, *PicoQuant*). El diodo utilizado se seleccionó para maximizar la cantidad de fotones absorbidos por la muestra en base al espectro de absorción del compuesto en estudio. El fotomultiplicador de inicio (*start* PMT) detecta el pulso de excitación y genera un pulso eléctrico disparador que está exactamente correlacionado con el pulso óptico. El pulso disparador es conducido mediante un discriminador a la entrada del convertidor de tiempo en amplitud (TAC), el cual inicia la carga de un capacitor. Simultáneamente, el pulso óptico excita la muestra. Existe una apertura entre la fuente de excitación y la muestra que se regula de manera que solo se detecte un fotón por cada excitación. Una vez detectado el fotón emitido, se genera una señal eléctrica que detiene la carga del capacitor en el TAC, el cual a su vez genera un pulso de salida cuyo potencial es proporcional a la diferencia de tiempo entre el pulso disparador y el pulso que se generó cuando se detectó el fotón. Luego, el pulso de salida es convertido en un valor numérico por un convertidor analógico-digital que se almacena como una cuenta en el Analizador Multicanal (MCA) (Esquema 15). Realizando repetidas veces este proceso se obtiene un histograma del número de cuentas en función de los canales temporales. Dicho histograma representa entonces el perfil de emisión de los fotones en el tiempo a partir del cual se pueden determinar los tiempos de vida. El equipo consta del *software* FL900CDT que se utilizó para dichos fines.

Todas las determinaciones se realizaron empleando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, y con control de temperatura utilizando un termostato Endocal RTE-210.

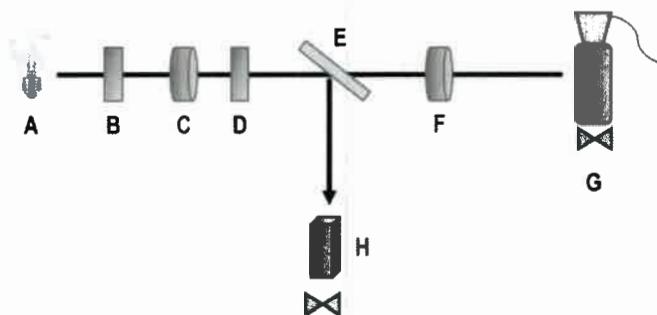
A continuación se muestra un esquema del equipo utilizado.



Esquema 15: Diagrama del equipo de Conteo de Fotón Único (SPC).

II-2.4.FOTOLISIS ESTACIONARIA

Las medidas de fotooxidación en condiciones estacionarias se realizaron irradiando con luz UV-visible una solución que contiene el sustrato fotooxidable y el sensibilizador, en un equipo de fotólisis como se muestra en el esquema 16, diseñado en nuestro laboratorio.²¹³



Esquema 16: Diagrama del equipo de fotólisis estacionaria. A: Lámpara de cuarzo-halógeno. B: Filtro térmico. C y F: Lentes. D: Filtro de corte. E: Espejo. G: Celda para electrodo de oxígeno con sistema de agitación magnética. H: Celda de absorción o fluorescencia con sistema de agitación magnética.

La fuente de irradiación consiste en una lámpara de cuarzo-halógeno de 200 W. La misma puede ser dirigida alternativamente, mediante el espejo E (Esquema 16), hacia la celda que contiene electrodo de oxígeno (G en el Esquema 16) para realizar medidas de consumo de oxígeno, o bien hacia la celda de absorción o fluorescencia (H en el Esquema 16), con el fin de realizar experimentos de consumo de sustrato. Para asegurarse que solo el sensibilizador absorba la radiación, se utilizaron filtros de corte adecuados, dependiendo del sensibilizador. En el caso de las fotooxidaciones sensibilizadas por Rf, se utilizó un filtro de corte de 361 nm, mientras que para el caso de las sensibilizadas por PN, el filtro de corte utilizado fue de 320 nm.

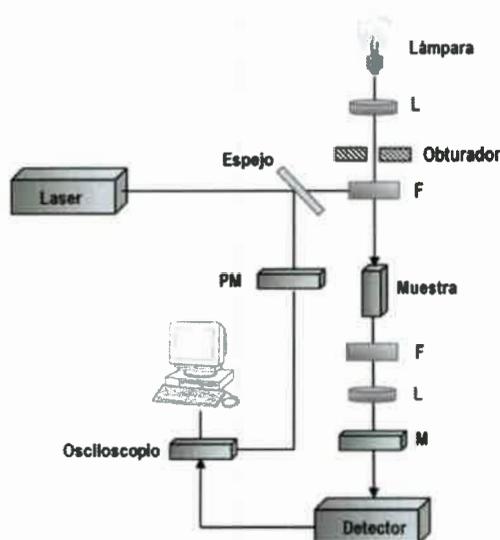
Las medidas de consumo de oxígeno se determinaron con un electrodo específico para oxígeno disuelto Orion 97-08 que se encuentra acoplado a un pHmetro Orion 720. Su sistema de

detección consiste en dos electrodos de plata polarizados y un electrolito, separados de la solución de medida por una membrana permeable a gases. El oxígeno disuelto en la solución difunde hacia la membrana donde es reducido a iones hidroxilos. La corriente producida en esta reducción causa una diferencia de potencial que puede ser traducida, en el pHmetro acoplado, en "partes por millón" (ppm) de oxígeno.

La calibración del electrodo se realiza en agua saturada de aire a presión atmosférica antes de cada medida. Dado el material de la membrana, solo se pueden utilizar soluciones con porcentajes mayores a 90% de agua. El pH en el que se puede trabajar abarca un intervalo entre pH 3 y 12, y los límites de concentraciones de oxígeno llegan hasta las 14 ppm.^{276,148} Las medidas se realizan bajo agitación continua para asegurar la homogeneidad lumínica del medio de reacción.

II-2.5. DETECCIÓN DE TIEMPOS DE VIDA Y ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE ESPECIES TRANSITORIAS

La caracterización de los espectros de absorción y los tiempos de vida de especies transitorias fueron determinados mediante la técnica de Laser Flash Fotólisis.²⁷⁷ El equipo utilizado consta de una fuente de excitación que consiste en un láser de Nd:Yag (Spectron, SL 400) con emisión a 1066 nm, 532 nm, 355 nm y 266 nm, correspondientes a la primera, segunda, tercera y cuarta armónica, respectivamente. El mismo posee un ancho de pulso de 18 ns y 350 mJ en la primera armónica. El haz de excitación se encuentra enfocado a 90° respecto de la luz analizadora, la cual proviene de una lámpara de Xenón de 150W. El sistema de detección está formado por un monocromador acoplado a un tubo fotomultiplicador Hamamatsu R666. A fin de evitar la fotodegradación de la muestra, debido a la radiación de la lámpara analizadora, se coloca en el camino del haz de excitación un obturador (*shutter*) cuya apertura está sincronizada con la frecuencia de disparo del láser. La radiación transmitida por la muestra es recibida por un monocromador y detectada luego en un fotomultiplicador, donde es transformada a una señal eléctrica. Esta señal es digitalizada posteriormente por un osciloscopio (Hewlett Packard 54504A) para luego ser transferida a una computadora personal mediante una interfase IEEE. En la computadora, la señal es convertida a valores de absorbancia, que luego puede ser procesada mediante un programa de análisis adecuado.²⁷⁸ El intervalo espectral accesible se encuentra entre los 300 y 900 nm. El esquema del equipamiento se muestra a continuación:



Esquema 17: Diagrama del equipo de Laser Flash Fotólisis. L: lentes. F: filtros. M: monocromador. PM: fotomultiplicador.

Como se mencionó anteriormente, Laser Flash Fotólisis (LFF) es una técnica de resolución temporal que permite el estudio espectroscópico y cinético de especies llamadas transitorias, que viven en la escala de los mili o micro segundos. Estas especies pueden ser tripletes, iones radicales, especies zwitteriónicas, etc.

La posible interacción o *quenching* de una especie transitoria por un dado sustrato puede estudiarse mediante LFF. Para tal fin, se determinan los tiempos de vida de la especie en ausencia y en presencia del sustrato en cuestión, mediante un ajuste monoexponencial del perfil de absorción medido a una longitud de onda donde la interferencia de otras especies sea insignificante. El análisis de los datos se realiza mediante una herramienta de ajuste por cuadrados mínimos no lineales (MicroCallOrigin 6.0)²⁷⁸, considerando la siguiente ecuación:

$$A_t = A_0 e^{-t/\tau} \quad (\text{Ec. 13})$$

A_t = absorbancia de la especie transitoria al tiempo t luego del pulso de excitación.

A_0 = absorbancia al tiempo $t = 0$ s.

τ = tiempo de vida de la especie transitoria.

La constante de velocidad de *quenching* de la especie transitoria (k_q), se puede determinar a través del tiempo de vida de la especie transitoria en ausencia (τ_0) y en presencia (τ) de diferentes concentraciones de sustrato $[A]$, y luego se realiza un análisis clásico de *Stern-Volmer*:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [A] \quad (\text{Ec. 14})$$

Por otro lado, para caracterizar los espectros de absorción de las especies transitorias, la muestra se irradia con un pulso de luz de alta intensidad para poblar el estado transitorio. Las moléculas en este estado son detectadas por una segunda fuente de luz o haz analizador por absorción (promoción a niveles excitados de energía superior). El cambio de la densidad óptica debido a las especies transitorias puede ser monitoreado en función del tiempo a distintas longitudes de onda que se van seleccionando con el monocromador colocado en el camino óptico de la luz de prueba (M en el Esquema 17), entre la muestra y el detector. Los cambios temporales de absorción a cada λ son detectados por un fotodetector de respuesta rápida. Dichos detectores generan una señal eléctrica proporcional a la transmitancia de la especie transitoria, que es digitalizada y procesada para convertirla en señales de absorbancia transitoria. La conversión de la señal eléctrica, a cada λ , a valores de absorbancia se realiza de acuerdo a la ley de *Lambert-Beer* de manera que la relación entre la absorbancia y transmitancia a una dada longitud de onda está dada por la siguiente expresión:

$$A_\lambda = -\log \frac{I_T}{I_0} = \epsilon_\lambda bC \quad (\text{Ec. 15})$$

A_λ = absorbancia de la especie transitoria a la λ dada.

I_T = intensidad de radiación transmitida (mV).

I_0 = intensidad de radiación incidente (mV).

ϵ_λ = coeficiente de extinción molar de la especie transitoria a la λ dada.

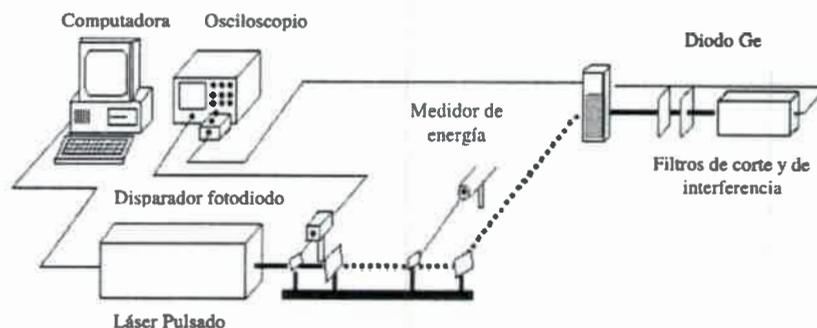
b = paso óptico del haz analizador a través de la muestra.

C = concentración molar de la especie transitoria.

II-2.6. DETECCIÓN DE TIEMPOS DE VIDA DE $O_2(^1\Delta_g)$.

Las medidas de detección de los tiempos de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ se realizaron empleando la técnica de detección de la señal de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ resuelta en el tiempo a 1270 nm

TRPD (*Time Resolved Phosphorescence Detection*).²⁷⁹ A continuación se muestra un esquema del equipo utilizado para la aplicación de dicha técnica:



Esquema 18: Diagrama del equipo para emplear la técnica TRPD

La fuente de excitación que se emplea es la misma que la utilizada en los experimentos de Láser Flash Fotólisis (Materiales y Métodos, sección II-2.5). La radiación fosforescente emitida es detectada en ángulo recto por un detector de germanio (Judson J16/8sp) que contiene un conjunto de filtros, el cual genera una señal eléctrica. Esta señal es digitalizada por un osciloscopio (Hewlett Packard 54504A) para luego ser transferida a través de una interfase IEEE a una computadora personal donde se realiza el procesamiento de las señales. La señal fue tomada luego de aproximadamente 10-12 disparos a fin de lograr una buena relación señal/ruido.

Normalmente, los puntos iniciales de la señal de decaimiento se encuentran perturbados por señales espúreas provenientes de la fuente de excitación o por fluorescencia residual del sensibilizador. Por ello el análisis de trazas se realizó a partir de los 8-10 μs . Se empleó un programa de ajuste por cuadrados mínimos no lineales (MicroCallOrigin 6.0).²⁷⁸

Dado que el tiempo de respuesta del sistema de detección del equipo es de aproximadamente 4-5 μs , y que el tiempo de vida de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en solventes acuosos se encuentra en la misma escala de tiempo, en estas determinaciones se emplearon solventes deuterados con el fin de aumentar el tiempo de vida de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.¹⁶⁹

II-2.7. CROMATOGRAFÍA HPLC-ESPECTROMETRÍA DE MASA

El análisis de productos de fotooxidación sensibilizada por PN se realizó en un cromatógrafo HPLC-Masa *Thermo Scientific Accela*, equipado con una bomba cuaternaria, un sistema de auto-

muestreo y una trampa de iones espectrométrica (Thermo Scientific LQT XL). El proceso de ionización es mediante *electrospray* (ESI).

Se utilizó una columna de fase reversa C18 de 150 mm x 2,1 mm x 5 μm . Se trabajó en modo isocrático con mezclas metanol: agua (9:1) + acetato de amonio (0,2 mM) con un flujo de 0,2 ml/min y un volumen de inyección de 10 μL . Las determinaciones se realizaron en modo positivo a temperatura ambiente.

II-3. METODOLOGÍA

II-3.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE *BINDING* DE LA INTERACCIÓN Gli-HSA Y Glip-HSA.

MODELO DE ISOTERMAS DE *BINDING*

Cuando se caracteriza la interacción entre un ligando y una proteína, es importante cuantificar las constantes de unión o *binding*, determinar cuántos sitios se ponen en juego en la asociación y el tipo de interacciones que estabilizan el complejo ligando-proteína. Uno de los métodos a través del cual es posible obtener las constantes de *binding* y el número de sitios de interacción, se basa en la construcción de una isoterma de *binding*, cuya ecuación se muestra a continuación:

$$\langle r \rangle = \sum_{i=1}^{i=n} \frac{K_{bi} [A]_{libre}}{(1 + K_{bi} [A]_{libre})} \quad (\text{Ec. 16})$$

donde $\langle r \rangle$ se define como la densidad de *binding* y representa al promedio de ligandos por unidad de proteína (siendo éste un promedio sobre todas las posibilidades de equilibrio de interacción).²⁸⁰ K_{bi} es la constante de unión al sitio i , $[A]_{libre}$ es la concentración de ligando libre y la sumatoria se extiende sobre n términos, iguales al número total de sitios de *binding* involucrados.

Generalmente las $[A]_{libre}$ se determinan o se calculan a través de algún método que pueda ser aplicado según las características del sistema. Estos métodos están basados en la medición de alguna propiedad determinada que varíe como resultado de las interacciones ligando-proteína. En nuestro caso, las $[A]_{libre}$ se determinaron empleando un método que consiste en utilizar la información que proviene de la desactivación o *quenching* de fluorescencia de HSA en presencia de los posibles ligandos.²⁸¹ En este caso, las $[A]_{libre}$ se determinan mediante las siguientes ecuaciones:

$$[A]_{libre} = [A]_{total} - [A]_{unido} \quad (\text{Ec. 17})$$

$$[A]_{unido} = n \theta [HSA]_{total} \quad (\text{Ec. 18})$$

Como ya se indicó, n es el número total de sitios de *binding* en cada molécula de proteína. θ es la fracción de sitios ocupados de HSA y puede determinarse mediante la relación entre las intensidades de emisión de HSA en ausencia (I_0) y en presencia (I) del ligando a diferentes concentraciones:

$$\theta = \Delta I / \Delta I_{Max} \text{ (Ec. 19)}$$

$$\Delta I = I_0 - I \text{ (Ec. 20)}$$

ΔI_{Max} representa la máxima variación en la intensidad de emisión de fluorescencia que se alcanza a las máximas concentraciones de ligando. Los valores de ΔI_{Max} se obtienen²⁸¹ por extrapolación de la ordenada al origen del gráfico de $1/\Delta I$ vs. $1/[A]_{total}$. Por último, se calcula $\langle r \rangle$ mediante la siguiente ecuación:

$$\langle r \rangle = [A]_{unido} / [HSA]_{total} \text{ (Ec. 21)}$$

Experimentalmente se parte de los datos de intensidad de fluorescencia de HSA en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de A y se calcula en primer lugar $[A]_{libre}$ (Ec. 17) considerando por ejemplo, un valor de $n=2$ (n en la Ec. 18) y luego, los valores de $\langle r \rangle$ (Ec. 21). El siguiente paso es graficar $\langle r \rangle$ vs. $[A]_{libre}$ ajustando dicho gráfico con la ecuación de la isoterma (Ec. 16) con dos términos (porque se ha considerado un valor de $n=2$ en la Ec. 18), para obtener los valores de las constantes de *binding*. En este paso, se puede emplear alguna herramienta de ajuste por cuadrados mínimos no lineales de algún programa de análisis gráfico. En nuestro caso, se utilizó la herramienta correspondiente del programa²⁷⁸ OriginPro 8.0. Es muy importante comparar los resultados suponiendo desde el principio uno, tres o varios sitios en lugar de dos en la Ec. 18. Posteriormente se define el mejor resultado, utilizando como criterio de selección aquel ajuste que presente un coeficiente de correlación (R^2) más cercano a la unidad y un menor error en las constantes de *binding* obtenidas.

II-3.2. DESACTIVACIÓN O QUENCHING DE FLUORESCENCIA DE HSA POR Gli Y Glip

Tal como se explicó en la sección anterior, para poder determinar los parámetros de *binding*, es necesario realizar experimentos de *quenching* de fluorescencia de HSA en presencia de los Andb en estudio.

El fenómeno de *quenching* de fluorescencia ocurre cuando la intensidad de emisión de un fluoróforo se ve disminuida por algún efecto. Los factores que pueden causar esta inhibición en la fluorescencia pueden ser la interacción molecular con algún agente específico, reacciones que ocurren en el estado excitado del fluoróforo, reordenamientos moleculares, transferencia de

energía, entre otros.²⁸² El *quenching* puede ser dinámico o estático, o una mezcla de ambos. Cuando es dinámico, el fluoróforo se desactiva a través de colisiones con el sustrato, mientras que en el caso de ser estático, el *quenching* ocurre por formación de un complejo no fluorescente en el estado fundamental. Generalmente, cuando se desea analizar qué tipo de mecanismo de desactivación está ocurriendo, se realiza un análisis de *Stern-Volmer* (Ec. 22):²⁸³

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [A] = 1 + K_{SV} [A] \quad (\text{Ec. 22})$$

[A] = concentración del desactivador (Andb).

I_0 = Intensidad de emisión del fluoróforo en ausencia del desactivador.

I = Intensidad de emisión del fluoróforo en presencia del desactivador.

k_q = constante de velocidad de desactivación bimolecular del estado electrónicamente excitado singlete del fluoróforo.

τ_0 = tiempo de vida del estado singlete electrónicamente excitado del fluoróforo en ausencia del desactivador.

K_{SV} = constante de *Stern-Volmer*.

Si al graficar I_0/I vs. [A] se obtiene una recta, se puede decir que se trata de una desactivación o estática o dinámica. A partir de la pendiente de dicho gráfico se puede calcular K_{SV} (estático) o k_q (dinámico). Para poder distinguir si el mecanismo es estático o dinámico, se pueden hacer los siguientes experimentos:

- Evaluar el *quenching* a diferentes temperaturas: un aumento en la temperatura favorece el mecanismo de desactivación dinámico o colisional, mientras que desfavorece la formación de un complejo fluoróforo-desactivador en el estado fundamental.
- Evaluar los tiempos de vida del fluoróforo: en el caso de *quenching* difusional, se cumple que $I_0/I = \tau_0/\tau$. En presencia del desactivador, el tiempo de vida del fluoróforo disminuye debido a que el *quenching* resulta ser un proceso adicional que contribuye a la despoblación del estado excitado. En cambio, en el caso del *quenching* estático, se cumple que $\tau_0/\tau = 1$. El tiempo de vida del fluoróforo no cambia porque la presencia del desactivador solo genera la formación de un complejo en el estado fundamental. De esta manera, el tiempo de vida que se detecta se debe a aquellas moléculas de fluoróforo en estado excitado que no estén formando el complejo y que se comportan de la misma manera que en ausencia del desactivador.

- Analizar los espectros de absorción: si los espectros de absorción del fluoróforo se modifican en presencia del desactivador, se puede inferir que el mecanismo de *quenching* es estático (ya que la formación del complejo fluoróforo-desactivador ocurre en el estado fundamental).

Estos experimentos pueden emplearse como guías básicas para discernir entre un mecanismo y otro. Sin embargo, la más confiable entre ellos es la evaluación de los tiempos de vida en presencia del desactivador.²⁸³

Por otro lado, puede ocurrir que el gráfico presente desviaciones hacia el eje de las abscisas o hacia el de las ordenadas. En estos casos se deben realizar otros tratamientos matemáticos de los datos que siguen modelos alternativos, para poder obtener los valores respectivos de K_{SV} .

Las soluciones de HSA fueron preparadas en solución reguladora de pH 7,4, considerando un peso de HSA de 66500Da. Las soluciones *stock* de Andb fueron preparadas utilizando un 10% de CH₃OH como co-solvente, debido a su escasa solubilidad en la solución reguladora. Es muy importante aclarar en este punto que esta proporción de CH₃OH no afecta la estructura ni la funcionalidad de la proteína.²⁸⁴ Las determinaciones de intensidad de fluorescencia y tiempos de vida de HSA fueron realizadas partiendo de una solución de proteína ($1 \times 10^{-5} M$) a la que se le hicieron agregados de Gli o Glip ($0-1 \times 10^{-4} M$), a diferentes temperaturas (entre 11°C y los 37°C). Para asegurar que la emisión de HSA proviniera solo de Trp y para evitar la interferencia de la emisión de tirosinas, se excitó a 295 nm.²⁸⁵

II-3.3. ANÁLISIS DE TIEMPOS DE VIDA DE FLUORESCENCIA

Tal como fue mencionado en la sección II-2.3, el análisis de tiempos de vida de fluorescencia se realizó en un equipo de conteo de fotón único (SPC). Para un dado fluoróforo, el histograma que proporciona este sistema, consiste en una convolución de dos funciones: la ley de decaimiento de la especie o función respuesta al impulso propia de la muestra $I(t)$, y la función de respuesta instrumental al pulso $L(t)$. La función $I(t)$, es la que se podría determinar cuando la excitación ocurre en un pulso de tiempo infinitamente corto δ . Sin embargo, todas las fuentes de excitación poseen un determinado ancho de pulso. Por ende, el haz de excitación podría considerarse como un conjunto de pulsos δ de diferentes amplitudes, que causarían diferentes respuestas. Por este motivo, la señal de decaimiento medida experimentalmente, $N(t)$, será la convolución de estas funciones respuesta generadas por el haz de excitación y la respuesta instrumental, tal como se expresa en la "Integral de convolución";

$$N(t) = \int_0^t L(t')I(t-t')\partial t' \quad (\text{Ec. 23})$$

La función de respuesta instrumental $L(t)$ se puede obtener registrado el perfil temporal de los pulsos de excitación bajo las mismas condiciones, solo que se reemplaza la muestra por una solución dispersante de luz, por ejemplo Ludox (silica coloidal).²⁸⁶ Luego, el análisis de los datos consiste en obtener una ley de decaimiento $I(t)$, que al ser convolucionada con la función de respuesta instrumental adquirida proporcione una función calculada de decaimiento $N_{\text{calc}}(t)$ que coincida lo mejor posible con los datos experimentales $N(t)$. El mejor ajuste se encuentra mediante un análisis matemático por cuadrados mínimos no lineales. A partir de la función $I(t)$ que proporcione el mejor ajuste, se obtienen el o los valores de tiempo de vida del fluoróforo en cuestión. Las expresiones propias de $I(t)$ más empleadas generalmente son modelos exponenciales de una o más componentes, dependiendo de la complejidad de emisión del fluoróforo.

II-3.4. ANÁLISIS DE PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE INTERACCIÓN

Como se detalló anteriormente, mediante las determinaciones de *quenching* de fluorescencia de HSA en presencia de Gli o Glip, se pueden construir las isotermas de *binding* que permitirán calcular finalmente las constantes de *binding* y estimar el número de sitios que los ligandos ocupan en HSA. Por otra parte, y para obtener más información respecto del proceso de asociación, se pueden analizar las interacciones que se ponen en juego en la interacción proteína-ligando, a través de la evaluación de los parámetros termodinámicos de la asociación. Para ello, se debe determinar la variación de las constantes de *binding* con la temperatura, y bajo la hipótesis de que los cambios entálpicos de interacción no varían significativamente en el intervalo de temperaturas estudiado, se puede emplear la ecuación de *Van't Hoff* (Ec. 24) para determinar los parámetros termodinámicos ΔH^0 y ΔS^0 de la interacción.²⁸⁷

$$\ln K_b = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R \quad (\text{Ec. 24})$$

donde R = constante de los gases y K_b = constante de *binding*

En base a los parámetros determinados de esta manera es posible calcular finalmente los valores de energía libre de interacción:

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \Delta S^{\circ} \quad (\text{Ec. 25})$$

II.3.5. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE HSA Y Andb

Los estudios de acoplamiento molecular (*docking*) se llevaron a cabo empleando²⁴⁴ ICM, versión 3.4. ICM permite realizar acoplamiento molecular, representando a las proteínas o receptores a través de cuadrículas de potenciales de interacción. Además, emplea un método de optimización global estocástico, el cual combina pasos posicionales *pseudo*-Brownianos y torsionales con una rápida minimización del gradiente local.

Las estructuras de Gli y Glip fueron obtenidas de la base de datos PubChem.²⁴⁷ Las mismas fueron protonadas y optimizadas empleando protocolos estándar de ICM. Por su parte, se realizó una búsqueda²⁸⁸ de moléculas de HSA co-cristalizadas con una serie de ligandos en la base de datos PDB.

Las estructuras analizadas fueron las siguientes (identificadas por sus correspondientes códigos pdb): 1AO6, 1E7C, 1GNI, 1HK3, 1UOR, 2BXD, 2BXK, 2BXQ, 1BJ5, 1E7E, 1GNJ, 1HK4, 1YSX, 2BXE, 2BXL, 1BKE, 1E7F, 1H9Z, 1HK5, 2BX8, 2BXF, 2BXM, 1BM0, 1E7G, 1HA2, 1N5U, 2BXA, 2BXG, 2BXN, 1E7A, 1E7H, 1HK1, 1O9X, 2BXB, 2BXH, 2BXO, 1E7B, 1E7I, 1HK2, 1TF0, 2BXC, 2BXI y 2BXP.

La estructura de HSA acomplejada con Warfarina (2BXD) fue empleada como receptor de Gli o Glip en los experimentos de acoplamiento.

La identificación de posibles sitios de *binding* se realizó utilizando la función *icmPocketFinder* de ICM, con una tolerancia de 4,6 por defecto. Este parámetro está relacionado con la flexibilidad del programa para la detección de sitios. Cuanto menor es el valor de este parámetro, mayor cantidad de sitios detectados, y viceversa. La elección de un valor de tolerancia de 4,6 se realizó según lo recomiendan los desarrolladores del programa.

Los cálculos se realizaron utilizando una función de puntuación propia de ICM y el parámetro de meticulosidad (*thoroughness*) empleado fue de 1.0 por defecto. Este parámetro está relacionado con la longitud del experimento de acoplamiento molecular.

Los análisis de acoplamiento se realizaron analizando los sitios I (subdominio IIA) y sitio II (subdominio IIIA), ya que son los sitios de *binding* más conocidos en HSA. También se analizó el

sitio extra, ubicado en la hendidura entre los dominios I y III. La elección de este sitio se realizó luego de analizar las capacidades de *binding* de la proteína, definida por estudios cristalográficos. Es decir, se analizaron las estructuras co-cristalizadas de HSA obtenidas de la búsqueda en *Protein Data Bank*, y mediante una superposición de dichas estructuras, se pudo observar una región donde se ubican una gran cantidad de ligandos. Esta región es coincidente con la cavidad correspondiente al sitio extra que se detecta con *icmPocketFinder*.

También se realizó un análisis de toda la proteína (acoplamiento molecular ciego).

La validación del método de acoplamiento molecular que se empleó para probar la unión de Gli o Glip a HSA se realizó de la siguiente manera. Se parte de la estructura co-cristalizada de HSA con un ligando determinado, el cual se sabe que está unido a un dado sitio de interés de la proteína. Luego se extrae la molécula de ligando y se utiliza el método de acoplamiento a validar, para probar la unión de dicho ligando a HSA. Si el método es adecuado, debería poder reproducirse el modo de unión de la estructura cristalográfica. Una forma de evaluar lo anterior consiste en la comparación de las estructuras tridimensionales cristalográficas de la proteína con el ligando en cuestión y la correspondiente obtenida mediante los experimentos de acoplamiento molecular, a través del valor de rmsd (root mean square distance). Este parámetro determina la distancia cuadrática promedio entre la posición de átomos equivalentes en dos estructuras que se comparan y se expresa en Amstrongs (Å). Cuando las estructuras son idénticas, el valor de rmsd es 0 Å, y va aumentando a medida que se presentan diferencias estructurales.²⁸⁹ De esta manera, si el valor de rmsd obtenido por comparación entre las estructuras es pequeño, se puede decir que el método reproduce adecuadamente la estructura cristalográfica y por lo tanto es válido.

II-3.6. FOTOOXIDACIÓN SENSIBILIZADA POR Rf

II-3.6.1. Interacción de los Andb con el estado singlete electrónicamente excitado de Rf (¹Rf*)

La interacción del estado singlete electrónicamente excitado de Rf (¹Rf*) con los Andb se investigó mediante medidas de fluorescencia estacionaria y resuelta en el tiempo. Los experimentos se realizaron empleando una solución de Rf (0,02 mM) en solución reguladora de pH 7,4 con 10% CH₃OH como co-solvente. Luego se fueron agregando alícuotas de solución *stock* de cada Andb, preparadas respectivamente en la misma solución de Rf.

En el caso de las medidas de fluorescencia estacionaria, se determinó la variación de la emisión fluorescente de Rf en ausencia y en presencia de Andb. Los espectros fueron registrados

en un fluorímetro (Materiales y Métodos, sección II-2.2) empleando una $\lambda_{exc} = 445$ nm y una $\lambda_{em} = 524$ nm.

Los tiempos de vida de fluorescencia de Rf en ausencia y en presencia de los Andb se determinaron por medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo, empleando el equipo de conteo de fotón único (SPC) descrito en la sección II-2.3. Se empleó una $\lambda_{exc} = 450$ nm y una $\lambda_{em} = 524$ nm.

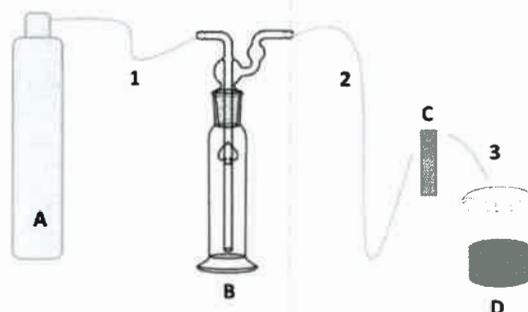
Los resultados obtenidos por experimentos de fluorescencia estacionaria y resuelta en el tiempo fueron evaluados mediante un análisis clásico de *Stern-Volmer* (Ec. 22), tal como se describió en la sección II-3.2.

II-3.6.2. Interacción de los Andb con el estado triplete electrónicamente excitado de Rf ($^3Rf^*$)

Por un lado, se realizó un estudio de las posibles interacciones entre el estado triplete electrónicamente excitado del sensibilizador Rf ($^3Rf^*$) con los Andb en estudio mediante la técnica de LFF. Para ello, se realizaron estudios de *quenching* de $^3Rf^*$ por cada Andb. La especie transitoria se generó con un pulso de excitación láser a 355 nm, y la determinación de los tiempos de vida se realizó a 670 nm, una longitud de onda a la que la interferencia de otras especies es despreciable. Estos decaimientos se determinaron en condiciones de baja concentración de Rf (0,02 mM) y baja energía del láser, para evitar procesos de auto-inhibición y aniquilación triplete-triplete, respectivamente.^{148,290} En todos los casos, se prepararon soluciones de Rf en solución reguladora de pH 7,4 y en CH₃OH. Los Andb se disolvieron primero en solución Rf/ CH₃OH y luego se llevó a volumen final con solución Rf/solución reguladora; la proporción final de CH₃OH fue 10% para Gli y Glip. Además, todas las determinaciones fueron realizadas en solución saturada con argón, para evitar la desactivación del estado $^3Rf^*$ por oxígeno (proceso [7] del Esquema 14).²⁹¹

Se caracterizaron también los espectros de $^3Rf^*$ en ausencia y en presencia de cada Andb, determinando los cambios de absorbancia de las especies transitorias a un tiempo fijo en función de la longitud de onda. En general, las determinaciones se efectuaron midiendo la señal cada 10 nm hasta cubrir el espectro completo (400-800 nm). En estos experimentos también se trabajó a bajas concentraciones de sensibilizador (0,02 mM) y la concentración empleada para ambos Andb fue 5×10^{-4} M. En este caso, como ya fue indicado, debido a que Rf es lábil a la luz se empleó un sistema de flujo con recambio de solución de Rf a cada λ , de manera que la solución analizada fuera siempre "fresca". El dispositivo (Esquema 19) consiste en una probeta de 250 mL provista de dos tubos de vidrio. Uno de ellos (conexión 1) se conecta a un tubo de gas argón, para mantener

la solución permanentemente saturada en este gas. El otro tubo (conexión 2) transporta la solución desgasada hacia la celda de análisis. Finalmente la conexión 3 permite el descarte de la solución, el cual se realiza a cada longitud de onda. Las mangueras conectoras que forman parte de este dispositivo son impermeables al oxígeno. Además, el dispositivo y sus conexiones se mantuvieron protegidos de la luz durante toda la experiencia. Un esquema aproximado del sistema se muestra a continuación:



Esquema 19: Diagrama del sistema de recambio de solución de Rf. **A:** Gas argón. **B:** Probeta de 250 mL adaptada a conexiones. **C:** Celda de medida. **D:** depósito de descarte. Conexiones: 1, 2 y 3.

II-3.6.3. Fotooxidación estacionaria: evaluación de la participación de EROs

En los experimentos de fotooxidación estacionaria, se prepararon soluciones de sensibilizador Rf en solución reguladora de pH 7,4. Respecto de este punto, es conocido que Rf es un compuesto altamente susceptible a la radiación y puede ser degradado a través de diferentes procesos.²⁹²⁻²⁹⁶ En este sentido, se ha demostrado que un factor de importancia en la velocidad de fotodegradación de Rf lo constituye el pH. Se sabe que Rf posee dos valores de pKa: 1,7 y 10,2, pudiendo existir consecuentemente en sus especies neutra, aniónica o catiónica, dependiendo del pH del medio.²⁹⁷ De esta manera, el pH puede afectar el estado de ionización de la molécula y por ende, su susceptibilidad a la excitación y la consecuente fotodegradación. Debido a que la selección del pH se realizó según las condiciones fisiológicas, en los experimentos de fotooxidación sensibilizada se trabajó en solución reguladora de pH 7,4. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se puede observar que la selección de este pH no afecta significativamente la fotodegradación propia de Rf, ya que la evidencia experimental indica que a pH neutro, la fotodegradación del sensibilizador es mucho menor que a pH alcalino²¹⁷.

La concentración de sensibilizador se ajustó empleando una absorbancia de 0,5 a 445 nm, correspondiente al máximo de absorción de Rf en el visible. Luego se utilizó una alícuota de esta solución para disolver el sustrato de interés. Para el caso de Gli y Glip, debido a su escasa

solubilidad en agua, primero se preparó una solución de Rf en CH₃OH. Su concentración se ajustó utilizando los mismos valores experimentales de absorbancia (lo más similar posible) que los obtenidos en solución reguladora. Se tomó una alícuota de la solución en CH₃OH del sensibilizador para disolver primero a los Andb. Luego se llevó a volumen final empleando la solución de Rf preparada en solución reguladora. La proporción final de CH₃OH en todos los casos fue de 10%. Las concentraciones de sustratos fueron del orden de 10⁻⁴ M. Los experimentos de fotooxidación en estado estacionario se llevaron a cabo en el equipo de fotólisis descrito en la sección II-2.4.

La participación de las diferentes EROs en la fotodegradación sensibilizada por Rf de los sustratos en estudio, puede evaluarse a través de las medidas de consumo de oxígeno en condiciones aeróbicas de fotoirradiación estacionaria en presencia de inhibidores específicos para cada ERO.

En este sentido, para confirmar la participación de O₂(¹Δ_g) se utilizó NaN₃, un conocido desactivador físico de esta especie excitada de oxígeno.^{200,172} Por su parte, la intervención de O₂^{•-} se evaluó utilizando la enzima SOD. Esta enzima ha sido ampliamente utilizada con propósitos cuali y cuantitativos como inhibidor de dicha especie oxidativa.²⁹⁸⁻³⁰⁰ La enzima CAT se empleó para evaluar la participación de H₂O₂.

Las velocidades relativas de consumo de oxígeno en presencia de los inhibidores fueron obtenidas a partir de las pendientes iniciales de los gráficos de consumo de oxígeno en función del tiempo de irradiación, relativizadas al consumo de oxígeno correspondiente en ausencia del inhibidor. Las concentraciones de Andb empleadas fueron 5x10⁻⁴ M para Gli y 2x10⁻⁴ M para Glip. Las concentraciones empleadas de inhibidores específicos fueron 5x10⁻³ M para NaN₃, y 1mg/100mL para los casos de SOD y CAT. Estas determinaciones fueron realizadas por duplicado y los resultados difieren en aproximadamente un 10%.

II-3.7. FOTOOXIDACIÓN SENSIBILIZADA POR PN

Se sabe que ciertos colorantes como Azul de Metileno y Rosa de Bengala, se asocian con HSA presentando modificaciones en sus propiedades físicas y fotoquímicas.³⁰¹ Es por ello que la selección de un sensibilizador en el caso de un sistema formado por ligando-HSA debe tener ciertas consideraciones respecto de la interacción entre el sensibilizador y la proteína. Por este motivo, como paso previo a los experimentos de fotooxidaciones sensibilizadas por PN, se realizó un estudio de la interacción entre el estado triplete electrónicamente excitado de PN (³PN*) y HSA, mediante la cuantificación de la constante de desactivación de ³PN* por HSA a través de la técnica

LFF. La especie transitoria del sensibilizador fue generada con un pulso de excitación láser a 355 nm y al igual que en las determinaciones con el sensibilizador Rf, se trabajó con soluciones saturadas con argón, a fin de evitar la desactivación del $^3\text{PN}^*$ por oxígeno. Los tiempos de vida de esta especie fueron registrados a 500 nm, una zona donde no existe interferencia con otras especies. El sensibilizador PN fue preparado en solución reguladora de pH 7,4 y su concentración ajustada a un valor de absorbancia entre 0,2-0,3 a la longitud de onda de excitación del láser. La solución *stock* de HSA (5×10^{-3} M) fue preparada utilizando la solución de sensibilizador como solvente.

Una vez descartada la interacción de HSA con $^3\text{PN}^*$ (como será demostrado más adelante en Resultados, sección III), se procedió al estudio de los procesos de fotodegradación de los sistemas HSA, Andb-HSA y Andb, sensibilizados por PN.

Con el fin de investigar la cinética de fotodegradación mediada por $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ de los sistemas Gli, Glip, HSA, Gli-HSA y Glip-HSA se determinaron las velocidades relativas de consumo de oxígeno bajo irradiación sensibilizada por PN. Se prepararon soluciones del sensibilizador PN de manera similar a la descrita en la sección II-3.6.1. En este caso, la concentración de PN se ajustó empleando una absorbancia de 0,5 a 365 nm, correspondiente al máximo de absorción de dicho sensibilizador en el visible. Es importante aclarar que para el caso de las soluciones de los sistemas Gli-HSA y Glip-HSA, el 10% de CH_3OH utilizado para mejorar la solubilidad de los Andb no afecta la estructura y funciones de la proteína.²⁸⁴ Las concentraciones utilizadas fueron Gli (5×10^{-4} M), Glip (2×10^{-4} M), HSA (5×10^{-4} M), Gli-HSA (5×10^{-4} M: 1×10^{-5} M) y Glip-HSA (2×10^{-4} M: 4×10^{-6} M). Las velocidades relativas de consumo de oxígeno fueron obtenidas a partir de las pendientes iniciales de los gráficos de consumo de oxígeno en función del tiempo de irradiación, relativizadas a la pendiente de HSA.

II-3.7.1. Determinación de la constante de velocidad de desactivación total de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$

La determinación de la constante de velocidad de desactivación total de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por Andb, Andb-HSA y HSA, $k_t = k_q + k_r$, (procesos [10] y [11] del Esquema 14, respectivamente) se puede estimar a través de la detección de la emisión de fosforescencia de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a 1270 nm (Time Resolved Phosphorescence Detection, TRDP, Materiales y Métodos, sección II-2.6).

Los valores de k_t fueron obtenidos mediante la determinación de los tiempos de vida de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de los sustratos estudiados.

La señal de decaimiento de fosforescencia de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ está dada por la siguiente ecuación:

$$I = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_0}} \quad (\text{Ec. 26})$$

donde I_0 y τ_0 son la intensidad de la señal y el tiempo de vida de $O_2 (^1\Delta_g)$ en ausencia del sustrato. El ajuste de las trazas del decaimiento a través de la Ec. 26 permite obtener el tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$.

En general, los puntos iniciales de la señal de decaimiento están perturbados por señales espúreas o fluorescencia residual del sensibilizador. Por esta razón, el análisis de la señal se realizó a partir de los 8-10 μs . Estos decaimientos no requieren de métodos de deconvolución puesto que tanto el ancho del pulso del láser de excitación, como el tiempo de respuesta (4-5 μs) no interfieren en los tiempos de vida de $O_2 (^1\Delta_g)$ (tiempos de aproximadamente 67 μs en D_2O).³⁰²

Para obtener el valor de k_t se utiliza la Ec. 29, que se deduce como se describe a continuación:

$$k_q = k_d + k_t [A] \quad (\text{Ec. 27})$$

Como $k_q = 1/\tau$ y $k_d = 1/\tau_0$, la Ec. 27 equivale a:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_t [A] \quad (\text{Ec. 28})$$

Reordenando se obtiene:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_t \tau_0 [A] \quad (\text{Ec.29})$$

Graficando τ_0/τ en función de $[A]$ y conociendo el valor de τ_0 (Ec. 29) se obtiene el valor de k_t a partir de la pendiente. Alternativamente, graficando $1/\tau$ en función de $[A]$ (Ec. 28), se puede obtener k_t a partir de la pendiente.

Las soluciones del sensibilizador PN fueron preparadas en solventes deuterados (D_2O y CD_3OD), tal como fue anteriormente indicado (Materiales y Métodos, sección II-2.6) a fin de aumentar el tiempo de vida de oxígeno singlete.³⁰³ La concentración de PN fue ajustada a un valor de absorbancia entre 0,2-0,3 a la longitud de onda de excitación del láser (355 nm). Para las determinaciones de k_t en presencia de los Andb puros, se prepararon soluciones *stock* de concentración 1×10^{-2} M, con 10% de CD_3OD . A partir de estas soluciones, se realizaron agregados de manera que las concentraciones de Andb empleadas fueron entre 0 y 2×10^{-3} M. Por otro lado, en las determinaciones de k_t para los sistemas Andb-HSA, se prepararon soluciones *stock* con concentraciones Andb-HSA de 1×10^{-3} M- 1×10^{-5} M. En este caso, se utilizó también sólo un 10%

de CD₃OD y la concentración de proteína se mantuvo siempre constante e igual a 1×10^{-5} M. Es importante aclarar que una concentración de 10% de CD₃OD no afecta la estructura ni las funciones de HSA.²⁸⁴ Las concentraciones de Andb empleadas fueron entre 0 y 5×10^{-4} M.

II-3.7.2. Estudio de los productos de fotooxidación de Andb mediada por O₂(¹Δ_g)

La identificación de los productos de fotooxidación mediada por O₂(¹Δ_g) fue especialmente estudiada para el caso de Gli, tomando a este Andb como arquetipo de la familia de sulfonilureas a las que pertenecen los compuestos en estudio. Para ello, se llevó a cabo la irradiación (estacionaria) con luz Visible de soluciones de Gli 5×10^{-4} M en un tubo de vidrio de 50 mL, utilizando como solvente una solución reguladora de pH 7,4 y 10% de CH₃OH como co-solvente, que contiene el sensibilizador PN cuya concentración se ajustó a una absorbancia de 0,5 a su máximo de absorción (365 nm). Con el objetivo de asegurar que la radiación fuera absorbida sólo por el sensibilizador, se empleó un filtro de corte ($\lambda = 320$ nm). Además las soluciones fueron continuamente agitadas y oxigenadas. Cada solución fue irradiada un determinado período de tiempo (60 y 90 minutos), a fines de comparar los productos obtenidos en cada caso. El análisis de fotoproductos se realizó por HPLC-Masa, tal como se describió en Materiales y Métodos, sección II-2.7.

II-3.7.3 Estudios de toxicidad *in vitro* de los productos de fotooxidación de Gli mediada por O₂(¹Δ_g)

Los análisis de toxicidad consisten en el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos deletéreos ocasionados por agentes físicos o químicos sobre la estructura y función de los sistemas vivos.

Existen diferentes formas de evaluar la toxicidad. Hasta hace algunos años la experimentación en animales era la técnica más utilizada. No obstante, en la actualidad el surgimiento de las sociedades protectoras de animales de experimentación ha llevado al desarrollo de técnicas alternativas. Dentro de la diversidad de ensayos *in vitro*, se encuentran aquéllos que permiten evaluar la toxicidad celular o "citotoxicidad". Ésta se define como una alteración de las funciones celulares básicas (integridad de la membrana y citoesqueleto celular, metabolismo, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular), que conlleva a la producción de un daño que pueda ser detectado mediante mecanismos celulares conocidos.³⁰⁴

Para evaluar la citotoxicidad existe una gran variedad de ensayos toxicológicos entre los que se destacan técnicas inmunológicas que permiten determinar la integridad del citoesqueleto (como la inmunofluorescencia indirecta (IFI)), el ensayo de determinación de pérdida de la enzima citoplasmática lactato dehidrogenasa (LDH), la visualización del daño morfológico celular, la cuantificación de proteínas, la técnica de captación del rojo neutro (RN) y la de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), entre otros.³⁰⁵

Para investigar la citotoxicidad de una dada sustancia, una herramienta muy útil es emplear modelos experimentales como cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares. Un ejemplo de estos cultivos es la línea celular Vero, la cual deriva de células de riñón de mono. Esta línea en particular, se adapta fácilmente a las condiciones de cultivo, lo cual es una importante ventaja en este tipo de experimentos. En este contexto, los resultados obtenidos a partir de la utilización de la línea celular Vero resultan de gran interés para evaluar el impacto que pueden tener las sustancias analizadas en humanos, ya que esta especie animal está filogenéticamente relacionada con el hombre.

Los estudios de toxicidad de los productos de fotodegradación mediadas por $O_2(^1\Delta_g)$ de Gli se llevaron a cabo en cultivos de células Vero, como se detallará a continuación.

II-3.7.3.a. Preparación de soluciones y medios de cultivo

❖ Cultivos celulares

En el desarrollo de las experiencias se empleó la línea celular Vero (riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) ATCC CCL-81, adquirida comercialmente en la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC) de la ciudad de Pergamino. Las células se mantuvieron en medio de crecimiento formando monocapas.

❖ Medio de crecimiento para células (MC)

El medio esencial mínimo de Eagle (MEM) fue preparado en solución salina balanceada de Earle (la cual contiene una gran variedad de sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas, entre otros componentes). A esta solución se le adicionó 10% de suero fetal bovino (SFB), (inactivado a 56°C por 30 minutos), 30 µg/mL de glutamina y 50 µg/mL de gentamicina. Este medio se encuentra a pH 7,2-7,4.

❖ Medio de mantenimiento para células (MM)

El medio esencial mínimo de Eagle (MEM) fue preparado en solución salina balanceada de Earle y contiene 2% de SFB (inactivado a 56°C por 30 minutos), 30 µg/mL de glutamina y 50 µg/mL de gentamicina y su pH fue de 7,2-7,4.

❖ Medio Tioglicolato

Este medio se preparó colocando 29 g de Tioglicolato Difco por cada 1000 mL de solución, utilizando agua destilada como solvente. Se esterilizó a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 20 min y se conservó a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su uso. Este medio se utilizó para el control de esterilidad de los distintos medios y soluciones empleados en los cultivos celulares.

❖ Solución de Azul Tripán al 0,5%

Se colocaron 0,5 g de Azul Tripán por cada 100 mL de solución, empleando agua bidestilada como solvente. Se disolvió por agitación y se conservó a 4°C.

❖ Solución reguladora de fosfatos (PBS)

Esta solución se preparó con 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂PO₄H -2 H₂O y 0,2 g de KPO₄H₂ por cada 1000 mL de solución, empleando agua bidestilada como solvente. La solución se fraccionó en frascos de 200 mL aproximadamente, se esterilizó a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 30 min y se conservó a 4°C hasta su uso.

❖ Solución de Bicarbonato de Sodio al 5%

Dicha solución se preparó colocando 5 g de NaCO₃H en 100 mL de solución, empleando agua bidestilada como solvente. Se disolvió por agitación y se fraccionó en tubos de ensayo. Se esterilizó a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 20 min y se conservó a 4°C hasta su uso.

❖ Solución de Gentamicina

Para esta solución, se colocaron 0,5 g de sulfato de Gentamicina por cada 100 mL de solución, utilizando agua bidestilada como solvente. Se esterilizó por filtración fraccionándose en pequeños volúmenes. Se conservó a 4°C hasta su uso.

❖ Solución de glutamina

Esta solución fue preparada colocando 3 g de Glutamina y 0,85 g de NaCl por cada 100 mL de solución, empleando agua bidestilada como solvente. Se agitó hasta disolución en baño a 37°C. Se esterilizó por filtración, se fraccionó y se conservó a -20°C hasta su uso.

❖ Solución de Rojo Fenol al 0,5%

Para esta solución se mezclaron 1 g de Rojo fenol, 50 mL de una solución de NaOH 0,05 N y agua bidestilada. Para obtener esta solución, primero se maceró el rojo fenol en un mortero con

un pequeño volumen de solución de NaOH 0,05 N, la cual se continúa agregando de a gotas hasta obtener una solución que mantuvo su color rojo intenso. Una vez disuelto el colorante, se ajustó a volumen un final de 200 mL con agua bidestilada. Se fraccionó en frascos color caramelo y se esterilizó a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 30 min. Se conservó a 4°C hasta su uso.

❖ Solución de Tripsina + EDTA 2X

Esta solución se preparó colocando 16 g de NaCl, 0,8 g de KCl, 2 g de Dextrosa, 1,16 g de NaCO₃H, 1,5 g de Tripsina y 0,4 g de Versene (solución de EDTA 0,2 g por litro de solución amortiguadora de fosfatos PBS), por cada 1000 mL de solución. Se utilizó agua bidestilada como solvente. Los componentes se disolvieron por agitación magnética, agregando luego 4 mL de rojo fenol al 0,5%. Se esterilizó por filtración y fraccionó en volúmenes de 50 mL. Luego de realizar controles de esterilidad en medio Tioglicolato, se conservó a -20°C hasta su uso.

❖ Soluciones de Gliclazida (Gli)

Las muestras de Gli fueron preparadas en solución reguladora de pH 7,4 (KH₂PO₄ 0,1M-NaOH 0,1M) como solvente principal y DMSO como co-solvente, en presencia de 9,9 µg/ml del sensibilizador PN. Debido a la escasa solubilidad de Gli en agua, se utilizó 1% de DMSO para la solución *stock* de Gli 161,7 µg/mL y 5% de DMSO para la solución *stock* de Gli 1617 µg/mL. No obstante, es importante aclarar que en todos los casos las concentraciones finales de DMSO fueron siempre menores a 1%, siendo de esta manera no nocivas para el cultivo celular.³⁰⁶

II-3.7.3.b. Preparación de los ensayos de citotoxicidad

Los cultivos celulares se hicieron crecer en policubetas de 96 pocillos a una densidad de 3x10⁴ células/pocillo en MC e incubados a 37°C durante 24 hs con el fin de obtener monocapas celulares. Transcurrido este tiempo, se analizó la posible citotoxicidad de las muestras. Para ello se descartó el MC de las monocapas celulares preformadas. Luego se agregaron diferentes volúmenes de muestra en cada pocillo, llevando a un volumen final de 200 µL con MM y se incubó por 48 horas.

Se realizaron simultáneamente dos ensayos. Uno de ellos consistió en un experimento "blanco" para evaluar la potencial citotoxicidad de las soluciones de sensibilizador en ausencia de Gli. Para ello, se incubaron las células con diferentes volúmenes de solución *stock* de PN 9,9 µg/mL en tres condiciones: sin irradiar e irradiadas por 60 y por 90 minutos. Las concentraciones finales de PN (en µg/mL) fueron 0,25; 0,5 ; 1,5; 2,5 y 4,95. En el otro ensayo, se evaluó la posible citotoxicidad de Gli y de sus productos de fotooxidación incubando las células con diferentes volúmenes de solución *stock* de Gli 161,7 µg/mL /PN 9,9 µg/mL en tres condiciones: sin irradiar

e irradiadas por 60 y por 90 minutos. Las concentraciones finales de Gli/PN (en $\mu\text{g/mL}$) fueron: 4,0 /0,25; 8,1/0,5; 24,2/1,5; 40,4/2,5 y 80,8/4,95. En ambos experimentos, cada tratamiento fue realizado por triplicado.

En una etapa posterior, debido a los resultados obtenidos, fue necesario concentrar la solución *stock* de Gli diez veces y mantener una concentración constante de PN. Nuevamente se evaluó la posible citotoxicidad del sistema Gli/PN y de sus fotoproductos. Se incubaron las células con diferentes volúmenes de solución *stock* de Gli 1617 $\mu\text{g/mL}$ / PN 0,5 $\mu\text{g/mL}$ en tres condiciones: sin irradiar, irradiadas durante 45 y por 75 minutos. Las concentraciones finales de Gli (en $\mu\text{g/mL}$) fueron: 4,00; 8,10; 24,2; 40,4; 80,8 y 121. Dado que se trabajó con una solución más concentrada de Gli, se disminuyeron los tiempos de irradiación en relación al experimento anterior, con el fin de obtener aproximadamente los mismos porcentajes de conversión. Cada tratamiento fue realizado por cuadruplicado.

En todos los casos, se utilizó como referencia un control celular, el cual consistió en monocapas celulares bañadas solamente con MM sin la muestra a analizar, como indicador de la morfología celular normal.

Los análisis de toxicidad celular fueron evaluados desde dos parámetros fundamentales: la máxima concentración no citotóxica (MCNC) y la concentración citotóxica que causa el 50% de muerte celular (CC_{50}). A continuación se describe detalladamente la determinación de ambos parámetros.

Determinación de la máxima concentración no citotóxica (MCNC):

Los cultivos incubados con las muestras a analizar fueron evaluados por su morfología celular a las 24 y a las 48 horas, al microscopio óptico invertido, con el propósito de detectar alteraciones tales como redondeamiento celular, presencia de granulaciones y/o vacuolización citoplasmática y desprendimiento celular. Se consideraron citotóxicas aquellas concentraciones de las muestras que generaron alteraciones morfológicas visibles al microscopio. La MCNC fue definida como la máxima concentración de cada muestra que no produjo ninguna alteración visible en la monocapa celular luego de 48 horas de incubación a 37°C, siendo éste el tiempo límite de observación^{306,307-}

Determinación de la Concentración Citotóxica 50% (CC₅₀) por ensayo de captación de Rojo Neutro (RN)

El ensayo de captación del RN es un experimento quimiosensible que evalúa la viabilidad celular, basada en la capacidad de las células viables de incorporar y unir el RN.³¹² Este es un colorante catiónico débil que penetra las membranas celulares por difusión no iónica, acumulándose en los lisosomas, donde se une con sitios aniónicos en la matriz lisosomal. Alteraciones de la superficie celular o de la membrana sensible del lisosoma conducen a una fragilidad lisosomal y a otros cambios que gradualmente se tornan irreversibles. Tales cambios provocados por la acción de xenobióticos resultan en una disminución de la captación y unión del RN. De esta manera es posible distinguir células muertas, dañadas y vivas.

Luego del período de incubación de las células con las muestras a analizar, las soluciones fueron removidas y las células fueron lavadas con 200 µL de PBS/pocillo. Luego se agregaron 200 µL/pocillo de la solución de RN (30 µg/mL en MEM) y la policubeta se incubó a 37°C por 3 hs para favorecer la incorporación del colorante por las células. Al cabo de ese tiempo las células fueron lavadas 3 veces con PBS. El colorante dentro de las células fue liberado por extracción con una mezcla de ácido acético, etanol y agua (1:50:49). Después de la agitación de los cultivos por 20 minutos, los valores de absorbancia se determinaron en un lector de microplacas (*Labsystems Multiskan MS* o *Bio-Tek, Elx 800*). Estos valores fueron determinados a 540 nm que corresponde al máximo de absorción en el visible del colorante RN.

La viabilidad relativa en los tratamientos fue expresada como porcentaje de disminución de RN captado con respecto a las células controles; y la fracción de supervivencia (FS) fue calculada según la siguiente fórmula:

$$FS = \frac{A_{540nm} \text{ Células tratadas}}{A_{540nm} \text{ Células control}} \times 100 \quad (\text{Ec. 30})$$

donde $A_{540 \text{ nm}}$ es la absorbancia de cada pocillo a 540 nm. Los valores de viabilidad obtenidos de esta manera fueron sometidos a análisis estadístico de regresión no-lineal, con un coeficiente de determinación >0,90, basado en la curva dosis-respuesta "Boltzman sigmoidal" y usando el programa *GraphPad Prism 5.0*. Los resultados representan la media de tres determinaciones.

II-3.8. ESTUDIOS DE LA INFLUENCIA DE GLUCOSA SOBRE LA INTERACCIÓN Andb-HSA Y LOS PROCESOS DE FOTODEGRADACIÓN MEDIADOS POR $O_2(^1\Delta_g)$

Se realizaron experimentos de *quenching* de fluorescencia en estado estacionario y a temperatura ambiente, para obtener los correspondientes parámetros de *binding* en presencia de glucosa. Cabe destacar que el análisis de los datos obtenidos en esta parte es igual al descrito en las secciones II-3.1 y II-3.2.

En primer lugar, se realizó un experimento para evaluar el efecto de glucosa sobre HSA. Para ello, se partió de una solución de proteína (1×10^{-5} M) a la que se hicieron agregados de glucosa ($0-1,3 \times 10^{-2}$ M). Para el caso de Gli o Glip, los experimentos de *quenching* de fluorescencia se realizaron partiendo de una solución de HSA (1×10^{-5} M) a la que se fueron realizando agregados de Andb ($0-1 \times 10^{-4}$ M) en presencia de glucosa $1,2 \times 10^{-2}$ M = 216 mg/dL (situación de hiperglucemia no muy grave), donde mg/dL se refiere a mg de glucosa por dL de sangre.²⁶²

Por otro lado, para estudiar el efecto de glucosa en la fotodegradación mediada por $O_2(^1\Delta_g)$, se llevaron a cabo experimentos de fotodegradación sensibilizada por PN de los sistemas Andb, HSA y Andb-HSA. Para ello, se determinaron las velocidades de consumo de $O_2(^1\Delta_g)$ sensibilizadas por PN para los sistemas Gli 5×10^{-4} M, Glip 2×10^{-4} M, HSA 1×10^{-5} M y las mezclas Gli-HSA (5×10^{-4} M: 1×10^{-5} M) y Glip-HSA (2×10^{-4} M: 4×10^{-6} M) en presencia de glucosa en cuatro concentraciones: 1×10^{-3} M, 5×10^{-3} M, $1,2 \times 10^{-2}$ M y $1,7 \times 10^{-2}$ M. La preparación de soluciones y las condiciones experimentales de medida fueron iguales a las detalladas en la sección II-3.7. Para completar este estudio, se determinaron los valores de la constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ (k_t) para los sistemas Gli, Gli-HSA, Glip, Glip-HSA en presencia de dos concentraciones de glucosa: 5×10^{-3} M y $1,7 \times 10^{-2}$ M. La elección de estos valores de concentración de glucosa fue realizada teniendo en cuenta dos condiciones a las que un paciente diabético puede encontrarse expuesto normalmente: glucemia normal (5×10^{-3} M = 90 mg/dL) e hiperglucemia ($1,7 \times 10^{-2}$ M = 300 mg/dL). Las soluciones fueron preparadas en las mismas condiciones y empleando la misma metodología descrita en la sección II-3.7.1.

III. RESULTADOS

III-1: CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA Andb-HSA

III-1.1. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS

Con el objeto de caracterizar las propiedades espectroscópicas de Gli, Glip y HSA, se registraron los espectros de absorción y fluorescencia de dichas especies en solución reguladora de pH 7,4. Los espectros de absorción de Gli, Glip y HSA se muestran en la Figura 3 A. Como puede observarse, Gli presenta un máximo característico a 226 nm mientras que Glip posee una banda a 225 nm y otra de menor intensidad a 278 nm. Por su parte, HSA presenta su banda típica de absorción³¹³ a 280 nm.

Por otro lado, se registraron espectros de emisión de fluorescencia para Gli y Glip, pero en ambos casos no se detectó emisión. Para HSA, el espectro de emisión fue tomado excitando a 295 nm y se muestra en la Figura 3 B.

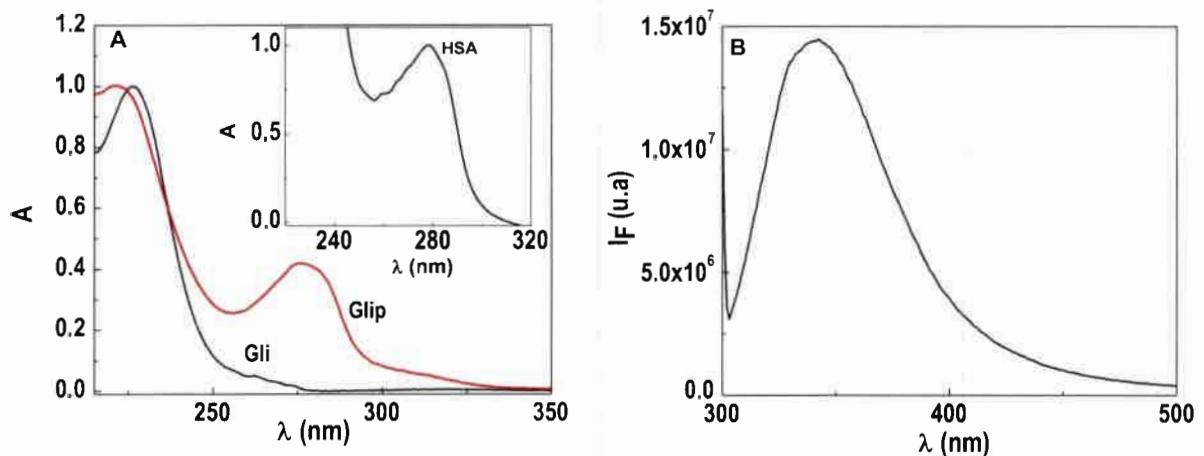


Figura 3: A: Espectros de absorción de: Gli normalizado a 226 nm (3×10^{-5} M), Glip normalizado a 225 nm (5×10^{-6} M) y HSA normalizado a 280 nm (3×10^{-6} M, inserto), en solución reguladora de pH 7,4 B: Espectro de emisión de HSA 1×10^{-5} M en solución amortiguadora pH 7,4; $\lambda_{exc} = 295$ nm.

III-1.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE Gli Y Glip CON HSA

III-1.2.1. ESTUDIOS MEDIANTE TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA

III-1.2.1.a. *Quenching* o desactivación de fluorescencia de HSA por Andb

Con el fin de obtener los parámetros de *binding* de la asociación Andb-HSA, se estudió el comportamiento de los espectros de emisión de fluorescencia de HSA ($\lambda_{exc} = 295$ nm) en presencia de Gli y Glip. En estos experimentos no fue necesario realizar correcciones por filtro interno, ya que la absorbancia de ambos Andb es despreciable a la longitud de onda de excitación. Se empleó una concentración de HSA 1×10^{-5} M, mientras que las concentraciones de Andb se variaron en el intervalo $0-1 \times 10^{-4}$ M. Estos experimentos fueron realizados a cuatro temperaturas: 12, 18, 26 y 35 °C para poder evaluar los parámetros termodinámicos de interacción.

Los resultados indican que existe una desactivación de la emisión de HSA por Gli y Glip a todas las temperaturas ensayadas. Los resultados para 26 °C se muestran en la siguiente figura:

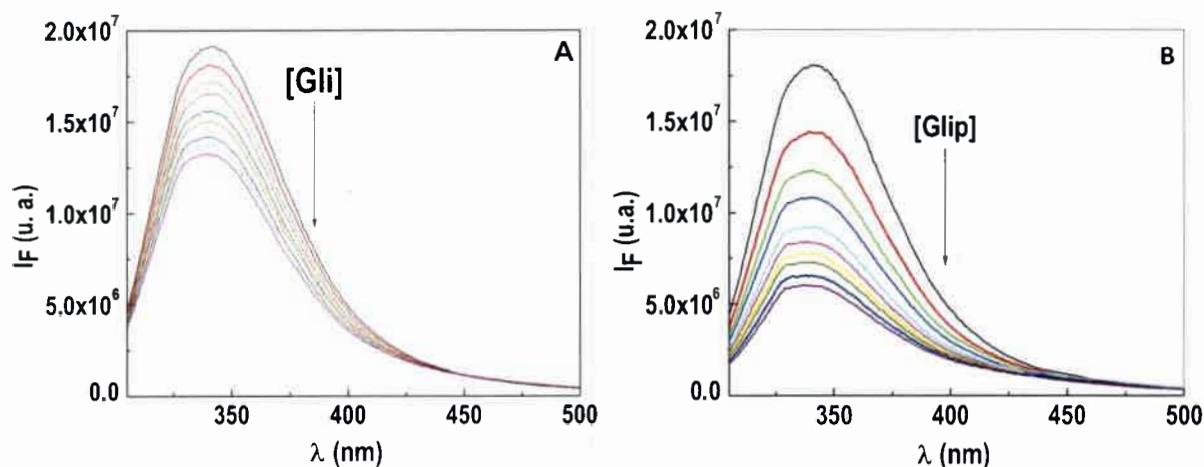


Figura 4: Espectros de emisión de fluorescencia de HSA (1×10^{-5} M), $\lambda_{exc} = 295$ nm, solución reguladora de pH 7,4; en presencia de diferentes concentraciones ($0-1 \times 10^{-4}$ M) de **A:** Gli y **B:** Glip.

Los resultados del análisis clásico de *Stern-Volmer*, obtenidos a partir de los espectros de emisión de HSA en presencia de diferentes concentraciones de Andb, a diferentes temperaturas se muestran a continuación:

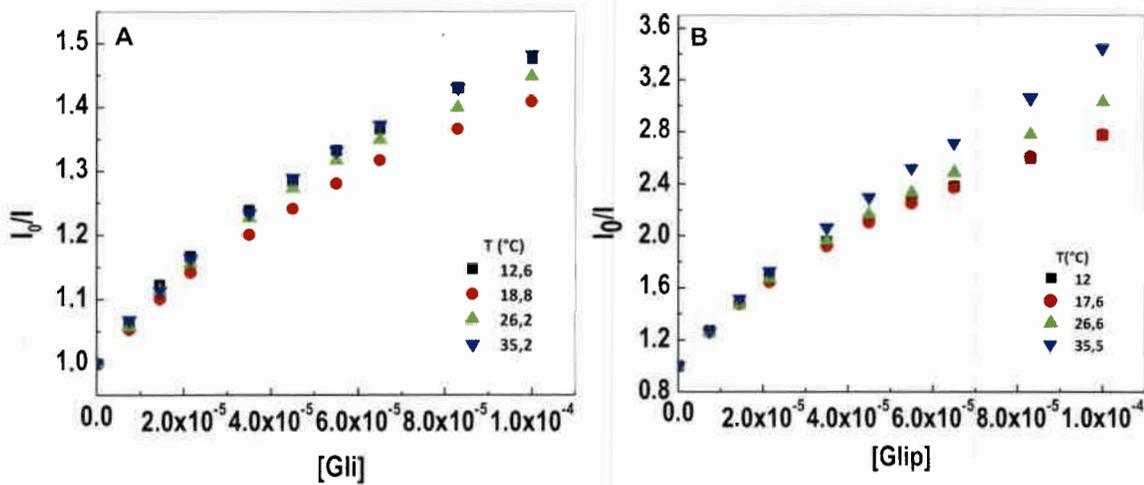


Figura 5: Gráficos del análisis clásico de Stern-Volmer a diferentes temperaturas. **A:** sistema Gli-HSA. **B:** sistema Glip-HSA.

Los gráficos del análisis clásico de *Stern-Volmer* (I_0/I vs. $[A]$, Ec. 22, Materiales y Métodos, sección II.3.2) muestran una desviación negativa para ambos Andb, y es observado para todas las temperaturas ensayadas. Este tipo de comportamiento ya ha sido evidenciado en la desactivación de fluorescencia de HSA por ciertos fármacos como Midazolam, Magnolol, Captopril, entre otros.^{84,314-323} En general este hecho ha sido justificado indicando la existencia de una población de fluoróforo que puede ser desactivada y otra que no, y los resultados se analizan según un tratamiento modificado de *Stern-Volmer*. Sin embargo, el origen de esta interpretación se basa en la existencia de varios fluoróforos (varios residuos de triptófano, por ejemplo), que pueden encontrarse en diferentes sitios de la proteína. Algunos podrán ser desactivados porque se encuentran accesibles al desactivador y otros no.³²⁴ Por lo tanto, esta interpretación podría no ser válida cuando se trata de una proteína como HSA que posee un único Trp. Una posible explicación a la curvatura hacia las abscisas del gráfico de *Stern-Volmer* puede ser que, la presencia de los sustratos no alcance a desactivar completamente la fluorescencia de HSA y/o que existan diferentes tipos de sitios de interacción en la proteína.³²⁵ En consecuencia, estos resultados forman parte de las primeras evidencias experimentales de una posible interacción entre HSA y los Andb.

Con el objeto de profundizar en el estudio del *quenching* de fluorescencia de HSA en presencia de los Andb, se realizaron determinaciones de fluorescencia resueltas en el tiempo. Los tiempos de vida de fluorescencia de HSA ($\lambda_{exc} = 295$ nm) fueron obtenidos a 25°C, en ausencia y

en presencia de diferentes concentraciones de Andb, en un equipo de conteo de fotón único (Materiales y Métodos, sección II-3.3). Los resultados se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 1: Tiempos de vida de fluorescencia de HSA con agregados de Gli a 25°C ($\lambda_{exc} = 295$ nm).

[Gli] (M)	τ (μ s) (25°C)	
0	$\tau_1 = 6,5 \pm 0,1$ (80%)	$\tau_2 = 1,8 \pm 0,1$ (20%)
$1,4 \times 10^{-5}$	$\tau_1 = 6,2 \pm 0,1$ (76%)	$\tau_2 = 1,8 \pm 0,1$ (24%)
$4,5 \times 10^{-5}$	$\tau_1 = 5,9 \pm 0,1$ (73%)	$\tau_2 = 1,7 \pm 0,1$ (27%)
$7,4 \times 10^{-5}$	$\tau_1 = 5,8 \pm 0,1$ (71%)	$\tau_2 = 1,6 \pm 0,1$ (29%)
1×10^{-4}	$\tau_1 = 6,0 \pm 0,1$ (67%)	$\tau_2 = 1,8 \pm 0,1$ (33%)

Tabla 2: Tiempos de vida de fluorescencia de HSA con agregados de Glip a 25°C ($\lambda_{exc} = 295$ nm).

[Glip] (M)	τ (μ s) (25°C)	
0M	$\tau_1 = 6,5 \pm 0,2$ (77%)	$\tau_2 = 1,8 \pm 0,2$ (23%)
$1,2 \times 10^{-5}$	$\tau_1 = 5,7 \pm 0,2$ (73%)	$\tau_2 = 1,8 \pm 0,2$ (27%)
$2,4 \times 10^{-5}$	$\tau_1 = 5,8 \pm 0,2$ (66%)	$\tau_2 = 1,9 \pm 0,1$ (34%)
$4,5 \times 10^{-5}$	$\tau_1 = 6,8 \pm 0,6$ (48%)	$\tau_2 = 2,4 \pm 0,2$ (52%)
$6,5 \times 10^{-5}$	$\tau_1 = 5,7 \pm 0,3$ (56%)	$\tau_2 = 2,1 \pm 0,2$ (44%)
$8,25 \times 10^{-5}$	$\tau_1 = 6,5 \pm 0,7$ (43%)	$\tau_2 = 2,4 \pm 0,2$ (57%)

Los resultados de las medidas de tiempos de vida de fluorescencia de HSA en ausencia y presencia de ambos Andb fueron ajustados adecuadamente con ecuaciones biexponenciales. Esto indica que el fluoróforo intrínseco de la proteína (Trp214) posiblemente estaría emitiendo desde conformaciones diferentes. Estas componentes ya han sido detectadas por otros autores y los valores obtenidos para ambas concuerdan con los ya reportados.^{324,326-331} En este sentido, una explicación al origen de estas componentes es la existencia de un equilibrio en solución de moléculas de HSA en dos conformaciones. En cada conformero, Trp214 tendrá un entorno distinto y en consecuencia, la emisión de fluorescencia resultará de una superposición de las emisiones provenientes de las diferentes conformaciones.

Como se puede observar en las tablas, los tiempos de vida de fluorescencia de la proteína mantienen sus valores relativamente constantes frente a los agregados tanto de Gli como de Glip.

Este comportamiento se encuentra asociado a un mecanismo de *quenching* estático, en el cual la formación de un complejo Andb-HSA no fluorescente en el estado fundamental, es la causa de la desactivación de fluorescencia de la proteína.

III-1.2.1.b. Determinación de los parámetros de *binding* de Andb-HSA

A partir de los resultados de *quenching* de fluorescencia de HSA por los Andb, se determinaron los parámetros de *binding* de la interacción Gli-HSA y Glip-HSA a las diferentes temperaturas ensayadas. Los datos fueron procesados tal como fue descrito en Materiales y Métodos sección II-3.1. Los gráficos de las isotermas de *binding* se muestran a continuación

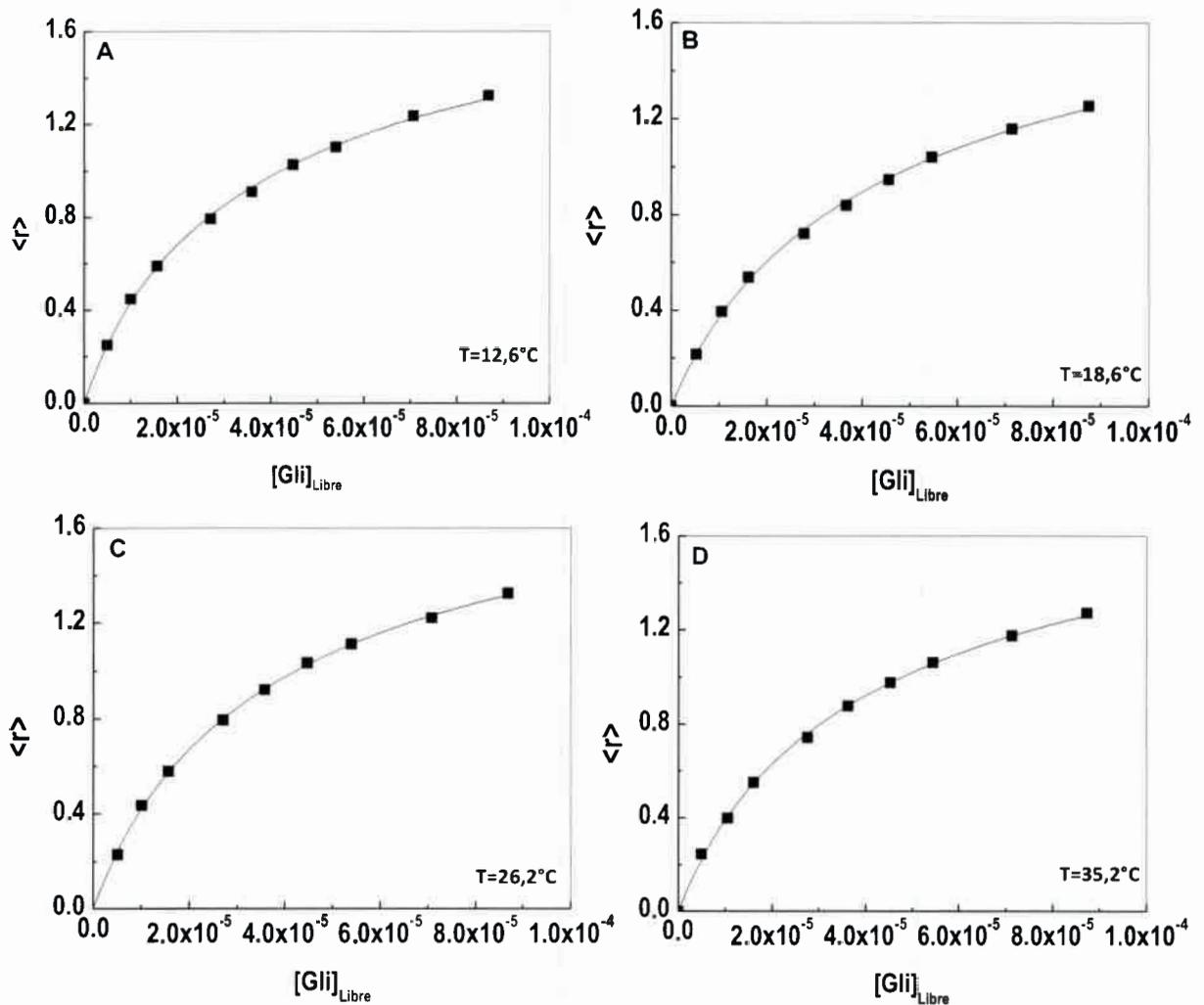


Figura 6: Isotermas de binding para la interacción Gli-HSA a diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$): A: 12,6. B: 18,6. C: 26,2. D: 35,2.

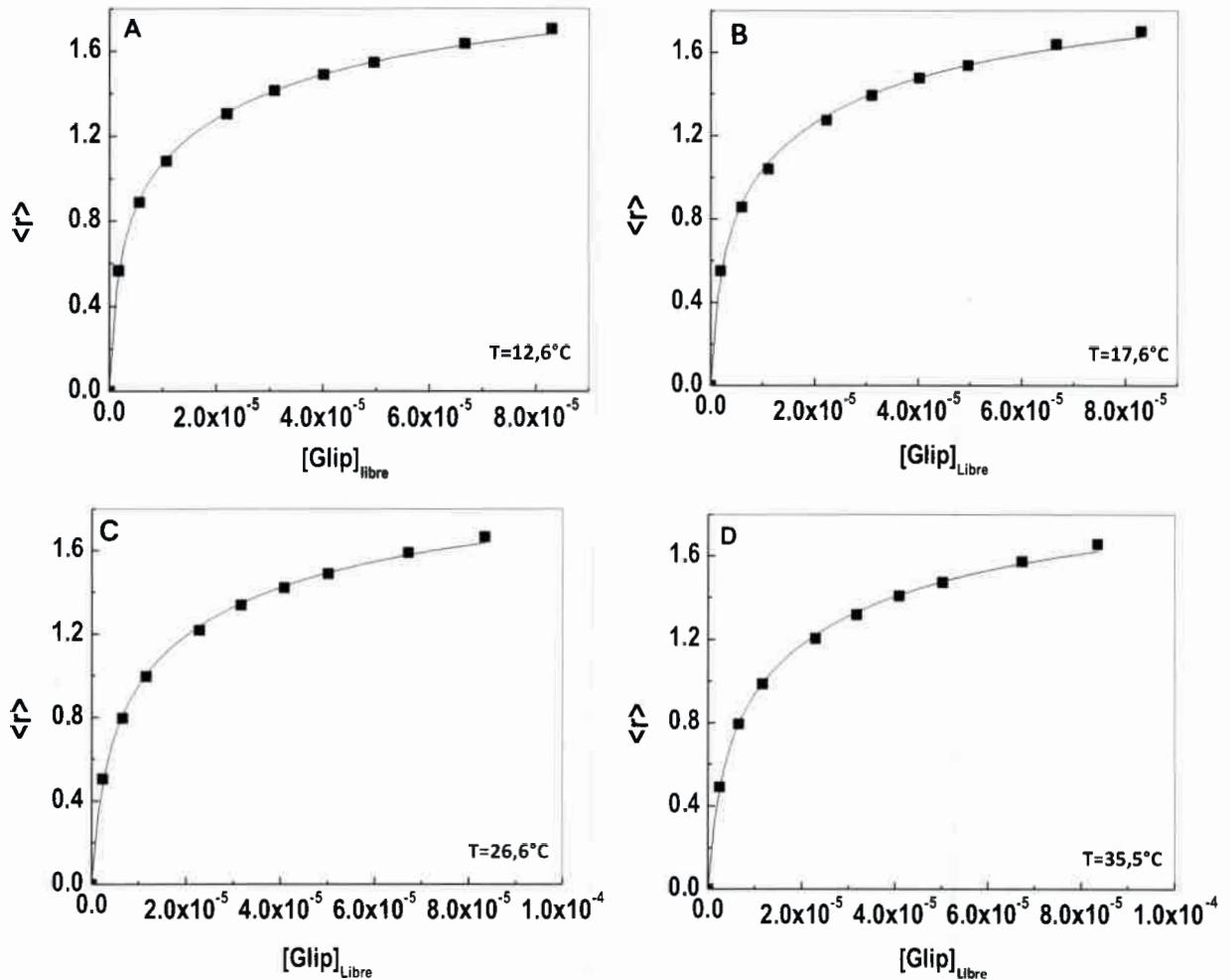


Figura 7: Isothermas de binding para la interacción Glip-HSA a diferentes temperaturas (°C): **A:** 12,6. **B:** 17,6. **C:** 26,6. **D:** 35,5.

Los resultados experimentales pudieron ajustarse adecuadamente cuando se suponen dos sitios de interacción, es decir $n=2$ en la Ec. 18 (Materiales y Métodos, sección II-3.1). Los ajustes correspondientes son las curvas rojas que se muestran en las Figuras 6 y 7. Esto significaría que tanto Gli como Glip interaccionan con HSA en dos sitios de *binding* diferentes. Las constantes de *binding* para las asociaciones Gli-HSA y Glip-HSA obtenidas a las diferentes temperaturas ensayadas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3: Constantes de *binding* para las interacciones Gli-HSA y Glip-HSA a diferentes temperaturas.

Andb	Temperatura (°C)	K_{bl} (M ⁻¹)	K_{bil} (M ⁻¹)
Gli	12,6	$(4,9 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,15 \pm 0,06) \times 10^4$
	18,8	$(3,8 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,02 \pm 0,06) \times 10^4$
	26,2	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,28 \pm 0,05) \times 10^4$
	35,2	$(4,2 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,03 \pm 0,06) \times 10^4$
Glip	12,6	$(5,8 \pm 0,3) \times 10^5$	$(2,83 \pm 0,07) \times 10^4$
	17,6	$(4,6 \pm 0,3) \times 10^5$	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^4$
	26,6	$(3,1 \pm 0,2) \times 10^5$	$(2,46 \pm 0,09) \times 10^4$
	35,5	$(2,9 \pm 0,1) \times 10^5$	$(2,32 \pm 0,07) \times 10^4$

Los valores de las constantes de *binding* mostrados en la Tabla 3 se encuentran dentro del orden de constantes de *binding* de HSA con otros fármacos (valores alrededor de 10^4 - 10^5 M⁻¹) informados en la literatura.²¹

Para la interacción Gli-HSA, los valores de las constantes de *binding* no varían de manera significativa con la temperatura, para ambos sitios de unión. Por su parte, en el caso de la unión de Glip a HSA, se puede observar una disminución en las constantes de *binding* a ambos sitios a medida que se incrementa la temperatura. Este comportamiento podría explicarse teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de la evaluación de los tiempos de vida de fluorescencia de HSA en presencia de los Andb (sección III-1.2.1.a). En estos experimentos se observó que la desactivación de la emisión de la proteína ocurre por formación de un complejo Andb-HSA no fluorescente en estado fundamental (*quenching* estático). Por ende, al aumentar la temperatura, la formación del complejo Glip-HSA se estaría desfavoreciendo, por lo que lo cual se observa una disminución en las K_b en función de la temperatura. Además, esta tendencia en los valores de K_b con la temperatura concuerda con los signos de ΔH° de interacción, como se discutirá más adelante.

III-1.2.1.c. Determinación de los parámetros termodinámicos de interacción Andb-HSA

A partir de la variación de la constante de *binding* (K_b) entre un ligando y una proteína con la temperatura, es posible obtener los parámetros termodinámicos de dicha interacción. Luego, a través de un análisis de los valores de estos parámetros es posible deducir la naturaleza de las interacciones que predominan entre la proteína y el ligando. En este sentido, se ha propuesto un

modelo hipotético termodinámico que explica las contribuciones energéticas que se ponen en juego en el proceso de asociación, que ocurre en dos pasos.³³² El primero representa una asociación hidrofóbica e inmovilización parcial o cambios en el estado de las moléculas de solvente cuando se forma el complejo. Y, el segundo paso, incluye otro tipo de interacciones intermoleculares como electrostáticas, de Van der Waals, puentes de hidrógeno que se establecen en la asociación. Finalmente, el valor resultante de ΔG° del proceso de asociación, estará determinado por las magnitudes relativas de ΔH° y ΔS° en cada paso.

Dado que los valores de K_b de Gli-HSA no variaron significativamente con la temperatura en el intervalo ensayado, no fue posible determinar los parámetros termodinámicos de dicha interacción. En consecuencia, solo se muestran los resultados para el caso de la interacción Glip-HSA, la cual presenta variación en K_b respecto de la temperatura.

Específicamente, los valores de ΔH° y ΔS° correspondientes a cada sitio se calcularon en función del gráfico de $\ln K_b$ vs. $1/T$ (Ec. 24, Materiales y Métodos, sección II-3.4). Los valores de ΔG° se calcularon mediante la Ec. 25 (Materiales y Métodos, sección II-3.4) a 25 °C. Estos resultados se muestran en el gráfico de la Figura 8 y los valores de los parámetros termodinámicos se encuentran resumidos en la Tabla 4.

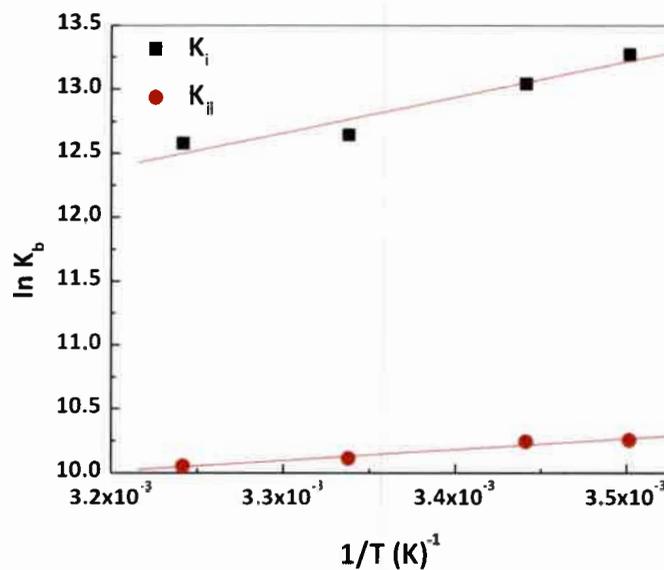


Figura 8: Gráfico de la ecuación de Van't Hoff para el cálculo de parámetros termodinámicos de interacción Glip-HSA.

Tabla 4: Parámetros termodinámicos de interacción Glip-HSA.

Sitio	ΔH° (Kcal/mol)	ΔS° (cal/molK)	ΔG° (Kcal/mol)
Sitio I	-5,4	7,0	-7,5
Sitio II	-1,6	15	-5,9

‡ Los valores de ΔG° fueron determinados a 25°C.

Como puede observarse en la Tabla 4, se obtuvieron valores muy grandes y negativos para ΔH° y positivos para ΔS° , para ambos sitios de interacción. En consecuencia, el valor negativo resultante para ΔG° indica que el proceso de asociación de Glip a HSA en ambos sitios es espontáneo. Los valores negativos de ΔH° para ambos sitios de interacción, indican que la asociación es exotérmica, de manera que un aumento en la temperatura podría generar una disminución en los valores de K_b , tal como se observó en los resultados obtenidos en la sección anterior. A su vez, los altos valores de ΔH° indican que además el proceso se encuentra entálpicamente controlado.

Tal como ha sido propuesto en el análisis de los signos y valores de los parámetros termodinámicos de interacción proteína-ligando,³³² valores negativos de ΔH° pueden ser relacionados a interacciones de Van der Waals o puentes de hidrógeno. En este sentido, se conoce que Glip es una de las sulfonilureas con mayor capacidad de formar puentes de hidrógeno (9 grupos donadores de protones y 3 grupos aceptores de protones).⁷ Por este motivo, es probable que este tipo de interacción sea el predominante en la asociación Glip-HSA.

Por otro lado, los valores positivos de ΔS° pueden deberse a la contribución energética de las interacciones hidrofóbicas, relacionadas al primer paso del modelo de asociación proteína-ligando que incluye la reorganización de las moléculas de solvente alrededor del ligando y de la proteína.

De esta manera, el signo de ΔS° podría explicarse en términos de un aumento de los estados accesibles del sistema, cuando las moléculas de solvente se reestructuran alrededor del complejo Glip-HSA, respecto del sistema cuando dichas especies se encuentran aisladas.

Finalmente, sería importante realizar una aclaración en este punto. Mediante el análisis de *binding* que se ha realizado utilizando espectroscopia de fluorescencia, se puede tener una idea del número de sitios donde el ligando se une en la proteína y de los valores de K_b . Sin embargo, no es posible identificar cuáles son dichos sitios y por lo tanto asignar cada constante a un sitio en

particular. Con el objeto de obtener mayor información respecto de los sitios involucrados en el proceso de *binding* Andb-HSA y completar estos estudios, se realizaron experimentos de acoplamiento molecular. Los resultados se muestran a continuación.

III-1.2.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN Andb-HSA MEDIANTE ENSAYOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR (*DOCKING*)

Los resultados que se presentan en esta sección fueron obtenidos en colaboración con el grupo de la Dra. Paola Beassoni, del Departamento de Biología Molecular, Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC).

III-1.2.2.a. Detección de cavidades:

En primer lugar, se identificaron las cavidades en HSA con la aplicación “*icmPocketFinder*” del programa³³³ ICMPro. A continuación se muestran dichas cavidades y particularmente las que fueron seleccionadas en este estudio:

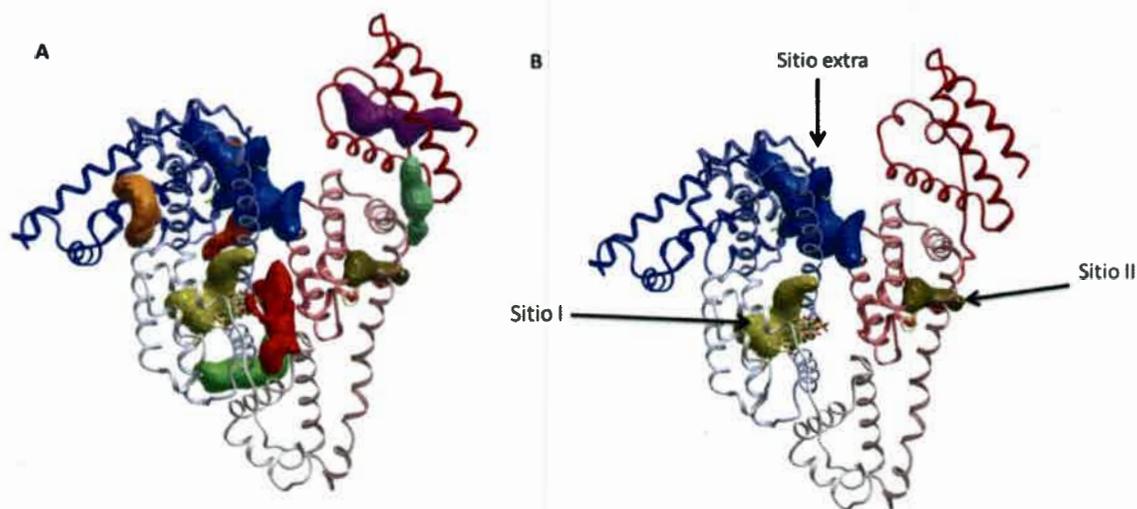


Figura 9: A: Cavidades detectadas por “Pocket Finder” de ICM en HSA (Código pdb: 2BXD). B: Identificación de los sitios empleados para realizar acoplamiento molecular con Gli y Glip (sitio I, sitio II y sitio extra).

III-1.2.2.b. Validación del método

El método fue validado por comparación de las posiciones de los ligandos Warfarina, Diazepam y Azapropazona obtenidas por acoplamiento molecular en los sitios I, II y en el sitio

extra de HSA, respectivamente, con las posiciones de estos ligandos en las correspondientes estructuras cristalográficas 2BXD, 2BXF y 2BX8. Los resultados indican que Warfarina, Diazepam y Azapropazona se unen al sitio I, II y al sitio extra de HSA, respectivamente. Por su parte, los valores hallados para la desviación de la media cuadrática (*root mean square distance*, rmsd) fueron de 1,33 Å para Warfarina, 0,86 Å para Diazepam y 1,87 Å para Azapropazona. Estos resultados indican que las estructuras propuestas por el método a validar, acuerdan bien con las estructuras de estos compuestos co-cristalizados con HSA. Este experimento previo, no solo ayuda a confirmar el funcionamiento del método, sino que además le otorga confiabilidad a los resultados.

En la Figura 10 se muestran a modo de ejemplo, los resultados para Warfarina. En la Figura 10A se observa la unión de este fármaco al sitio I de HSA obtenida por acoplamiento molecular; en la Figura 10B se muestra la superposición de las estructuras de Warfarina en el sitio I de HSA, obtenida por acoplamiento molecular y co-cristalizada con la proteína.

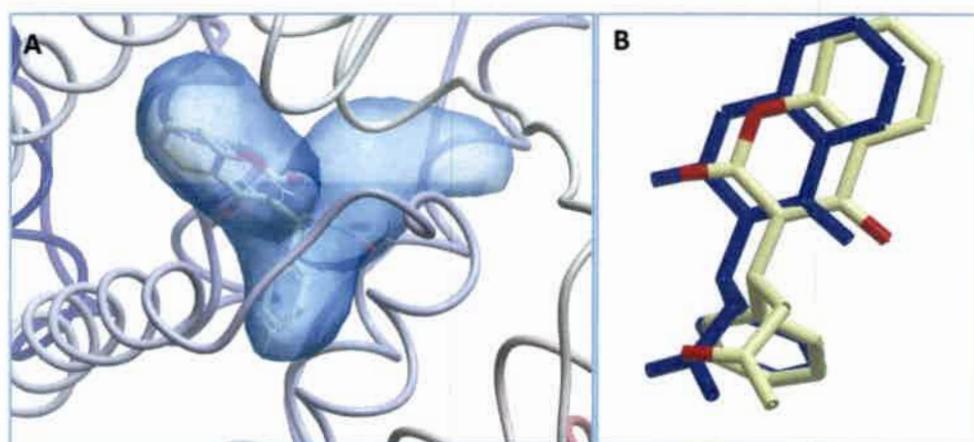


Figura 10: **A:** Ubicación de Warfarina en el sitio I de HSA empleando el método de Docking a validar. **B:** Estructuras de Warfarina en el sitio I de HSA. En blanco y rojo: Warfarina cristalográfica. En azul: Warfarina obtenida por acoplamiento molecular.

III-1.2.2.c. Resultados de acoplamiento molecular para Gli-HSA

Unión de Gli al sitio I:

La unión Gli en el sitio I de HSA fue evaluada realizando cálculos de acoplamiento molecular sobre este sitio. El mismo se encuentra localizado en el subdominio IIA de HSA (Figura 1, Introducción, sección I-3.6) y está constituido por los residuos Tyr150, Glu153, Phe157, Glu188, Ala191, Ser192, Lys195, Gln196, Lys199, Phe211, Trp214, Ala215, Arg218, Leu219, Arg222, Phe223, Leu238, His242, Arg257, Leu260, Ala261, Ile264, Ser287, His288, Ile290, Ala291 y

Glu292. La entrada a este sitio se distingue por una densidad de carga prominente, debido a la influencia de residuos aminoacídicos cargados. Por su parte, la zona interna se encuentra cubierta de cadenas hidrocarbonadas que le otorgan un carácter hidrofóbico.

Como se observa en la Figura 11, la molécula de Gli no se acomoda completamente en la cavidad de este sitio. Sin embargo, esta conformación tiene una energía de unión favorable (-81,1 Kcal/mol). Esto puede deberse a que el ligando queda en una región que se encuentra expuesta al solvente, sin colisiones o impedimentos estéricos con otras cadenas laterales. Aun así, puede considerarse que la unión a este sitio es poco probable, ya que al no entrar la molécula de Gli completamente en la cavidad, no habrá una suficiente interacción proteína-ligando que mantenga al Andb unido en esta zona.

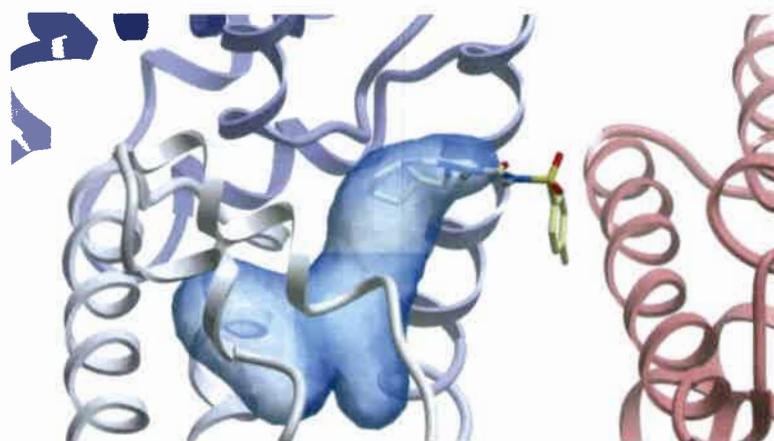


Figura 11: Acoplamiento molecular localizado de Gli en el sitio I de HSA.

Unión de Gli al sitio II:

De igual manera que se realizó con el sitio I, se analizó la unión de Gli inspeccionando el sitio II. Este se encuentra formado por los residuos Leu387, Ile388, Gln390, Asn391, Phe403, Leu407, Arg410, Tyr411, Lys414, Leu430, Val433, Ala449, Leu453, Arg485 y Ser489. En este caso, el sitio se caracteriza por poseer un potencial electrostático positivo y carácter hidrofóbico en la zona interna. Los resultados indican que la molécula de Gli se acomoda bien en dicha cavidad y presenta una energía de unión muy favorable (-80,4 Kcal/mol), como se puede observar en la Figura 12.

Se puede notar la predominancia de interacciones hidrofóbicas con el grupo perhidrociclopenta[c]pirrol de Gli, como también interacciones del tipo catión- π entre el residuo Arg410 y el anillo bencénico del Andb con una distancia promedio de 4,3 Å. Además se pudo

detectar una interacción puente de hidrógeno entre el O3 del grupo urea de Gli (Figura 42, sección V-1, Apéndice) y el grupo oxidrilo de Ser489.

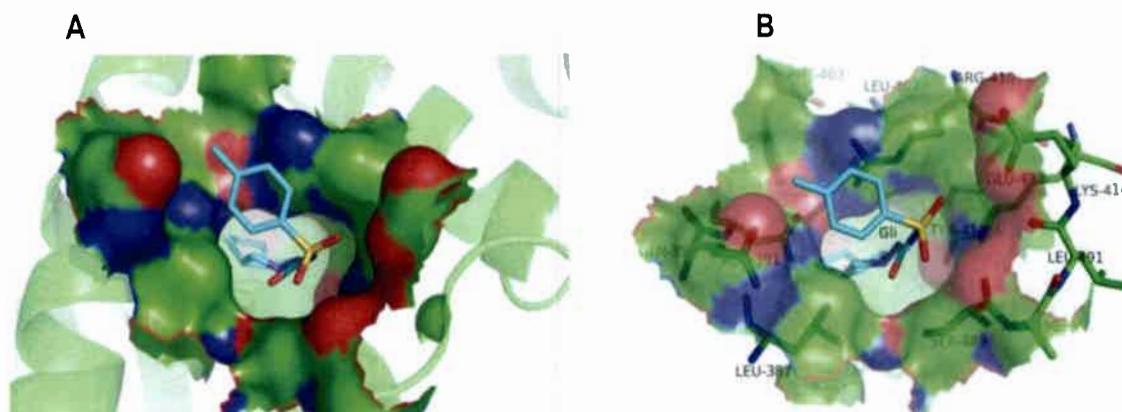


Figura 12: **A:** Acoplamiento molecular de Gli (representada en colores por tipo de átomo: turquesa para carbono, amarillo para azufre, azul para nitrógeno y rojo para oxígeno) en el sitio II de HSA. **B:** imagen del sitio II con Gli en su interior y los residuos aminoácidos más próximos al Andb.

Unión de Gli al sitio extra:

También se realizaron experimentos de acoplamiento molecular analizando el sitio extra. Este sitio se encuentra localizado entre el subdominio IB y el IIIA de HSA (Figura 1, Introducción, sección I-3.6) y es una de las cavidades más amplias de la proteína. Se encuentra constituido por los residuos Asp108, Asn109, Pro110, Leu112, Leu115, Val116, Arg117, Pro118, Met123, Phe134, Lys137, Tyr138, Glu141, Ile142, Arg145, His146, Pro147, Tyr148, Phe149, Tyr161, Leu182, Leu185, Arg186, Asp187, Gly189, Lys190, Ala191, Ser193, Ala194, Arg197, Glu425, Asn429, Lys432, Tyr452, Val456, Gln459, Val462 y Leu463. La mayoría de ellos le otorgan a este sitio una densidad de carga positiva y carácter hidrofóbico.

En este caso, se obtuvieron dos posibles conformaciones. La conformación de energía más favorable (-94,3 Kcal/mol, Figura 13 A) se encuentra estabilizada por puentes de hidrógeno que se forman entre el grupo sulfonil y el grupo amino de Lys190, y entre O3 y N1 del grupo urea de Gli (Figura 42, sección V-1, Apéndice) y los grupos amino de Glu425, Gln459, Asn429. Además, se observaron interacciones del tipo π - π entre His416 y el anillo bencénico de Gli.

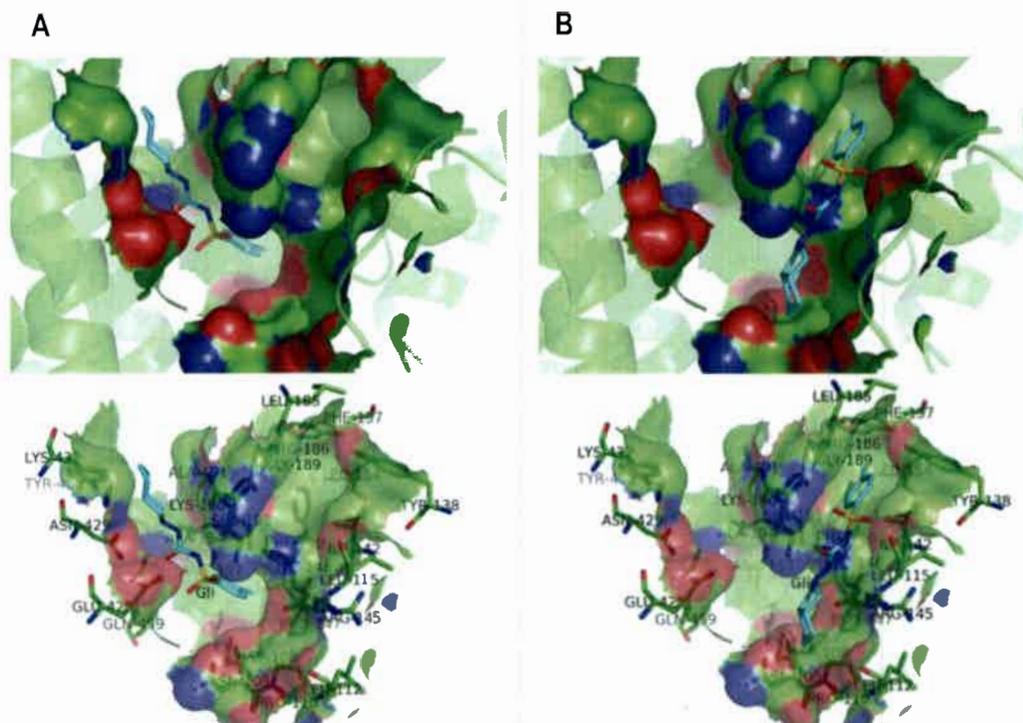


Figura 13: Acoplamiento molecular de Gli en el sitio extra: la mejor conformación se muestra en A y una conformación alternativa se muestra en B. Gli se representa coloreada por tipo de átomo y el sitio de *binding* está representado por superficies sólidas y transparentes. En los paneles inferiores se observan los residuos aminoacídicos más próximos al Andb.

Por otro lado, se obtuvo una segunda conformación con una energía favorable de -86,5 Kcal/mol (Figura 13 B). En este caso, las interacciones que estabilizan al conformero son puentes de hidrógeno entre el O3 y N1 del grupo urea de Gli (Figura 42, sección V-1, Apéndice) con el residuo Lys190, como también interacciones hidrofóbicas alrededor del anillo bencénico del Andb.

En la Figura 14 se muestran en colores por tipo de átomo y superpuestos los ligandos co-cristalizados que se unen a este sitio, y en rojo, la conformación de Gli seleccionada.

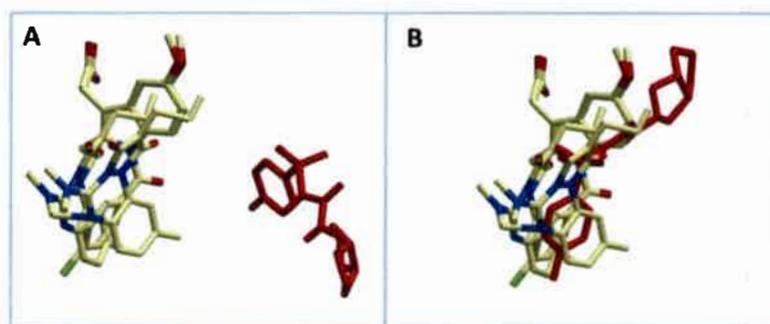


Figura 14: Superposición de ligandos co-cristalizados (Azapropazona e Indometacina) que se unen al sitio extra en colores por tipo de átomo y en rojo Gli: **A:** en la conformación de la Figura 13 A. **B:** en la conformación alternativa de la Figura 13 B.

Si bien ambas conformaciones presentan energías similares, la superposición que tiene la conformación B (-86,5 Kcal/mol) con los ligandos Azapropazona e Indometacina cuya interacción ha sido determinada experimentalmente (ligandos co-cristalizados en estructuras cristalinas 2BXQ, 2BXM, 2BX8 y 2BXI) permite suponer que esta conformación es la esperable para Gli.

Pruebas de acoplamiento molecular ciego para Gli

En los experimentos de acoplamiento molecular ciego se exploran todas las regiones de la proteína sin acotar el estudio a una zona particular. Cuando se realiza este análisis en HSA con Gli, se observa que este Andb se une en el sitio extra, pudiendo asumir dos conformaciones posibles (Figura 15 A y B). Estas conformaciones no solo son muy similares a las que se obtienen para Gli cuando solo se analiza el sitio extra sino que además poseen también energías de unión muy similares (-94,6 Kcal/mol y -94 Kcal/mol). Este resultado era previsible considerando que el sitio extra es mucho mayor que el resto de los sitios.

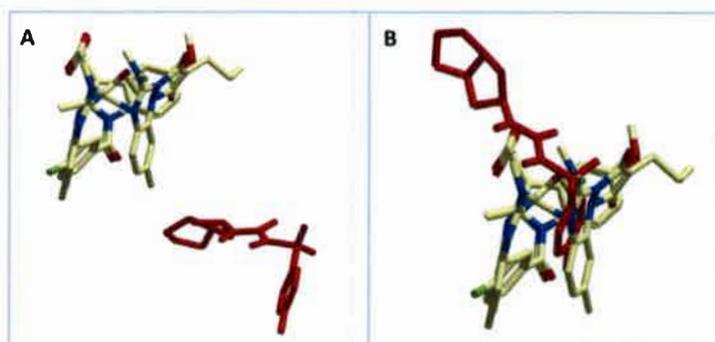


Figura 15: Acoplamiento molecular ciego de Gli en el sitio extra de HSA. **A y B:** Conformaciones posibles de Gli cuando se une al sitio extra. Las estructuras en colores por tipo de átomo corresponden a ligandos co-cristalizados (Azapropazona e Indometacina) en este sitio de HSA

III-1.2.2.d. Resultados de acoplamiento molecular para Glip-HSA

Unión de Glip al sitio I:

La unión de Glip se estudió de igual manera a lo descrito para Gli, y los resultados fueron similares. Como se observa en la Figura 16, Glip no se acomoda completamente en este sitio, aunque presenta una energía de unión favorable (-113,5 Kcal/mol). A pesar de ello, se puede observar que la mayor parte de la molécula queda expuesta fuera del sitio, de manera que las interacciones Glip-HSA que se pueden establecer no serán suficientes para mantener unido al Andb en este sitio.

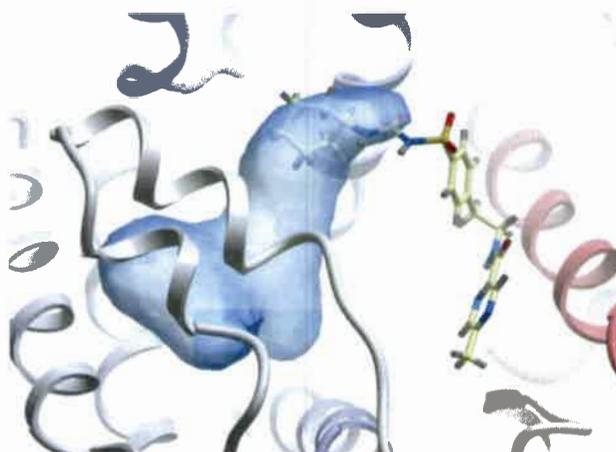


Figura 16: Acoplamiento molecular de Glip mapeando el sitio I de HSA.

Unión de Glip en el sitio II:

Los resultados de acoplamiento molecular mapeando el sitio II indican que al igual que Gli, Glip se localiza bien en la cavidad de este sitio, presentando una energía de unión favorable (-101,04 Kcal/mol). En este caso, se establecen interacciones hidrofóbicas con el grupo metilpirazida de Glip.

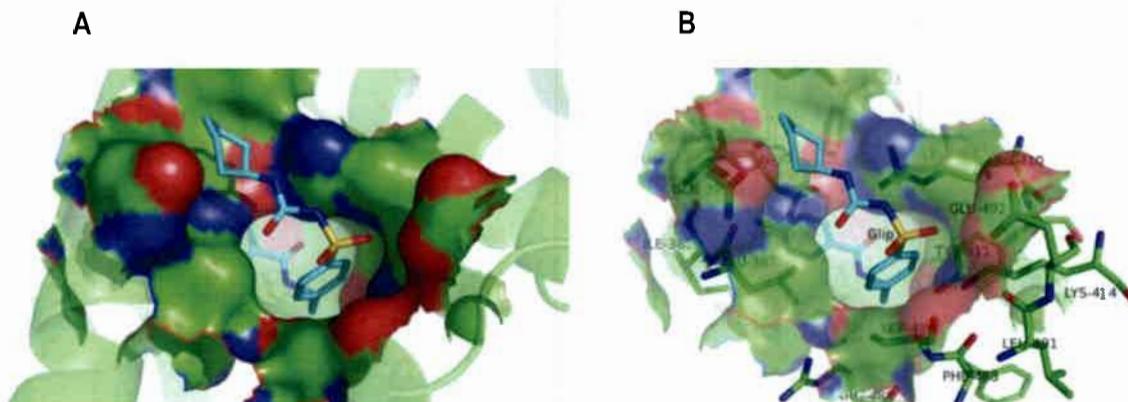


Figura 17: A: Acoplamiento molecular de Glip (representada en colores por tipo de átomo) en el sitio II de HSA. B: imagen del sitio II con Glip en su interior y los residuos aminoacídicos más próximos al Andb.

Unión de Glip en el sitio extra:

Analizando este sitio, se puede observar que Glip logra tomar una buena localización en esta cavidad, asumiendo dos conformaciones posibles. Tal como se observó con Gli, las energías de unión fueron muy similares y favorables: -122,0 Kcal /mol y -120,4 kcal/mol, respectivamente (Figura 18 A y B). El primer conformero se estabiliza por interacciones puente de hidrógeno entre el O1 y N2 del grupo urea, N5 del grupo metilpirazida de Glip (Figura 42, sección V-1, Apéndice) con los residuos Lys190, Arg145 y Tyr138. También se pudo detectar una interacción tipo catión- π a una distancia promedio de 3,7 Å entre el anillo aromático de Glip y el grupo amino del residuo Lys190. En el caso del segundo conformero, se observan cuatro puentes de hidrógeno entre el O1 del grupo urea, O3 del grupo sulfonil, N3 y O4 del conector amido de Glip (Figura 42, sección V-1, Apéndice) con los residuos Tyr161, Arg117, Arg186 e His146, y una interacción catión- π a una distancia promedio de 4,1 Å entre el anillo metilpirazida de Glip y el residuo Lys190.

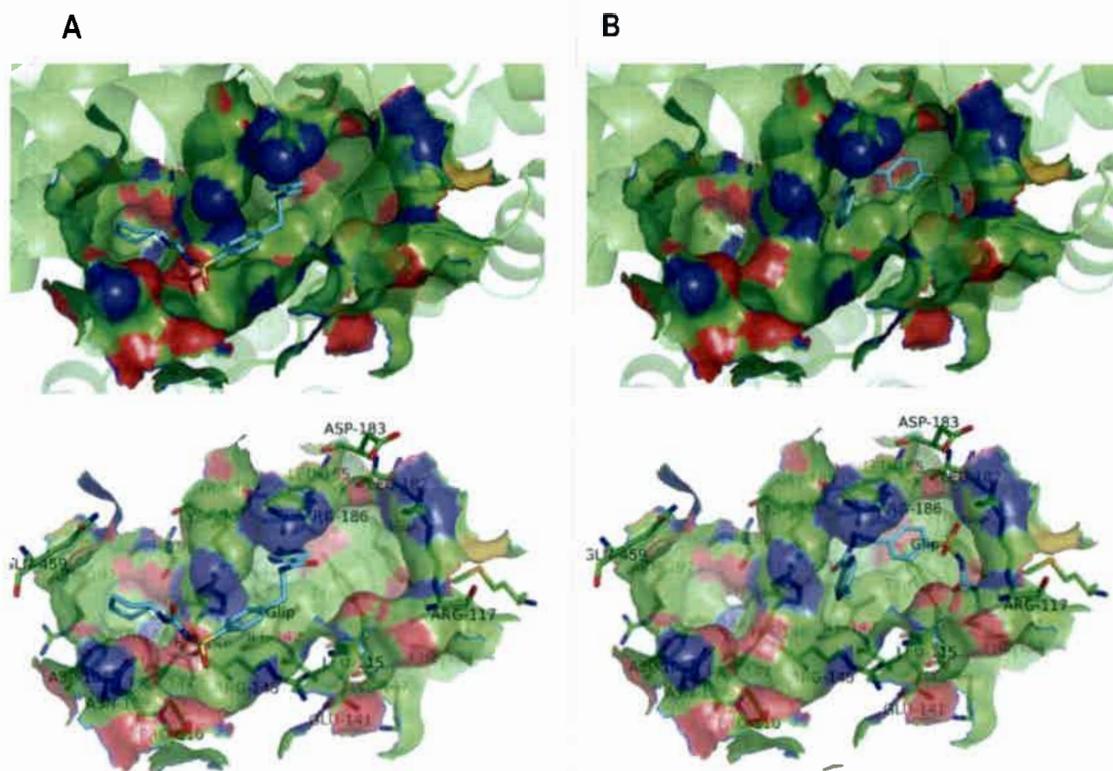


Figura 18: Acoplamiento molecular de Glip en el sitio extra: la mejor conformación se muestra en A y una conformación alternativa se muestra en B. Glip se representa coloreada por tipo de átomo y el sitio de *binding* está representado por superficies sólidas y transparentes. Los paneles inferiores muestran los residuos aminoácidos más cercanos al *Andb* en cada conformación.

En la Figura 19 se observan en colores por tipo de átomo, superpuestos los ligandos co-cristalizados (Indometacina y Azapropazona) que se unen a este sitio y en rojo, la conformación de Glip seleccionada.

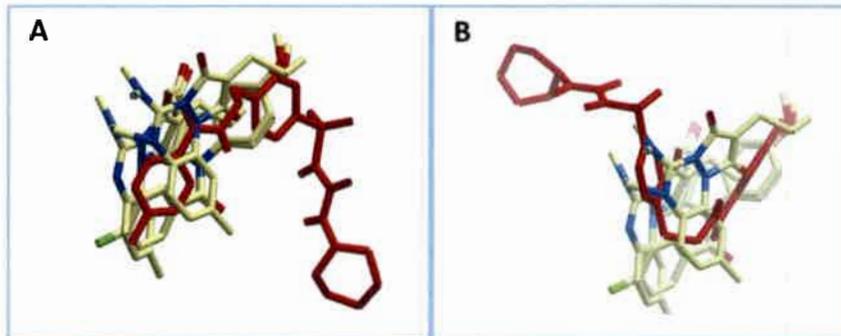


Figura 19: Superposición de ligandos co-cristalizados (Azapropazona e Indometacina) que se unen al sitio extra (en colores por tipo de átomo) y Glip (en rojo); **A:** cuando Glip se encuentra en la conformación de la Figura 18A y **B:** cuando Glip se encuentra en la conformación alternativa de la Figura 18B.

Pruebas de acoplamiento molecular ciego para Glip:

Cuando se analiza la unión de Glip a HSA realizando acoplamiento molecular ciego, se observa que el Andb se une al sitio extra, asumiendo dos conformaciones posibles (Figura 20 A y B) con energías favorables (-121,7 Kcal/mol y -111 Kcal/mol, respectivamente). También en este caso, estas conformaciones son similares a las que Glip puede tomar en el caso de los resultados de acoplamiento molecular explorando el sitio extra.

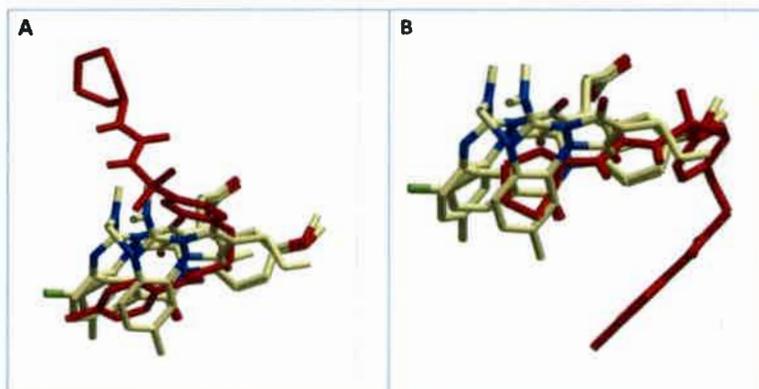


Figura 20: Acoplamiento molecular ciego de Glip en el sitio extra de HSA. **A y B:** Conformaciones posibles de Glip cuando se une al sitio extra. Las estructuras en colores por tipo de átomo corresponden a ligandos co-cristalizados (Azapropazona e Indometacina) en este sitio de HSA.

En resumen, los resultados de acoplamiento molecular sugieren la asociación de dos moléculas de Gli o Glip a HSA, una en el sitio II y otra en el sitio extra. Este último comprende una gran cavidad ubicada en el dominio I de HSA, entre los dominios I y III (Figura 1, Introducción, sección I-3.6). Este sitio ha sido descrito por otros autores como un sitio preferencial para varios fármacos, ya que existen indicios (sugeridos por estos mismos autores) de que los factores estéricos juegan un rol muy importante en el transporte de drogas por HSA.³³⁴

Finalmente, es importante destacar que existen varios fármacos que, al igual que Gli o Glip, pueden interactuar con HSA uniéndose en dos sitios, como lo son Azapropazona o Indometacina que se unen a los sitios I y extra de HSA, o Ibuprofeno que se une a los sitios I y II de HSA.

III-1.3. CONCLUSIONES

- ❖ Los experimentos de *quenching* de fluorescencia indican que ambos Andb son capaces de desactivar la emisión de fluorescencia de HSA, mediante la formación de un complejo no fluorescente en estado fundamental.
- ❖ El análisis clásico de *Stern-Volmer* para Gli-HSA y Glip-HSA presenta una curvatura hacia el eje de las abscisas, que puede explicarse mediante la posibilidad de que los Andb no desactiven completamente la emisión de HSA y/o a la existencia de diferentes tipos de sitios de interacción en la proteína.
- ❖ Las isothermas de *binding* pudieron ser ajustadas suponiendo dos sitios de interacción en HSA, y los valores de las constantes (K_b) obtenidos fueron del orden de 10^4 - 10^5 M⁻¹. Estas constantes no presentan una dependencia con las temperaturas ensayadas para el caso de Gli, mientras que para Glip se observó una disminución en K_b con el aumento de la temperatura.
- ❖ Los parámetros termodinámicos obtenidos para la interacción Glip-HSA indican que el proceso de asociación es espontáneo, exotérmico y que va acompañado de un aumento en la entropía del sistema. A partir de los valores de ΔH° y ΔS° se puede inferir que la asociación ocurre principalmente mediante puentes de hidrogeno y/o interacciones hidrofóbicas.
- ❖ Los estudios de la interacción Andb-HSA por acoplamiento molecular, indican que tanto Gli como Glip se asocian a los sitios II y extra de HSA. Estos estudios sugieren la formación de puentes de hidrogeno, interacciones de tipo catión- π e interacciones hidrofóbicas entre los ligandos y los sitios de *binding*.

**III-2: ESTUDIO DEL PROCESO DE FOTOOXIDACIÓN
SENSIBILIZADA DE LOS SISTEMAS Andb, HSA Y Andb-HSA**

III-2.1. FOTOOXIDACIÓN SENSIBILIZADA POR Rf

Dos aspectos relevantes indican la importancia del análisis de los procesos de fotodegradación sensibilizada por Rf de los Andb en estudio. Uno de estos aspectos es la potencialidad que Rf ha demostrado como fotosensibilizador a través de reacciones que involucran tanto la participación de radicales libres, incluyendo algunas EROs como OH^{\bullet} , o H_2O_2 (mecanismo Tipo I), o la formación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$, (mecanismo Tipo II). El otro aspecto consiste en el hecho de que Rf como constituyente del grupo vitamínico B2, ha sido postulada como un sensibilizador natural viable en los procesos de fotodegradación *in vivo* de una gran variedad de sustratos presentes en diferentes organismos, o consumidos externamente por éstos.²⁹⁵

Para investigar los procesos de fotodegradación de Gli y Glip en presencia de Rf, se realizaron en primer lugar, experimentos de fotoirradiación estacionaria de soluciones del sensibilizador y los Andb, y se determinaron los espectros UV-Visible de dichos sistemas en función del tiempo de irradiación.

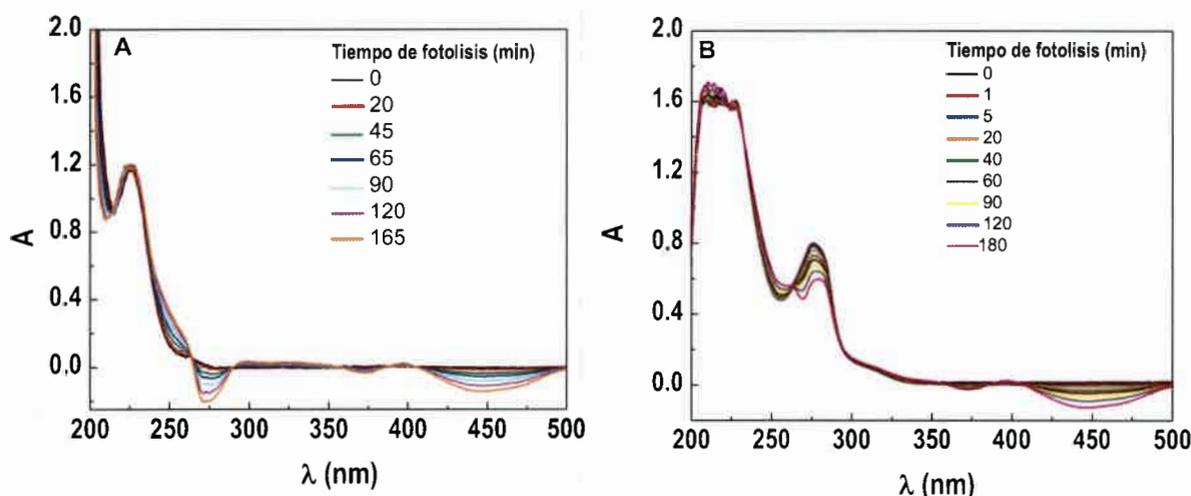


Figura 21: Espectros de absorción en función del tiempo de irradiación aeróbica del sistema **A:** Gli 1×10^{-4} M. **B:** Glip 1×10^{-4} M. Los espectros de ambos Andb fueron determinados vs. el solvente: Rf ($A_{445\text{nm}} \sim 0,5$)/solución reguladora de pH 7,4+ CH_3OH (2%).

Como se observa en la Figura 21, la irradiación estacionaria con luz visible del sistema Andb/Rf ($A_{445\text{nm}} \sim 0,5$)/solución reguladora pH 7,4+ CH_3OH (2%) en condiciones aeróbicas produce modificaciones en los espectros de absorción de la mezcla, tanto en la zona típica de absorción de los Andb como de Rf. Estos resultados pueden ser interpretados en términos de posibles transformaciones químicas que afectan a ambas especies.

También se realizaron experimentos de irradiación estacionaria anaeróbica (solución saturada con argón) de Rf en ausencia y en presencia de los Andb para evaluar las modificaciones en los espectros absorción del sensibilizador en función del tiempo de irradiación.

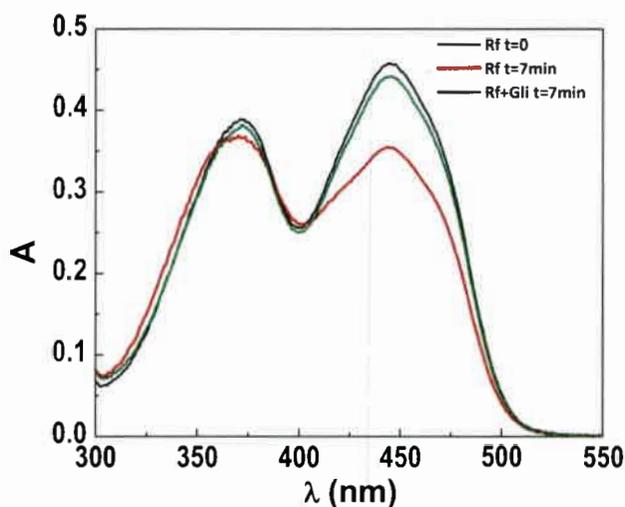


Figura 22: Espectros de absorción del Rf (en solución reguladora de pH 7,4+ CH₃OH 10%) sin irradiar e irradiada 7 minutos, en ausencia y en presencia de Gli 5x10⁻⁴ M. Estas determinaciones se realizaron en solución saturada con argón.

En la Figura 22 se puede observar una clara disminución en la banda de absorción de Rf (a 445 nm) cuando la muestra es irradiada en condiciones anaeróbicas. Esta disminución se atribuye a la fotodegradación del sensibilizador, que en ausencia de oxígeno se sabe²⁹⁵ que procede desde el estado electrónicamente excitado triplete de Rf (³Rf). Sin embargo, se puede notar que la velocidad de fotodegradación es menor en presencia de Gli que en ausencia de la misma. Un comportamiento similar fue observado cuando se utiliza Glip.

Estos últimos resultados y las modificaciones en los espectros de absorción de los sistemas Rf/Andb bajo irradiación aeróbica, son fuertes evidencias de posibles interacciones de los estados excitados del sensibilizador con los Andb. Además, las modificaciones observadas en los espectros de absorción en la zona típica de los Andb (Figura 21) podrían indicar la participación de EROs producidas como consecuencia de la irradiación aeróbica de Rf, en la fotodegradación de los Andb.

Para profundizar en estas hipótesis, se investigaron las posibles interacciones de los estados singlete y triplete electrónicamente excitados de Rf con los Andb y se evaluó la participación de

EROs en la fotodegradación de los Andb. Los resultados de estos experimentos se muestran en las siguientes secciones.

III-2.1.1. INTERACCIÓN DE LOS Andb CON LOS ESTADOS ELECTRÓNICAMENTE EXCITADOS DE Rf

III-2.1.1.a. Interacción de los Andb con el estado singlete electrónicamente excitado de Rf ($^1Rf^*$)

La evaluación de la interacción del estado $^1Rf^*$ (proceso [3] del Esquema 14) con los Andb, se realizó mediante experimentos de desactivación de fluorescencia de Rf (fluorescencia estacionaria) y por determinación de tiempos de vida del estado $^1Rf^*$ (fluorescencia resuelta en el tiempo). Cabe aclarar que en la preparación de soluciones *stock* de Andb en estos casos, se utilizó 10% de CH_3OH como co-solvente. En la Figura 23 y en la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos.

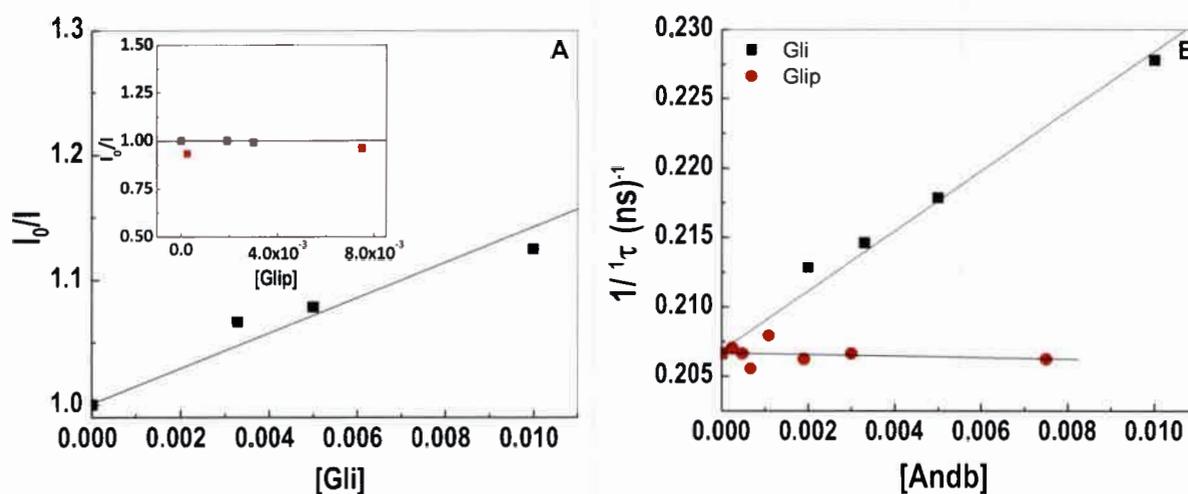


Figura 23: A: Principal: Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de $^1Rf^*$ (fluorescencia estacionaria) por Gli **Inserto:** Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de $^1Rf^*$ (fluorescencia estacionaria) por Glip. **B:** Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación del $^1Rf^*$ (fluorescencia resuelta en el tiempo) por Gli y Glip. $\lambda_{exc} = 445nm$; $\lambda_{em} = 520nm$. $[Rf] = 0,02$ mM en solución reguladora de pH 7,4/ CH_3OH (10%).

Tabla 5: Constantes de velocidad de desactivación de $^1Rf^*$ (1k_q) y $^3Rf^*$ (3k_q) por Gli y Glip en solución reguladora de pH 7,4/CH₃OH (10%). τ_0 $^1Rf^*$ = 5 ns. NQ: no se observó *quenching*.

Compuesto	$^1k_q \times 10^{-8} (M^{-1}s^{-1})$	$^3k_q \times 10^{-8} (M^{-1}s^{-1})$
Gli	20	9,9
Glip	NQ	4,0

Los resultados indican una interacción entre Gli y $^1Rf^*$. Los valores de 1k_q determinados para la interacción Gli- $^1Rf^*$ mediante fluorescencia estacionaria y resuelta en el tiempo fueron similares, dentro de un 10% de error. Sin embargo, podría afirmarse que dicha interacción resulta despreciable en las condiciones experimentales de trabajo ($[Gli] \sim 10^{-4} M$). Por su parte, Glip parece no interaccionar con $^1Rf^*$ en el intervalo de concentraciones ensayadas. Este comportamiento pudo ser observado tanto por fluorescencia estacionaria como resuelta en el tiempo. Figura 23 (A y B).

III-2.1.1.b. Interacción de los Andb con el estado triplete electrónicamente excitado de Rf ($^3Rf^*$)

La interacción de $^3Rf^*$ con Andb se evaluó mediante la técnica LFF (Materiales y Métodos, sección II-2.5). Los gráficos de *Stern-Volmer* para la desactivación del $^3Rf^*$ se muestran a continuación y los valores de 3k_q se presentan en la Tabla 5.

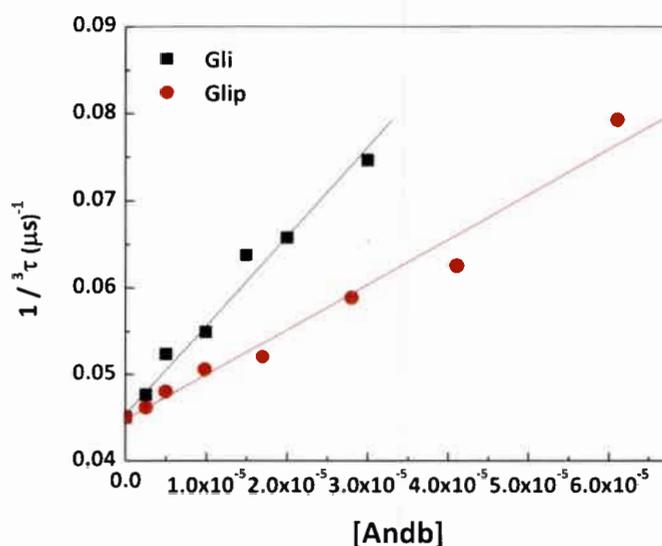


Figura 24: Gráfico de *Stern-Volmer* para la desactivación de $^3Rf^*$ por Gli y Glip $\lambda_{exc} = 355nm$ $[Rf] = 0,02$ mM en solución reguladora de pH 7,4/CH₃OH (10%) saturada con argón.

Con el objetivo de analizar la naturaleza de la interacción que existe entre $^3\text{Rf}^*$ y los Andb, se determinaron los espectros de especies transitorias de Rf (0,02 mM) en ausencia y en presencia de Gli y Glip (5×10^{-4} M) en solución reguladora a pH 7,4 /CH₃OH (10%), saturada con argón.

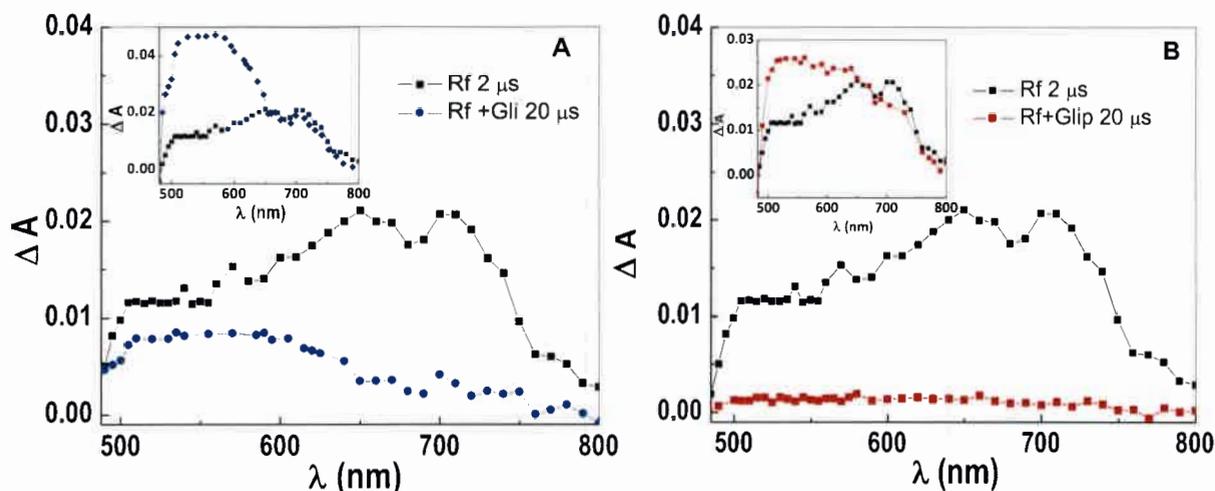


Figura 25: Espectro de especies transitorias de: **A:** Principal: Rf 0,02 mM (negro) tomados a 2 μs después del pulso láser y Rf 0,02 mM + Gli 5×10^{-4} M (azul), tomado a 20 μs después del pulso láser en solución reguladora de pH 7,4/CH₃OH (10%), saturada con argón. Inserto: Espectros de especies transitorias de Rf 0,02 mM (negro) y 0,02 mM Rf+ Gli 5×10^{-4} M (azul), tomados a 2 μs y a 20 μs después del pulso láser, respectivamente, normalizados a 670nm. **B:** Principal: Espectro de especies transitorias de Rf 0,02 mM (negro) tomados a 2 μs después del pulso láser y Rf 0,02 mM + Glip 5×10^{-4} M (rojo), tomado a 20 μs después del pulso láser, en solución reguladora de pH 7,4/ CH₃OH (10%), saturada con argón. Inserto: Espectros de especies transitorias de Rf 0,02 mM (negro) y Rf 0,02 mM + Glip 5×10^{-4} M (rojo), tomados a 2 μs y a 20 μs después del pulso láser, respectivamente, normalizados a 670nm.

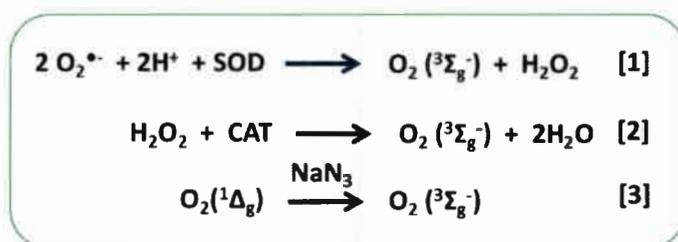
Los espectros de especies transitorias de Rf tomados en ausencia de los Andb, 2 μs después del pulso láser concuerdan bien con los espectros ya publicados³³⁵ para las especies $^3\text{Rf}^*$.

En idénticas condiciones, y en presencia de Gli 5×10^{-4} M (25 A) el espectro de absorción de especies transitorias (tomado 20 μs después del pulso láser) presenta una disminución en la zona comprendida entre 600 y 750 nm. Un comportamiento similar puede observarse en el espectro de Rf en presencia de Glip 5×10^{-4} M tomado a 20 μs después del pulso láser. (Figura 25 B). Cuando se comparan los espectros de especies transitorias de Rf en ausencia (tomado a 2 μs después del pulso láser) y en presencia de A: Gli y B: Glip (tomados 20 μs después del pulso láser y normalizados a 670 nm, en los insertos de la Figura 25 A y B), se puede observar la aparición de una banda en la zona entre 500 y 600 nm, que puede ser asignada a la absorción del radical neutro

de Rf (Rf•), tal como ha sido reportado por otros investigadores.³³⁵ A pH 7,4 y en presencia de oxígeno, la especie Rf• puede protonarse e iniciar una cascada de procesos produciendo diferentes EROs, que en pasos subsiguientes pueden reaccionar con Andb (procesos [16-14], Esquema 14).

III-2.1.2. FOTOOXIDACIÓN ESTACIONARIA: EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE EROs

Para evaluar la participación de EROs en la fotooxidación de Gli y Glip sensibilizada por Rf, se realizaron experimentos de consumo de oxígeno en ausencia y en presencia de inhibidores específicos para EROs (Materiales y Métodos, sección II-3.6.3): SOD para $O_2^{\cdot-}$, CAT para H_2O_2 y NaN_3 para $O_2(^1\Delta_g)$ (Figura 26). Los resultados fueron analizados a partir del conjunto de reacciones que se muestra en el siguiente esquema:



Esquema 20: Reacciones de ERO con inhibidores específicos.

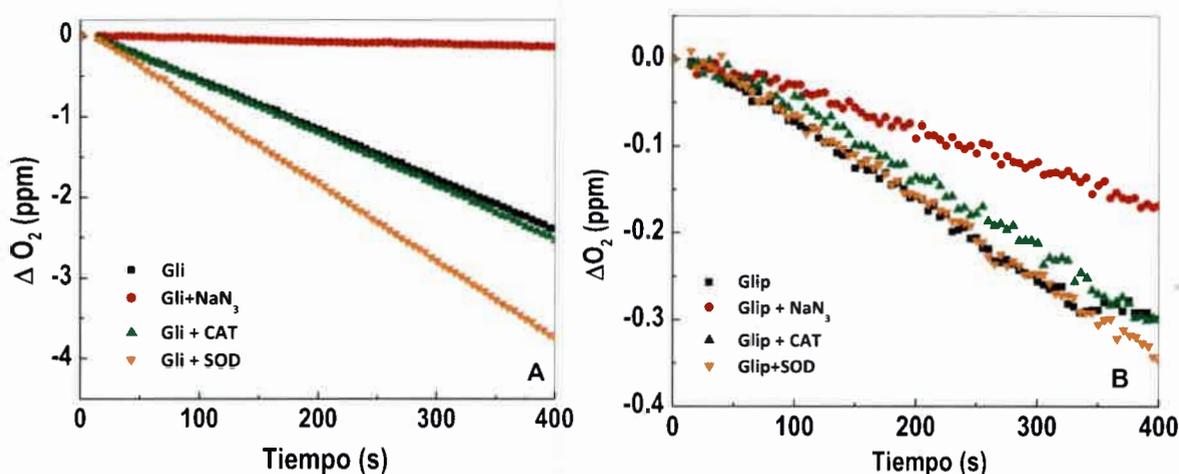


Figura 26: Consumo de oxígeno por: A: Gli (5×10^{-4} M) y B: Glip (2×10^{-4} M) bajo irradiación sensibilizada por Rf en presencia de inhibidores específicos de EROs: NaN_3 (5×10^{-3} M), SOD y CAT (1mg/100ml). Las soluciones fueron preparadas en solución reguladora de pH 7,4/CH₃OH (10%), en presencia de Rf ($A_{445nm} = 0,5$).

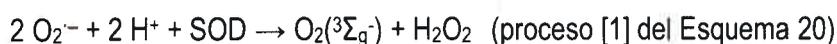
La interpretación de estos resultados se pudo realizar a partir de la determinación de las velocidades relativas de consumo de oxígeno en cada caso (Tabla 6). Las mismas fueron

calculadas como el cociente entre la velocidad inicial de consumo de oxígeno en presencia del inhibidor específico y la velocidad inicial de consumo de oxígeno en ausencia del inhibidor, las cuales fueron obtenidas a partir de las pendientes iniciales de los gráficos de la Figura 26 (A y B).

Tabla 6: Velocidades relativas de consumo de oxígeno (v_r) del sistema Andb/Rf/solución reguladora de pH 7,4/ CH₃OH (10%) en ausencia y presencia de inhibidores específicos: NaN₃ (5×10^{-3} M), SOD y CAT (1mg/100mL).

Compuesto	v_r	Compuesto	v_r
Gli	1,0±0,1	Glip	1,0±0,1
Gli + SOD	1,6±0,1	Glip + SOD	1,0±0,1
Gli + CAT	1,1±0,1	Glip + CAT	0,94±0,09
Gli + NaN₃	0,10±0,01	Glip + NaN₃	0,49±0,05

Como puede observarse en la Tabla 6, la velocidad relativa de consumo de oxígeno de ambos Andb disminuye claramente en presencia de NaN₃, indicando de esta manera la participación de O₂(¹Δ_g) en la fotooxidación sensibilizada por Rf de estos compuestos. Por otro lado, la velocidad de consumo de oxígeno de Gli aumenta en presencia de SOD. Este aumento podría explicarse considerando las siguientes reacciones:



En la reacción catalizada por SOD se necesitan dos moléculas de O₂^{·-}, las que se habrán formado a partir de dos moléculas de O₂(³Σ_g⁻). Sin embargo, esta reacción con SOD produce una sola molécula de O₂(³Σ_g⁻). El balance neto de oxígeno puesto en juego permite inferir que ésta podría ser la razón del aumento de velocidad relativa de consumo de oxígeno en presencia de SOD.

En presencia de CAT, prácticamente no se observa un efecto en la velocidad de consumo de oxígeno por Gli, lo cual indica que la especie H₂O₂ no es reactiva frente a este Andb.

En el caso de Glip, no se observó efecto en la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de SOD y CAT (dentro del 10% de error), indicando que O₂^{·-} y H₂O₂, respectivamente, no participan de manera reactiva en el proceso de fotooxidación de Glip.

Los resultados sugieren que la degradación de Andb sensibilizada por Rf puede ocurrir a través de la combinación de mecanismos Tipo I y Tipo II. El predominio de uno u otro dependerá de la competencia entre oxígeno (proceso [7], Esquema 14) y Andb (proceso [8], Esquema 14) por el estado $^3Rf^*$. En este sentido, se puede realizar el siguiente análisis cinético. Se sabe que la k_{ET} del proceso [7] (Esquema 14) en agua es aproximadamente 1/9 del valor de la constante difusional, es decir, $7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y la 3k_q del proceso [8] (Esquema 14) de interacción de los Andb con $^3Rf^*$ fue de $7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (en promedio para Gli y Glip).³³⁶ Considerando por un lado estos valores de constantes de velocidad y por otro, las condiciones experimentales de trabajo³³⁷ ($[O_2(^3\Sigma_g^-)] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $[Andb] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$), podría decirse que la velocidad de generación de $O_2^{\bullet-}$ (proceso [8], Esquema 14) es solo 2,5 veces mayor que la velocidad de formación de $O_2(^1\Delta_g)$ (proceso [7], Esquema 14). En consecuencia, ambos procesos podrían ser competitivos. Es decir, la fotoirradiación de Rf con luz visible, es capaz de generar además de $O_2(^1\Delta_g)$, en presencia de los Andb estudiados, diversas EROs. A su vez, los resultados muestran que dichas EROs son reactivas frente a estos Andb, lo cual podría comprometer la eficacia clínica de estos fármacos en un escenario típico de estrés oxidativo asociado a la diabetes.

III-2.2. FOTOOXIDACIÓN SENSIBILIZADA POR PN

La participación de la especie $O_2(^1\Delta_g)$ en la fotodegradación sensibilizada por Rf de Gli y Glip pudo evidenciarse en los resultados que fueron presentados anteriormente (Resultados, sección III-2.1.2). Por este motivo, se decidió profundizar en los procesos de fotooxidación de los sistemas Andb, HSA y Andb-HSA mediados por $O_2(^1\Delta_g)$. Para ello, se realizaron experimentos de fotooxidación en presencia de un sensibilizador generador exclusivo de dicha especie.

Los resultados que se presentan en esta sección, serán evaluados en términos de los procesos que se muestran en el Esquema 14.

Tal como se describió anteriormente, los sistemas a estudiar están formados por Gli, Glip, HSA y Andb-HSA. En este último caso, como ya se comentó, la selección de un sensibilizador debe tener ciertas consideraciones respecto de la posible interacción proteína-sensibilizador y las posibles modificaciones en sus propiedades físico y fotoquímicas producidas por la interacción.³⁰¹

Un posible generador típico de $O_2(^1\Delta_g)$ es el sensibilizador Perinaftenona (PN). PN se solubiliza en una gran variedad de solventes, y su rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ es cercano a la unidad en la mayoría de ellos.³³⁸ Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente,

se evaluó la posible interacción de PN con HSA como paso preliminar a ser utilizado en los estudios de fotooxidación mediada por $O_2(^1\Delta_g)$.

III-2.2.1. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS ESTADOS ELECTRÓNICAMENTE EXCITADOS DE PN CON HSA

La excitación del sensibilizador PN comienza con la formación del estado singlete electrónicamente excitado ($^1PN^*$), seguido de la formación del estado triplete electrónicamente excitado de PN ($^3PN^*$) (proceso [1] del Esquema 14), con un rendimiento cuántico de entrecruzamiento de sistemas cercano a la unidad (en una gran variedad de solventes) y una constante de velocidad³³⁹ del orden de $10^8 s^{-1}$. De esta manera, la posibilidad de interacción de HSA con $^1PN^*$ podría considerarse irrelevante, bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo de tesis ($[HSA] \sim 10^{-5} M$).

Los estudios de interacción de $^3PN^*$ con HSA fueron realizados mediante la técnica de LFF (Materiales y Métodos, sección II-2.5). La constante de desactivación de $^3PN^*$ por HSA (3k_q) fue determinada mediante un tratamiento de *Stern-Volmer*. Los resultados se muestran a continuación:

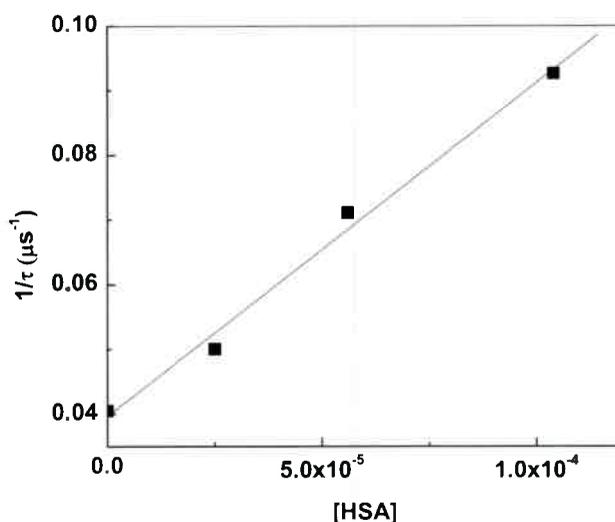


Figura 27: Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación del estado triplete electrónicamente excitado de PN por HSA en solución reguladora de pH 7,4.

La 3k_q obtenida es $5,4 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. Teniendo en cuenta los procesos expuestos en el Esquema 14, se realizó un análisis cinético con el fin de comparar las velocidades de los procesos [7] y [8]. Para ello se consideraron los siguientes valores: una constante de velocidad de transferencia de energía (k_{ET}) de $7 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ en medios acuoso (proceso [7]), el valor determinado anteriormente para 3k_q de $5 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ (proceso [8]), una concentración de oxígeno disuelto de $1 \times 10^{-4} M$ y una

concentración de HSA de 1×10^{-5} M. En estas condiciones experimentales, el análisis cinético indica que el proceso de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ es casi tres veces más efectivo que el proceso de desactivación del $^3PN^*$ por HSA. Por esta razón, en todos los experimentos se utilizó una concentración de HSA del orden de 1×10^{-5} M, de manera que se favorezca la interacción $^3PN^*$ - $O_2(^3\Sigma_g^-)$ (proceso [7]) frente a $^3PN^*$ -HSA (proceso [8]).

Por otra parte, se pudo comprobar que la amplitud de la señal de $O_2(^1\Delta_g)$ no presenta una modificación considerable (< 5%) en presencia de HSA 1×10^{-5} M. De esta manera, se puede inferir que el rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ no se modifica en presencia de dicha concentración de HSA.

III-2.2.2. DETERMINACIÓN DE LAS VELOCIDADES RELATIVAS DE CONSUMO DE OXÍGENO DE LOS SISTEMAS Andb y Andb-HSA

La irradiación estacionaria a $\lambda > 320$ nm de los sistemas Gli (5×10^{-4} M), Glip (2×10^{-4} M), HSA (1×10^{-5} M), Gli-HSA (5×10^{-4} M: 1×10^{-5} M) y Glip-HSA (2×10^{-4} M: 4×10^{-6} M) en solución reguladora de pH 7,4 (CH₃OH 10%), PN ($A_{365 \text{ nm}} \sim 0,5$) produjo consumo de oxígeno, el cual fue detectado a través del electrodo específico de oxígeno (Materiales y Métodos, sección II-2.4). Los resultados se muestran en la Figura 28.

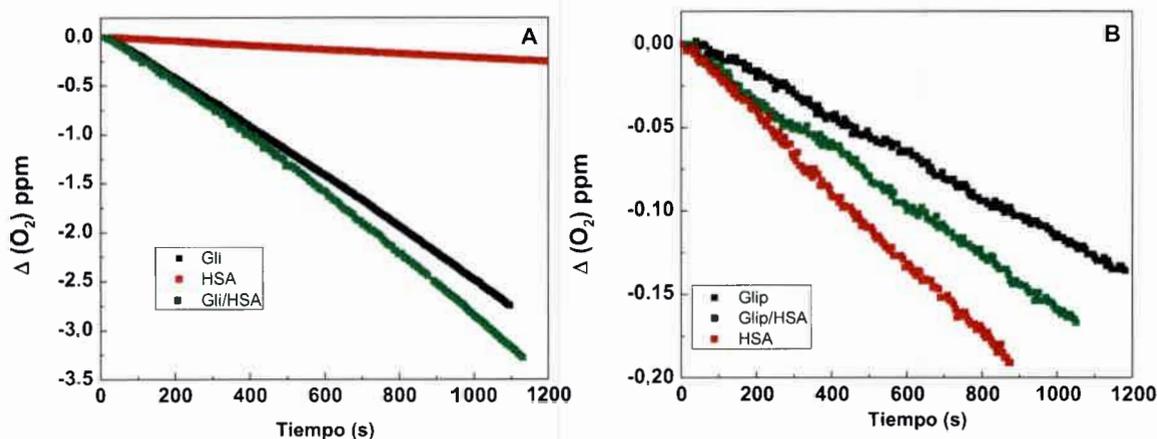


Figura 28: Consumo de oxígeno por los sistemas: **A:** Gli (5×10^{-4} M), HSA (1×10^{-5} M) y Gli-HSA (5×10^{-4} M- 1×10^{-5} M) y **B:** Glip (2×10^{-4} M), HSA (1×10^{-5} M) y Glip-HSA (2×10^{-4} M- 4×10^{-6} M) en solución reguladora de pH 7,4/CH₃OH (10%), PN ($A_{365 \text{ nm}} \sim 0,5$) bajo irradiación estacionaria.

Las velocidades relativas de consumo de oxígeno (v_r) fueron determinadas a partir de las pendientes iniciales de los gráficos de ΔO_2 vs. tiempo de irradiación (Figura 28 A y B), y fueron calculadas como el cociente entre la velocidad de consumo del sistema dado y la velocidad de consumo de HSA. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 7: Velocidades relativas de consumo de oxígeno (v_r) y constante de velocidad de desactivación total (k_t) de $O_2(^1\Delta_g)$ por los sistemas Gli (5×10^{-4} M), HSA (1×10^{-5} M), Gli-HSA (5×10^{-4} M- 1×10^{-5} M), Glip (2×10^{-4} M) y Glip-HSA (2×10^{-4} M- 4×10^{-6} M) en solución reguladora de pH 7,4/CH₃OH (10%), PN ($A_{365 \text{ nm}} \sim 0,5$). Los valores de k_t fueron obtenidos en solución reguladora de pD 7,4/CD₃OD (10%), PN ($A_{355 \text{ nm}} \sim 0,3$).

Sistema	v_r	$k_t \times 10^{-7} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
Gli	1.9	2.2
Gli-HSA	2.6	4.5
Glip	0.2	1.2
Glip-HSA	0.7	4.7
HSA	1.0	80

A partir de los valores de v_r de la Tabla 7, se puede observar que tanto Gli como el sistema Gli-HSA presentan mayor reactividad que la proteína libre. En el caso del sistema Gli-HSA, este incremento puede ser interpretado como la contribución prácticamente aditiva de cada una de las especies.

Por su parte, la reactividad de los sistemas Glip y Glip-HSA resulta ser menor que HSA. Este resultado podría entenderse como un efecto de autoprotección del sistema como un todo frente a la fotodegradación, respecto de la proteína. A su vez, se puede observar que, relativo al consumo de HSA, Gli presenta una mayor reactividad frente a $O_2(^1\Delta_g)$ que Glip.

III-2.2.3. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE DESACTIVACIÓN TOTAL DE $O_2(^1\Delta_g)$ (k_t)

La constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$, k_t ($k_q + k_r$, procesos [10] y [11] del esquema 14, respectivamente) fue determinada mediante la técnica TRPD (Materiales y Métodos, sección II-2.6) para los sistemas Gli, Gli-HSA, Glip y Glip-HSA. Los gráficos del análisis clásico de Stern-Volmer se presentan en la Figura 29. Los valores de k_t , obtenidos a partir de las pendientes de dichos gráficos, se muestran en la Tabla 7. Como puede observarse, el valor de k_t de HSA indica que la proteína es un desactivador de $O_2(^1\Delta_g)$ más efectivo que los Andb estudiados. Esto

probablemente se deba a la gran cantidad de aminoácidos fotooxidables (18 Tyr, 1 Trp, 16 His, 6 Met y 35 Cys)³⁴⁰ que conforman la estructura primaria de HSA. Es sabido que la fotooxidación de proteínas es producto de la contribución de los diferentes aminoácidos que constituyen “blancos” de ataque frente a $O_2(^1\Delta_g)$.¹⁷³

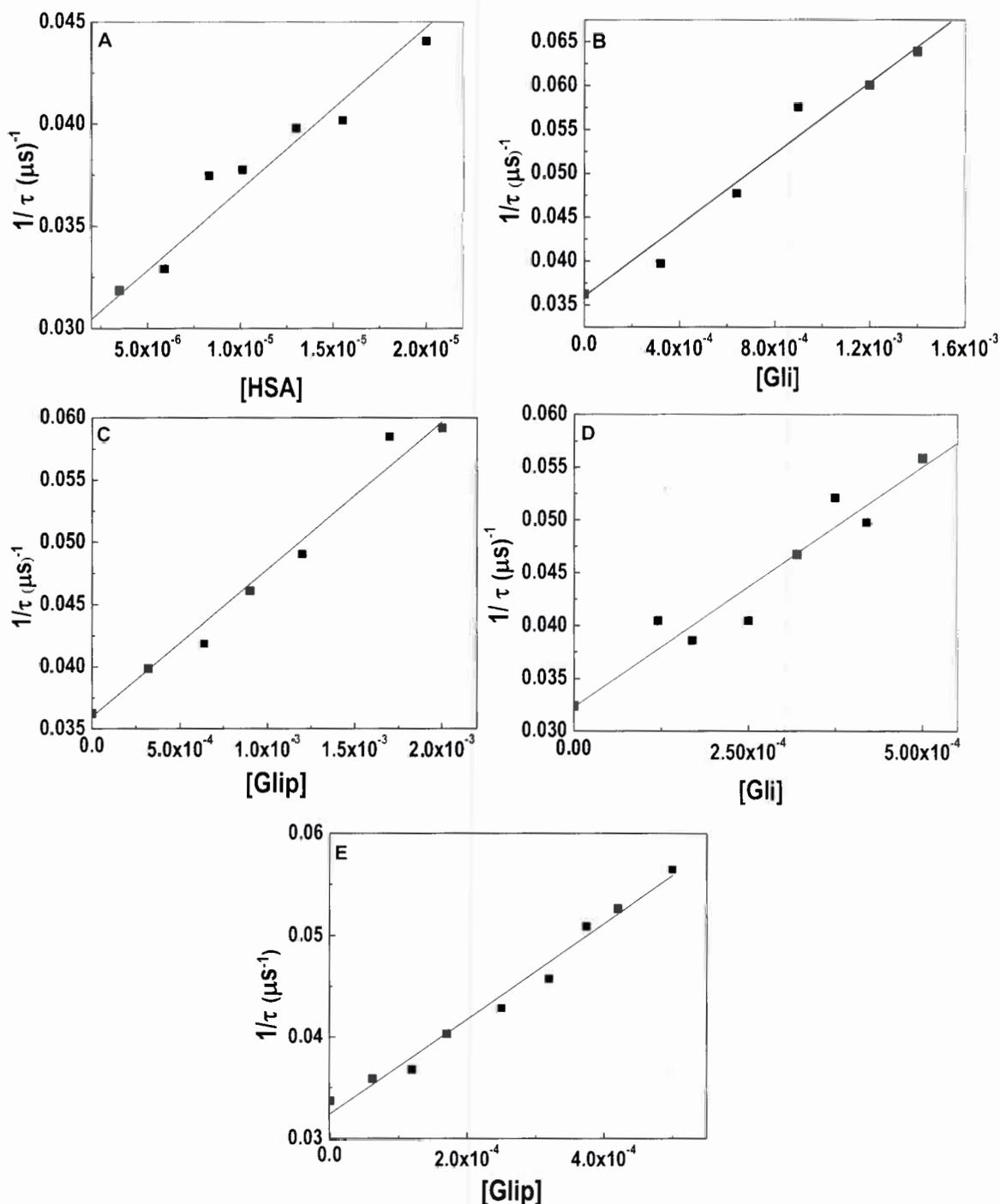


Figura 29: Gráficos de Stern-Volmer para la desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por: A: HSA, B: Gli, C: Glip, D: Gli-HSA y E: Glip-HSA en solución reguladora de pH 7,4/CD₃OD (10%). En los sistemas que contienen la proteína, la concentración de la misma fue constante e igual a 1×10^{-5} M.

Comparando los valores de k_t de HSA y de Gli-HSA podría decirse que la unión de Gli a la proteína genera un efecto protector del sistema como un todo. En este punto, resulta interesante analizar estos resultados a la luz de los valores obtenidos de las velocidades relativas de consumo de oxígeno (v_r) que se encuentran expuestos en la Tabla 7. Suponiendo que la componente reactiva fuera la única contribuyente a la desactivación total ($k_r \gg k_q$) para el sistema Gli-HSA, sería esperable que el valor de k_t de este sistema tuviese un valor igual a la suma de las contribuciones individuales de cada una de las especies, tal como fue observado para v_r . Sin embargo, el valor de k_t para el sistema Gli-HSA es menor a la suma de dichas contribuciones. De esta manera, esta disminución podría atribuirse a un efecto adicional proveniente de la unión del Andb a HSA. En este sentido, como fue comentado en la introducción, la fotooxidación de proteínas involucra la participación de los aminoácidos Cys, Met, His, Trp y Tyr.¹⁷¹ Más específicamente, se conoce que los residuos de tirosina son desactivadores físicos muy efectivos de $O_2(^1\Delta_g)$ en condiciones de pH neutro. En este contexto resulta oportuno tener en cuenta los resultados de acoplamiento molecular. Los mismos sugirieron que tanto Gli como Glip se unen a los sitios II y extra, sitios en los que participan directa o indirectamente varios residuos de tirosina. Como puede observarse en las Figuras 12 B y 17 B se puede notar la presencia del residuo de tirosina 411 (Tyr411) en el sitio II de HSA. De igual manera, cuando Gli se une al sitio extra se puede observar la participación de Tyr 452, en una conformación (Figura 13 A), y Tyr138 en la otra (Figura 13 B). Por su parte, cuando Glip se une al sitio extra, se puede observar que los residuos Tyr161 (primera conformación propuesta, Figura 18 A) y Tyr138 (segunda conformación propuesta, Figura 18 B) se encuentran ubicados en el sitio de unión. De esta manera, la disminución resultante en los valores de k_t para los sistemas Andb-HSA, comparado a los valores de HSA libre, podría ser atribuida a una reducción en la disponibilidad de estos residuos de tirosina que podrían desactivar físicamente a $O_2(^1\Delta_g)$.

III-2.2.4. ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE FOTOOXIDACIÓN DE Andb MEDIADA POR $O_2(^1\Delta_g)$

Como fue demostrado en los resultados anteriormente presentados, la participación de $O_2(^1\Delta_g)$ en la fotooxidación de Gli y Glip pudo evidenciarse tanto en los procesos sensibilizados por Rf, como en los procesos sensibilizados por PN. En este último caso, fue posible cuantificar la constante de velocidad de desactivación total de dicha especie (k_t) y determinar las velocidades relativas de consumo de oxígeno por los Andb, HSA y los sistemas Andb-HSA.

Para completar estos estudios, se decidió analizar los productos de fotooxidación de Gli mediada por $O_2(^1\Delta_g)$, tomando a Gli como compuesto representante de la familia de Andb orales de segunda generación. Estos análisis fueron realizados mediante la técnica HPLC-Masa. A través de dicha técnica es posible proponer las estructuras de los productos de fotooxidación de Gli mediada por $O_2(^1\Delta_g)$. Estos estudios fueron realizados en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Patricia Allegretti, docente e investigadora del Departamento de Química de la Universidad Nacional de la Plata.

Las muestras analizadas corresponden a soluciones de Gli (5×10^{-4} M), PN ($A_{365 \text{ nm}} \sim 0,5$)/ solución reguladora de pH 7,4/ CH_3OH (10%) tomadas sin irradiación, a 60 minutos y a 90 minutos de irradiación. Los resultados se muestran a continuación:

III-2.2.4.a. Análisis de la muestra sin irradiar

El objetivo de analizar la muestra sin irradiar, consiste en la identificación de los picos cromatográficos característicos de los compuestos presentes en la solución antes de que ocurra la fotodegradación. Los resultados indican la aparición de un pico característico a un tiempo de retención de 11,9 minutos. Mediante el análisis del espectro de masa de este pico, se obtienen los siguientes resultados:

$(M+H)^+ = 324$ uma. Este pico corresponde a la estructura de Gli (cuyo peso molecular es 323,4), que se encuentra protonado en el N unido al ciclo, como se muestra en la siguiente figura:

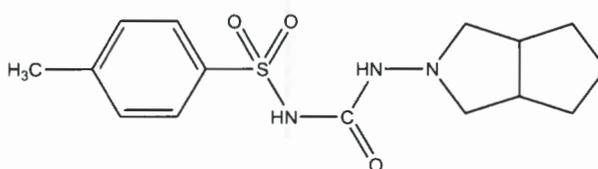


Figura 30: Estructura química de Gli, PM: 323,4. Compuesto detectado en la muestra sin irradiar.

$(M+K)^+ = 362$ uma. Este pico corresponde a Gli unida al catión K^+ proveniente de la fase móvil. También se detectó un dímero de Gli unido por puente de Hidrógeno intermolecular.

III-2.2.4.b. Análisis de la muestra irradiada durante 60 minutos

En este caso, se detecta un pico cromatográfico a un tiempo de retención de 3,9 minutos. El análisis espectroscópico de masa de este pico indica:

$(M+H)^+ = 196,3$ uma. El compuesto correspondiente a este pico se ha identificado con la siguiente estructura:

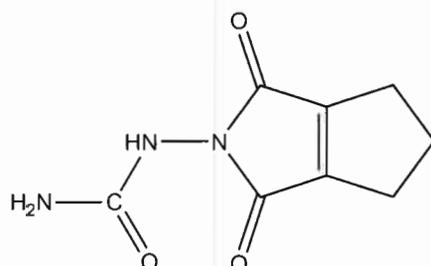
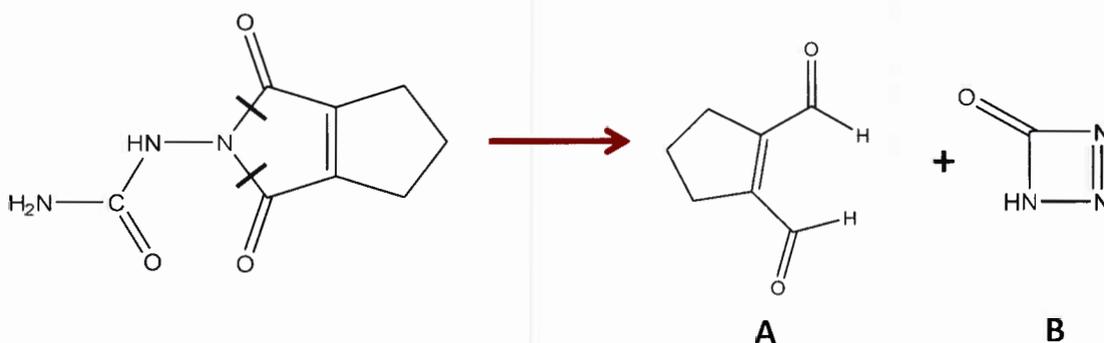


Figura 31: Posible estructura química de fotoproducto I. M: 195 uma. Compuesto detectado en la muestra irradiada durante 60 minutos, a un $t_R = 3,9$ minutos.

Este compuesto podría identificarse como el primer fotoproducto (fotoproducto I), teniendo en cuenta la ausencia de este pico a $t_R = 3,9$ min en la muestra sin irradiar que fue evaluada previamente.

La fragmentación del fotoproducto I genera dos picos de masas 124 uma y 71 uma. A partir de las estructuras correspondientes a estos fragmentos es que se deduce la posible estructura del compuesto que los originó (Esquema 21).



Esquema 21: Fragmentos del compuesto encontrado a $t_R = 3,9$ min. Fragmento A (M = 124 uma) y fragmento B (M = 71 uma). Las líneas rojas indican el lugar de fragmentación.

Además, en el cromatograma de esta muestra aparece un pico a un $t_R = 11,9$ minutos. Este pico corresponde a Gli, tal como fue observado en la muestra sin irradiar que fue evaluada previamente. Nuevamente, el análisis de los espectros de masa de este componente indican los picos $(M+H)^+ = 324$ uma; $(M+K)^+ = 362$ uma y el dímero formado por puente de hidrógeno intermolecular de Gli.

Finalmente, se observa un pico a un $t_R = 13,2$ minutos. El análisis por espectrometría de masa indica la aparición de los siguientes picos de relación m/z :

$(M+H)^+ = 388$ uma. Este pico se asignó a la siguiente estructura, que correspondería al fotoproducto II:

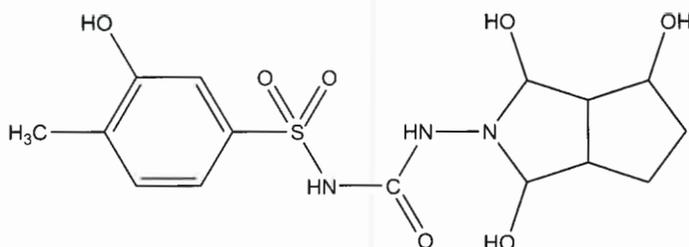
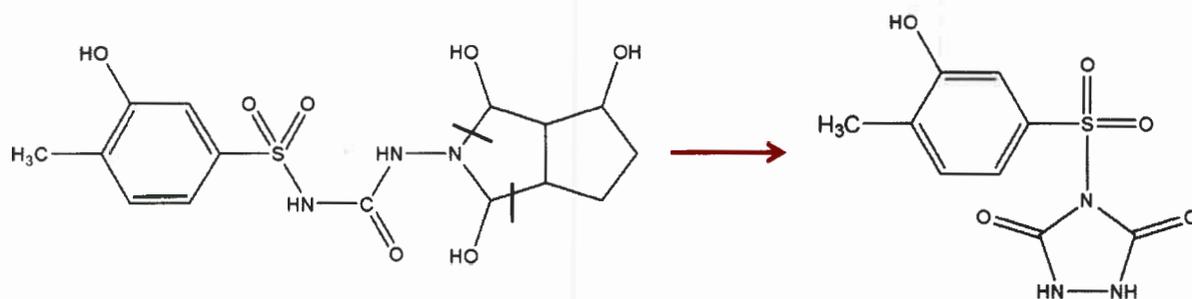


Figura 32: Posible estructura química de fotoproducto II. M: 387 uma. Compuesto detectado en la muestra irradiada durante 60 minutos a $t_R = 13,2$ minutos.

La deducción de esta estructura fue realizada en función de un fragmento ($M=271$ uma). El mismo resulta de la ruptura de los enlaces N3-C15 y C9-C10 del heterociclo del fotoproducto II (Figura 42, sección V-1, Apéndice), y posterior unión del C9 al N2 del grupo sulfonilurea, tal como se demuestra en el siguiente esquema:



Esquema 22: Fragmentos del compuesto encontrado a $t_R = 13,2$ min. Fragmento ($M = 271$ uma). Las líneas rojas indican el lugar de fragmentación.

III-2.2.4.c. Análisis de la muestra irradiada durante 90 minutos

El análisis cromatográfico de esta muestra contiene los picos encontrados en el análisis de la muestra irradiada durante 60 minutos. Es decir:

$t_R = 3,9$ min: Fotoproducto I (Figura 31);

$t_R = 11,9$ min: Gli protonada $(M+H)^+ = 324$ uma, Gli unida al catión K^+ proveniente de la fase móvil $(M+K)^+ = 362$ uma y dímero de Gli formado por puente de hidrógeno intermolecular;

$t_R = 13,2$ min: Fotoproducto II (Figura 32).

Además, se observa un pico a un $t_R = 13,9$ min. El análisis espectroscópico de masa indica un pico $(M+H)^+ = 706,3$ uma. En este caso, se propone la siguiente estructura:

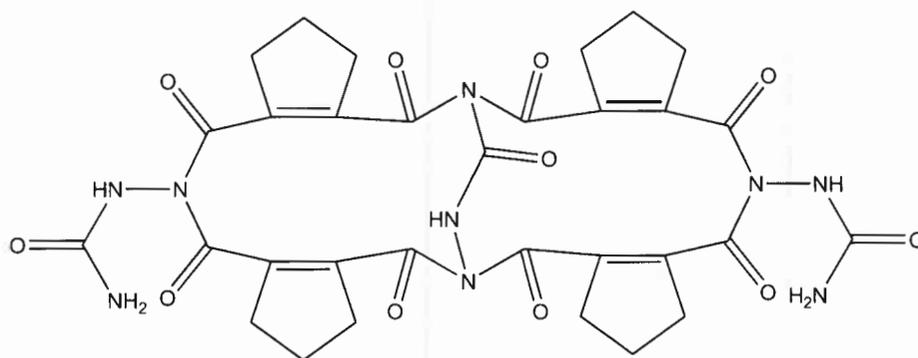
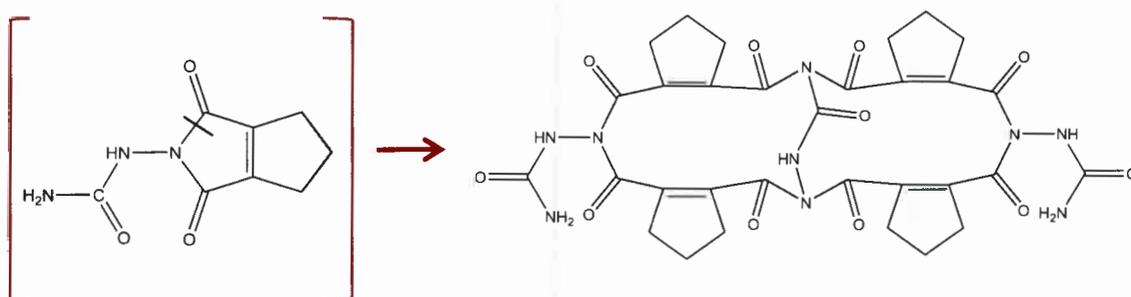


Figura 33: Estructura química propuesta del compuesto detectado a $t_R = 13,9$ min. $(M+H)^+ = 706,3$ uma. Compuesto detectado en la muestra irradiada durante 90 minutos.

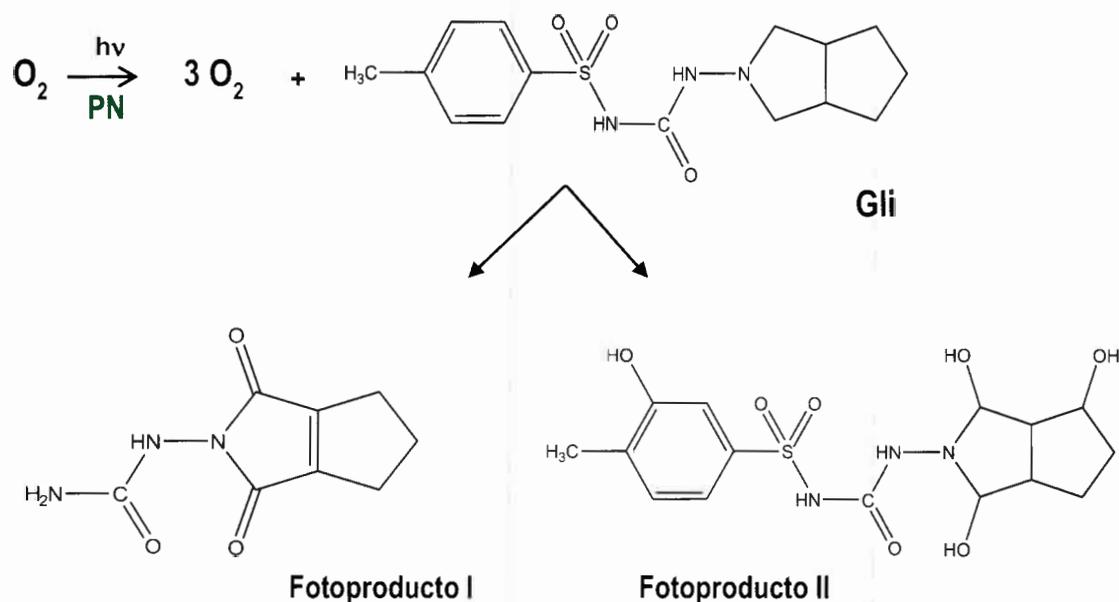
Este compuesto, podría resultar de la apertura del grupo amido del fotoproducto I (Figura 31), y posterior condensación consigo mismo. La formación involucraría cuatro moléculas de fotoproducto I. (Esquema 23).



Esquema 23: Diagrama que indica la ruptura del grupo amido del fotoproducto I, seguido de autocondensación de 4 unidades para formar el compuesto encontrado en la muestra irradiada durante 90 minutos a $t_R = 13,2$ min.

En función de los anteriores resultados, es posible afirmar que como productos de la fotooxidación sensibilizada por PN de Gli, se obtienen dos compuestos. Uno de ellos pierde el grupo aromático unido a azufre, e incorpora dos átomos de oxígeno al heterociclo de nitrógeno

(fotoproducto I). Este compuesto se identificó a $t_R = 3,9$ minutos. Por otro lado, se obtiene otro compuesto que mantiene la estructura básica de Gli, incorporando cuatro grupos oxidrilo: uno en el anillo aromático unido al grupo sulfónico, y tres en el heterociclo de nitrógeno. Este es el fotoproducto II, identificado a $t_R = 13,2$ minutos. Es importante destacar que ambos fotoproductos se encuentran en las muestras irradiadas durante 60 y 90 minutos. En conclusión, Gli reacciona con tres moléculas de oxígeno en la reacción fotosensibilizada por PN, como se muestra en el siguiente esquema:



Esquema 24: Fotooxidación sensibilizada por PN de Gli para formar los fotoproductos I y II.

II-3. CONCLUSIONES

- ❖ Los estudios de fotooxidación sensibilizada por Rf de los Andb, indican la existencia de interacciones con los estados electrónicamente excitados del sensibilizador. Bajo las condiciones experimentales ensayadas, la interacción con el estado singlete electrónicamente excitado de Rf es despreciable. No obstante, las interacciones entre el estado triplete electrónicamente excitado del sensibilizador ($^3Rf^*$) y los Andb se pudo evidenciar en una disminución en la zona típica de absorción del $^3Rf^*$ y la formación del radical neutro de Rf ($Rf\cdot$) en los espectros de especies transitorias del sensibilizador. Los valores de 3k_q indican una mayor interacción de Gli que de Glip con $^3Rf^*$. Por otro lado, la evaluación de las velocidades relativas de consumo de oxígeno en presencia de inhibidores específicos para EROs, demostró la participación de $O_2(^1\Delta_g)$ para ambos Andb y $O_2\cdot^-$ para el caso de Gli en el mecanismo de fotodegradación de Andb sensibilizada por Rf.
- ❖ La cuantificación de la participación de $O_2(^1\Delta_g)$ en el proceso degradativo de los sistemas en estudio, se realizó mediante estudios de fotodegradación sensibilizados por PN. Este análisis se llevó a cabo en ausencia y en presencia de HSA para evaluar la influencia de la proteína en el proceso. Los resultados indican que la presencia de HSA podría generar un efecto protector para el sistema Glip-HSA frente a $O_2(^1\Delta_g)$, respecto a la proteína libre. También, se observó que Gli es más reactiva frente a $O_2(^1\Delta_g)$ que Glip. A partir de los valores de la constante de velocidad de desactivación global de $O_2(^1\Delta_g)$ (k_t), se pudo inferir que HSA es un desactivador de $O_2(^1\Delta_g)$ más efectivo que los Andb. Por otra parte, se observó que el proceso de *binding* causa una disminución en los valores de k_t de los sistemas Gli-HSA y Glip-HSA. Considerando la información proporcionada por los experimentos de acoplamiento molecular, es posible interpretar este resultado en términos de una reducción en la disponibilidad de los residuos Tyr de HSA que pueden desactivar físicamente a $O_2(^1\Delta_g)$ y que están involucrados en la interacción con los Andb en ambos sitios de *binding*.
- ❖ El análisis por HPLC-Masa de los productos de fotooxidación de Gli, sensibilizada por PN, indica que Gli reacciona con tres moléculas de oxígeno, formando los productos I y II (Figuras 31 y 32). El primero incorpora dos átomos de oxígeno al heterociclo con enlaces carbonilo y el segundo incorpora cuatro oxidrilos distribuidos entre el anillo aromático y el heterociclo.

**III-3: ESTUDIO DE LA TOXICIDAD *IN VITRO* DE LOS
PRODUCTOS DE FOTOOXIDACIÓN DE Gli MEDIADA POR
 $O_2(^1\Delta g)$**

En el capítulo anterior, se pudo comprobar la participación de $O_2(^1\Delta_g)$ en la fotodegradación de los Andb en estudio. Además, se pudieron caracterizar estructuralmente los productos derivados de la reacción de Gli con esta ERO. En este contexto, teniendo en cuenta la posibilidad de que estos productos puedan generarse debido a la coexistencia de Gli y $O_2(^1\Delta_g)$ en un entorno celular común, es que resulta interesante evaluar la potencial toxicidad que estos productos podrían tener en los sistemas biológicos.

Por este motivo, en este capítulo se presentan los resultados de la evaluación de toxicidad celular de los productos de fotodegradación de Gli mediada por $O_2(^1\Delta_g)$. Dichos estudios fueron realizados en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Liliana Sabini, perteneciente al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Teniendo en cuenta la descripción metodológica empleada para el estudio de toxicidad de los fotoproductos de Gli (Materiales y Métodos, sección II-3.7.3), se presentan a continuación los resultados de la evaluación de los parámetros MCNC y CC_{50} .

III-3.1. DETERMINACIÓN DE LA MÁXIMA CONCENTRACIÓN NO CITOTÓXICA (MCNC)

III-3.1.1. SOLUCIONES DE PN EN AUSENCIA DE Gli

Con el fin de evaluar si el sensibilizador PN produce algún tipo de daño celular, se determinó la MCNC para una solución de PN en ausencia de Gli.

Las observaciones en el microscopio óptico a las 24 y a las 48 hs. confirmaron que los sistemas celulares no tratados con las muestras (controles) exhibieron una morfología normal durante toda la experiencia (Figura 34 A). Cabe aclarar que en dicha figura, las manchas observadas no representan alteraciones propias de las células, sino que solo corresponden a gotas de condensación. Los sistemas celulares tratados con diferentes concentraciones de PN mostraron daño celular leve a partir de una cierta concentración. Dicho daño consistió en alteraciones de las células en su morfología y disposición, mostrándose como agrupadas, globosas, a veces con refringencia, como se puede observar en la Figura 34 B. Es importante destacar que estos efectos resultaron independientes del tiempo de irradiación. A partir de estas observaciones se determinó que la MCNC para la solución de PN es $0,5 \mu\text{g/mL}$, tanto para las muestras sin irradiar, como para las irradiadas durante 60 y 90 minutos. Dado que esta solución sólo contiene el sensibilizador y una solución reguladora de pH 7,4 (la cual es sabido que no causa

ningún efecto tóxico sobre los cultivos celulares), sería probable que el propio sensibilizador sea el causante de la citotoxicidad observada.

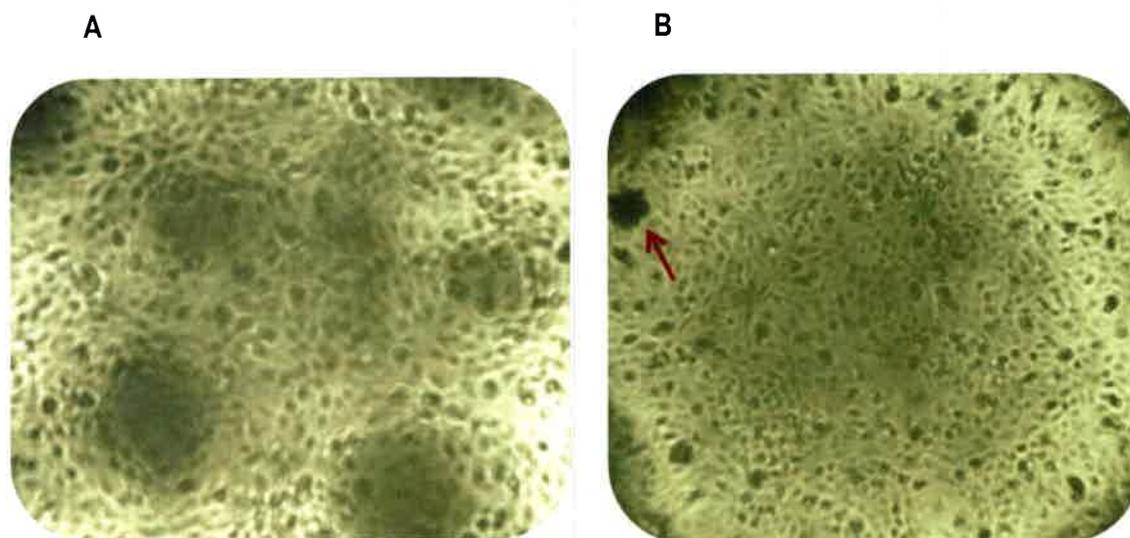


Figura 34: Aspectos morfológicos de células Vero en monocapas. **A:** cultivo sin tratar (control). **B:** cultivo tratado con una concentración citotóxica de solución de PN (4,9 µg/mL) irradiada durante 60 minutos.

III-3.1.2. SOLUCIONES DE PN EN PRESENCIA DE Gli

Se evaluó la capacidad citotóxica del sistema Gli/PN (Materiales y Métodos, sección II-3.7.3), sin irradiar e irradiado durante 60 y 90 minutos. Las observaciones al microscopio óptico indicaron que el aspecto y morfología de las células Vero cultivadas con el sistema Gli/PN mejoraron en presencia de Gli, respecto de aquellas en las que solo se ensayó el efecto del sensibilizador. Esto indicaría que la toxicidad de PN podría verse disminuida en presencia de Gli. Además, pudo observarse que este efecto “protector” de Gli disminuye en función del tiempo de irradiación. En este contexto, resulta interesante tener en consideración que estudios recientes han demostrado que Gli posee un efecto antiapoptótico en células de origen humano, que podría atribuirse a una potencial actividad antioxidante, que causa una considerable disminución en las EROs que inducen la muerte celular.³⁴¹

Las máximas concentraciones para el sistema Gli/PN que no manifestaron alteraciones citotóxicas fueron 8,1 µg/mL y 0,5 µg/mL, respectivamente. No obstante, para el caso de Gli no es posible asignar estrictamente un valor de MCNC, debido a que el efecto citotóxico que presenta el sensibilizador podría enmascarar los efectos que el antidiabético podría tener sobre las células.

Para lograr una independencia del efecto que genera el sensibilizador y poder evaluar exclusivamente el efecto citotóxico de Gli y/o sus productos de oxidación, fue necesario utilizar una concentración de PN constante y no citotóxica ($0,5 \mu\text{g/mL}$) y en consecuencia concentrar la solución *stock* de Gli ($1617 \mu\text{g/mL}$). Las muestras evaluadas fueron soluciones no irradiadas e irradiadas durante 45 y 75 minutos. Las observaciones al microscopio óptico a las 24 y 48 horas de incubación indican que las células cultivadas con las diferentes muestras de Gli, independientemente de los tiempos de irradiación, muestran una morfología y apariencia que se asemejan bastante a las células control. A partir de estos resultados se determinó que la MCNC de Gli experimentada en nuestros ensayos sería mayor a $121 \mu\text{g/mL}$, para todas las muestras y bajo las condiciones experimentales empleadas. Estos resultados indicarían una ausencia de efectos citotóxicos debidos a Gli y/o a sus productos de oxidación.

III-3.1.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CITOTÓXICA 50% (CC_{50}) POR ENSAYO DE CAPTACIÓN DE ROJO NEUTRO (RN)

Si bien la determinación de la MCNC es un indicador cualitativo del grado de citotoxicidad del sistema estudiado, para poder cuantificar la viabilidad celular se puede emplear un experimento que consiste en la captación de RN. A partir de los gráficos de fracción de supervivencia en función del volumen de muestra (curvas dosis-respuesta) es posible determinar, por interpolación, el parámetro CC_{50} . Dicho parámetro indica la concentración de sustancia que produce un 50% de muerte celular.

De la misma manera que se realizaron los ensayos de MCNC, se evaluaron las muestras de PN y del sistema Gli/PN a una concentración no citotóxica de sensibilizador ($0,5 \mu\text{g/ml}$). En las Tablas 8 y 9 se muestran los valores de fracción de supervivencia (FS) promedio en función del volumen de muestra, obtenidas para los sistemas PN y Gli/PN, respectivamente.

Tabla 8: Fracción de supervivencia (FS) promedio para cultivos de células Vero tratadas con soluciones de PN ($PN_{stock}= 9,9 \mu\text{g/mL}$) a diferentes tiempos de irradiación: 0, 60 y 90 minutos. Los porcentajes fueron promediados sobre tres determinaciones independientes

Soluciones de PN en ausencia de Gli

V (μL) de muestra (solución de PN)	PN($\mu\text{g/mL}$)	FS promedio $t_{irrad}= 0 \text{ min}$	FS promedio $t_{irrad} = 60 \text{ min}$	FS promedio $t_{irrad} = 90 \text{ min}$
0	0	100	100	100
5	0,25	83,3	99,6	98,4
10	0,50	83,9	97,8	93,1
30	1,50	35,0	29,5	22,6
50	2,50	24,2	24,6	23,1
100	4,95	21,2	25,8	22,9

Tabla 9: Fracción de supervivencia (FS) promedio para cultivos de células Vero tratadas con soluciones Gli/PN, ($Gli_{stock}=161,7 \mu\text{g/mL}$; $PN_{stock}=9,9 \mu\text{g/mL}$) a diferentes tiempos de irradiación: 0, 60 y 90 minutos. Los porcentajes fueron promediados sobre tres determinaciones independientes.

Soluciones de PN en presencia de Gli

V (μL) de muestra (solución de Gli/PN)	Gli ($\mu\text{g/mL}$)	PN ($\mu\text{g/ml}$)	FS promedio $t_{irrad}= 0 \text{ min}$	FS promedio $t_{irrad} = 60 \text{ min}$	FS promedio $t_{irrad} = 90 \text{ min}$
0	0	0	100	100	100
5	4,00	0,25	98,2	93,0	93,7
10	8,10	0,50	98,7	93,8	92,3
30	24,4	1,50	77,7	78,1	41,5
50	40,4	2,50	31,3	18,3	19,9
100	80,8	4,90	21,6	18,4	22,8

A partir de las tablas anteriores se construyeron los gráficos que se muestran en la siguiente figura:

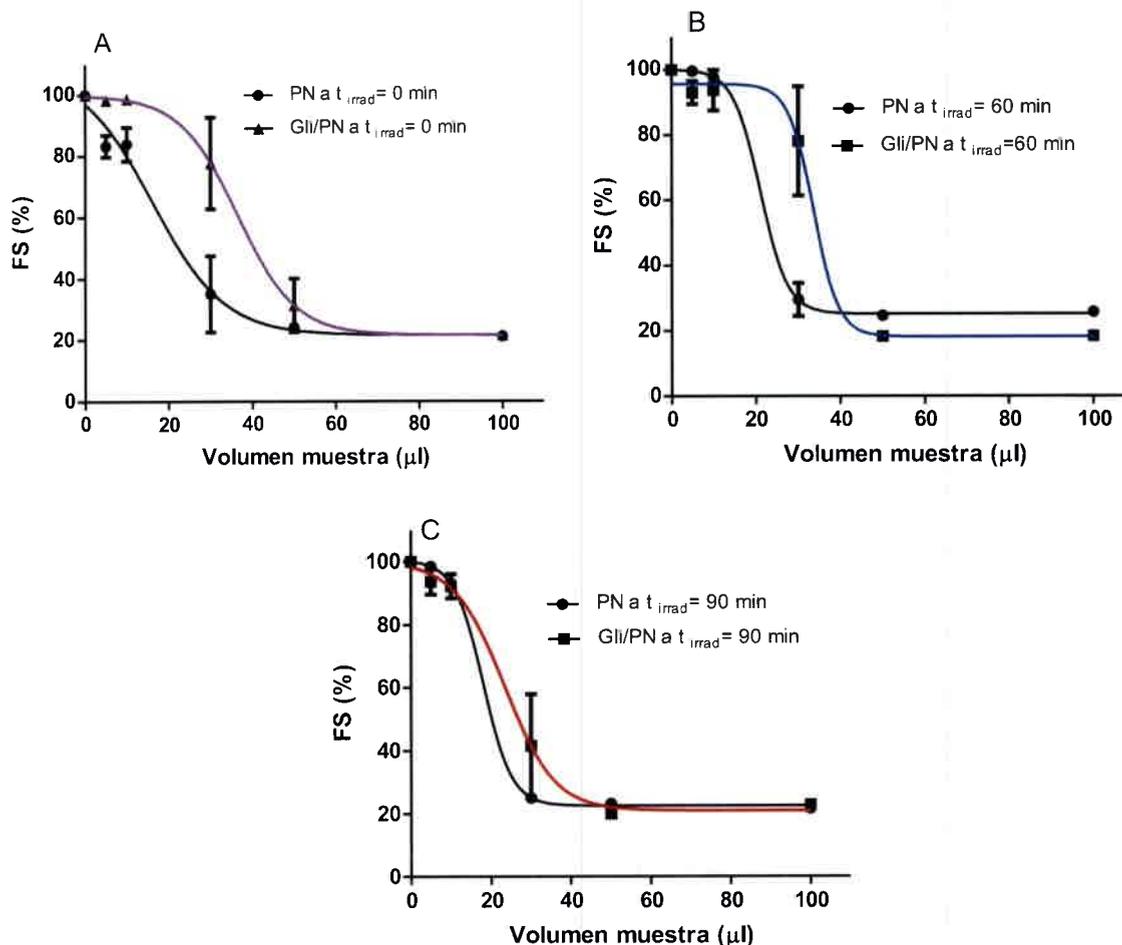


Figura 35: Curvas de supervivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por captación de RN, luego del tratamiento con solución de PN ($PN_{stock}=9,9 \mu\text{g/ml}$) y solución Gli/PN ($Gli_{stock}=161,7 \mu\text{g/ml}$; $PN_{stock}=9,9 \mu\text{g/ml}$); **A:** sin irradiar, **B:** irradiadas durante 60 minutos y **C:** irradiadas durante 90 minutos.

Los valores de CC_{50} (obtenidos a partir de estos gráficos) para PN y Gli/PN se presentan en la Tabla 10. Es importante aclarar que para el sistema Gli/PN solo se informan las CC_{50} correspondientes a PN. Esto es debido a que, como ya se discutió en el punto anterior, la presencia del sensibilizador podría enmascarar el efecto citotóxico de Gli, motivo por el cual no fue posible asignar un valor exclusivo de CC_{50} para el Andb.

Tabla 10: CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de PN para soluciones de PN y soluciones Gli/PN, a diferentes tiempos de irradiación: 0, 60 y 90 minutos.

t_{irrad}	CC_{50} de PN ($\mu\text{g/mL}$) Solución PN	CC_{50} de PN ($\mu\text{g/mL}$) Solución Gli/PN
0 min	1,1	2,0
60 min	1,1	1,7
90 min	1,0	1,2

Observando los valores de la Tabla 10, se puede notar que en el caso de las soluciones de PN los valores de CC_{50} no presentan una variación con el tiempo de irradiación. Para el caso de las soluciones Gli/PN, se observa que la CC_{50} de PN aumenta en presencia de Gli comparada con el valor correspondiente a la CC_{50} en ausencia del Andb. Esto indicaría que las células son más resistentes al efecto citotóxico de PN en presencia de Gli. Además, se puede observar una clara disminución en el valor de CC_{50} de PN con el tiempo de irradiación. Este efecto podría deberse a la degradación fotosensibilizada del antidiabético que reduciría su protección sobre los cultivos celulares. Este resultado confirma las hipótesis que se realizaron a partir de las observaciones al microscopio óptico.

Por otro lado, para evaluar exclusivamente los potenciales efectos citotóxicos de los productos de Gli, se realizaron los ensayos correspondientes de citotoxicidad para muestras de Gli/PN a diferentes tiempos de irradiación, a una concentración no tóxica de PN (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Los valores de fracción de supervivencia para este sistema Gli/PN se muestran en la Tabla 11. A partir de estos datos se construyeron los gráficos de la Figura 36.

Tabla 11: Fracción de supervivencia promedio para cultivos de células Vero tratadas con soluciones de Gli/PN ($Gli_{stock}=1617 \mu\text{g/mL}$; $PN=0,5 \mu\text{g/mL}$) a diferentes tiempos de irradiación: 0, 45 y 75 minutos. Los porcentajes fueron promediados sobre cuatro determinaciones independientes

Soluciones de PN en presencia de Gli a una concentración no citotóxica de PN (0,5 $\mu\text{g/mL}$)

Gli ($\mu\text{g/mL}$)	FS promedio $t_{\text{irrad}}=0 \text{ min}$	FS promedio $t_{\text{irrad}}=45 \text{ min}$	FS promedio $t_{\text{irrad}}=75 \text{ min}$
0	100	100	100
4,00	89,8	93,0	95,9
8,10	94,6	87,0	89,6
24,4	76,0	98,2	89,0
40,4	78,7	100	98,4
80,8	81,1	100	91,4
121	83,8	85,4	88,8

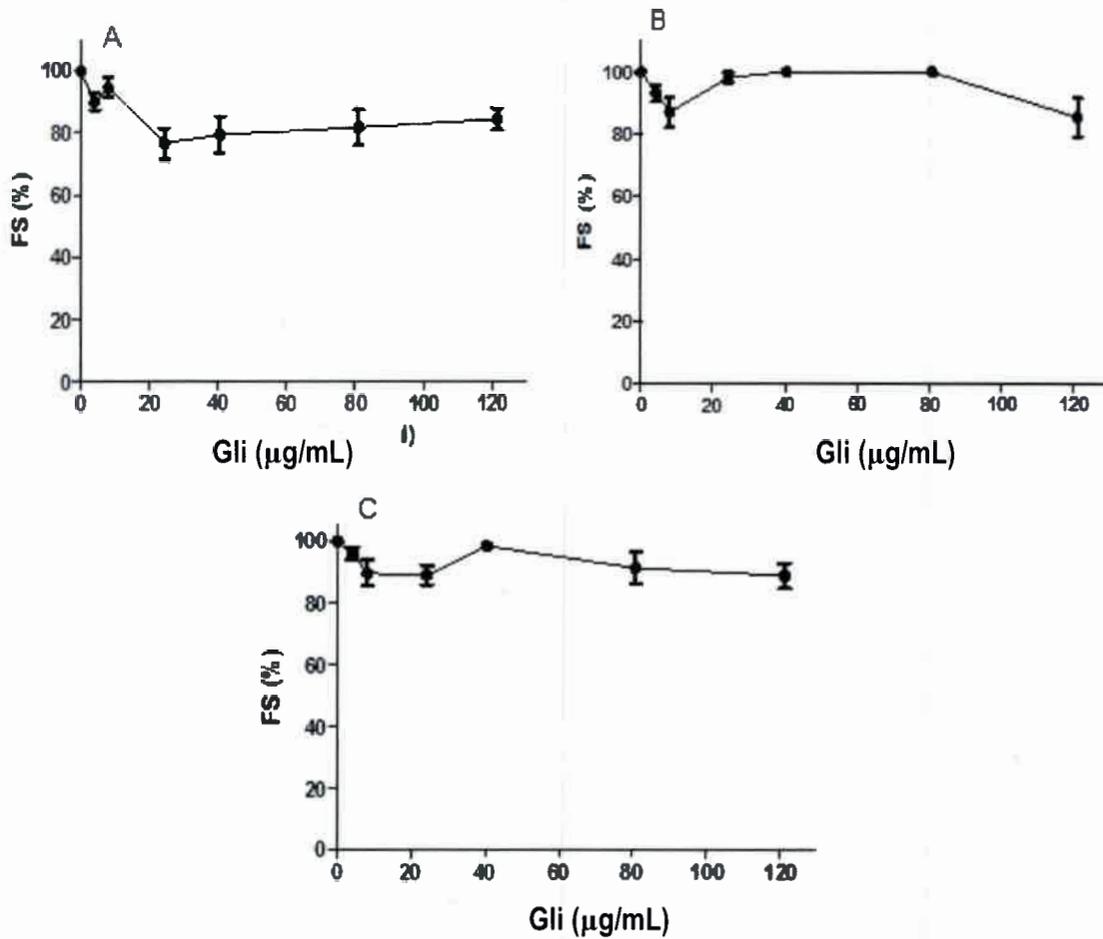


Figura 36: Curvas de supervivencia de células Vero en fase estacionaria, determinadas por captación de RN, luego del tratamiento con soluciones de Gli/PN ($Gli_{stock}=1617 \mu\text{g/mL}$; $PN=0,5 \mu\text{g/ml}$); **A:** sin irradiar, **B:** irradiadas por 45 minutos y **C:** irradiadas por 75 minutos.

Los resultados muestran que la fracción de supervivencia en los tres casos se encuentra entre 75 y 100%. Estos elevados valores de porcentaje indicarían que a la máxima concentración utilizada de Gli (121 $\mu\text{g/mL}$) no se observa efecto citotóxico sobre los cultivos celulares. Probablemente la CC_{50} del antidiabético se encuentra por encima de 121 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados confirman las observaciones realizadas luego de la inspección de los cultivos celulares al microscopio óptico.

III-3. CONCLUSIONES

- ❖ A partir de los ensayos de citotoxicidad *in vitro* sobre la línea celular Vero, se pudo verificar que el sensibilizador PN resulta tóxico en concentraciones mayores a 5 $\mu\text{g/mL}$, independientemente del tiempo de irradiación. Esta citotoxicidad resulta disminuida en presencia de Gli, la cual podría tener un efecto protector antioxidante en los cultivos celulares. A su vez, este efecto protector disminuye con el tiempo de irradiación, posiblemente debido a la fotodegradación de Gli.
- ❖ Se pudo comprobar que Gli y sus productos de oxidación, generados por reacción con $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, no resultan citotóxicos bajo las condiciones experimentales ensayadas.

**III-4: ESTUDIOS DE LA INFLUENCIA DE GLUCOSA SOBRE
LA INTERACCIÓN Andb-HSA Y LOS PROCESOS DE
FOTODEGRADACIÓN MEDIADOS POR $O_2(^1\Delta g)$**

III-4.1. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE GLUCOSA EN LA INTERACCIÓN Andb-HSA

Para determinar el efecto de glucosa sobre los procesos de interacción entre HSA y los Andb, se realizaron en primer lugar, experimentos de *quenching* de fluorescencia de HSA por glucosa, en ausencia de los Andb, con el fin de evaluar si el carbohidrato es capaz de desactivar la emisión de fluorescencia de la proteína. Luego, se realizaron los experimentos de *quenching* de fluorescencia de HSA por Gli y Glip en presencia de una concentración de glucosa $1,2 \times 10^{-2}$ M = 216mg/dL (Situación de hiperglucemia). Los resultados se muestran a continuación.

III-4.1.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE GLUCOSA SOBRE HSA

Para evaluar el efecto de glucosa en el comportamiento de HSA, se realizaron dos experimentos. Por un lado, se registraron los espectros de emisión de HSA ($\lambda_{exc} = 295$ nm) en presencia de diferentes concentraciones de glucosa ($0 - 1,3 \times 10^{-2}$ M). Los resultados se muestran a continuación.

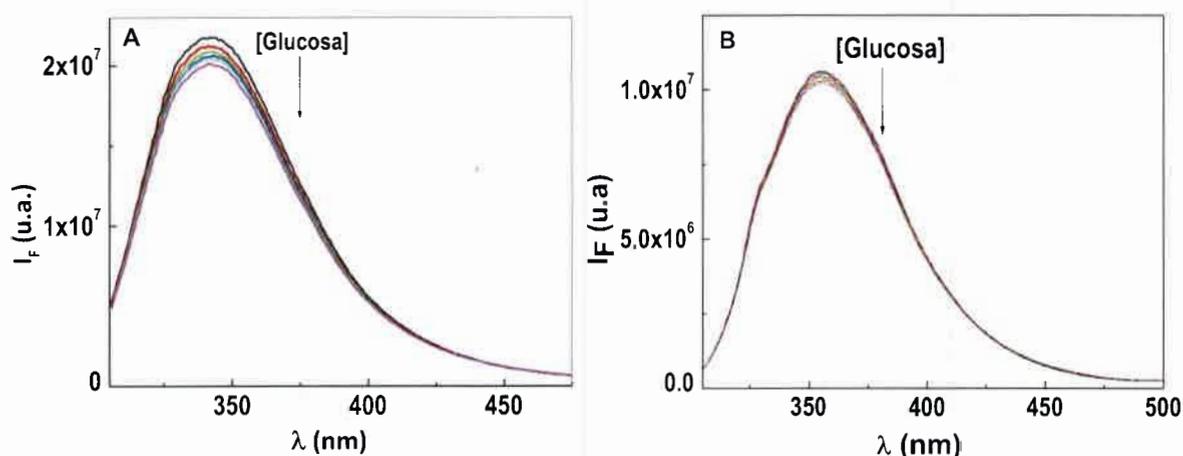


Figura 37: A: Espectros de emisión de HSA 1×10^{-5} M ($\lambda_{exc} = 295$ nm) en solución reguladora de pH 7,4 en presencia de diferentes concentraciones de glucosa ($0 - 1,3 \times 10^{-2}$ M). B: Espectros de emisión de L-triptófano 1×10^{-5} M ($\lambda_{exc} = 295$ nm) en solución reguladora de pH 7,4 en presencia de agregados de glucosa en concentraciones ($0 - 1,3 \times 10^{-2}$ M).

Como se observa en la Figura 37 A, existe una disminución en el máximo de emisión de HSA en presencia de concentraciones crecientes de glucosa. A partir del análisis de *Stern-Volmer* (I_0/I vs. [Glucosa]), se obtiene una relación lineal de la que se obtiene un valor de K_{SV} de $6,9 \text{ M}^{-1}$. Considerando la máxima concentración de glucosa empleada en estos experimentos ($1,3 \times 10^{-2}$ M) y el valor de K_{SV} , se puede decir que glucosa desactiva aproximadamente el 10% de la emisión de HSA.

Por otro lado, con el fin de obtener información que permita interpretar estos resultados, se realizó un experimento de *quenching* de fluorescencia de una muestra de triptófano libre en solución, en presencia de glucosa (Figura 37 B). Al comparar los resultados de ambos experimentos, se puede observar que la emisión del aminoácido libre en solución no es desactivada significativamente por glucosa, mientras que sí existe una disminución cuando el aminoácido forma parte de la proteína. Este resultado indicaría que el entorno que posee Trp214 en HSA (influencia de otros residuos aminoacídicos en la polaridad o distribución de carga), no solo afecta el comportamiento del aminoácido en la proteína, sino que además se está modificando en presencia de glucosa de manera que la desactivación sea mayor, respecto del comportamiento de dicho aminoácido en solución.

III-4.1.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN Andb-HSA EN PRESENCIA DE GLUCOSA

Los experimentos de *quenching* de fluorescencia de HSA por los Andb en presencia de glucosa se llevaron a cabo a una concentración de glucosa de $1,2 \times 10^{-2} \text{ M} = 216 \text{ mg/dL}$ (situación de hiperglucemia). En este punto cabe aclarar que la contribución a la desactivación de HSA por el carbohidrato puede considerarse despreciable, ya que en estas condiciones glucosa desactiva menos del 10% de la emisión de la proteína; es decir que el *quenching* de HSA sigue siendo debido, principalmente, al Andb. Los resultados se muestran en las siguientes figuras.

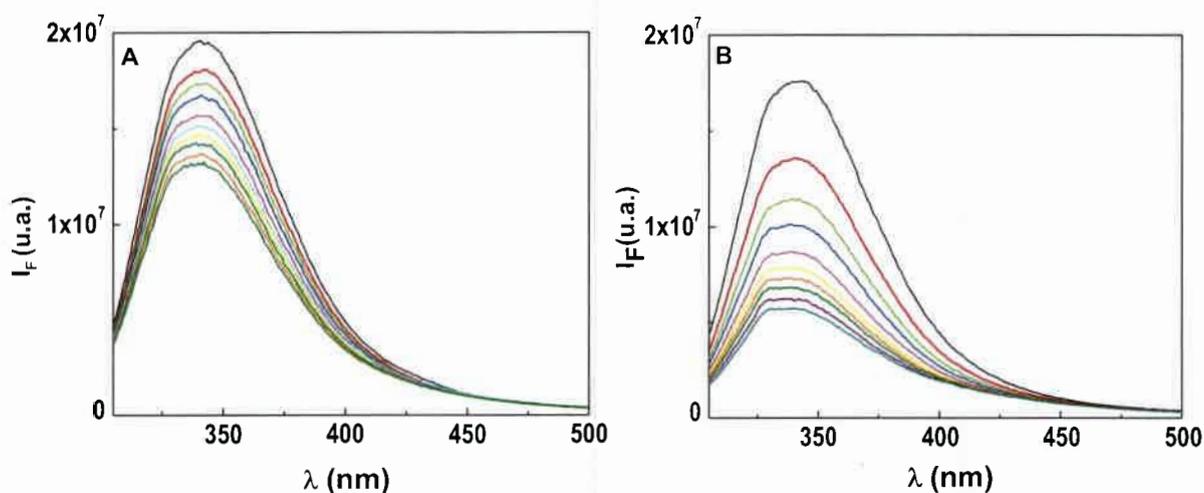


Figura 38: Espectros de emisión de HSA $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ / glucosa $1,2 \times 10^{-2} \text{ M}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$) en solución reguladora de pH 7,4 en presencia de agregados ($0-1 \times 10^{-4} \text{ M}$) de **A:** Gli y **B:** Glip.

Como se observa en la Figura 38 (A y B), la emisión de fluorescencia de HSA resultó ser disminuida por los Andb, en presencia del carbohidrato. A partir de los resultados anteriores, se realizó un análisis clásico de *Stern-Volmer* (Figuras 39 A y B).

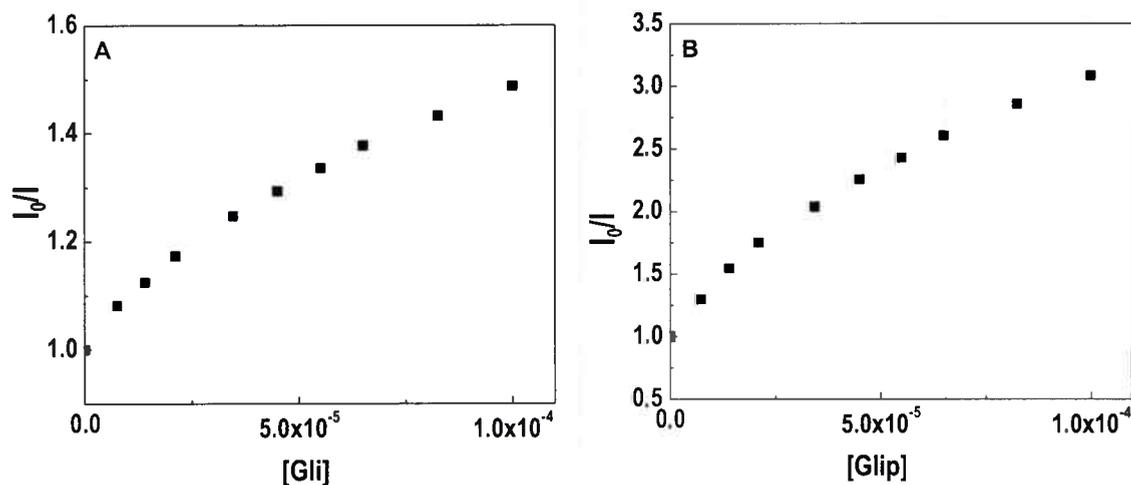


Figura 39: Gráficos del análisis clásico de *Stern-Volmer*. A: sistema Gli-HSA y B: sistema Glip-HSA. Estudios en presencia de glucosa $1,2 \times 10^{-2}$ M.

En este caso, al igual que en los resultados obtenidos para la desactivación de fluorescencia de HSA por los Andb en ausencia de glucosa, se observa una curvatura hacia el eje de las abscisas en los gráficos de *Stern-Volmer* (I_0/I vs. [Andb]). De igual manera, podría atribuirse dicha curvatura a que los Andb no desactivan completamente de fluorescencia de HSA y/o a la unión de los Andb en diferentes tipos de sitios en la proteína.

III-4.1.3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE *BINDING* DEL SISTEMA Andb-HSA EN PRESENCIA DE GLUCOSA

A partir de los resultados de *quenching* de fluorescencia de HSA por los Andb en presencia de glucosa $1,2 \times 10^{-2}$ M, se determinaron los valores correspondientes de constantes de *binding* y número de sitios involucrados, siguiendo la metodología ya señalada (Materiales y Métodos, sección II-3.1).

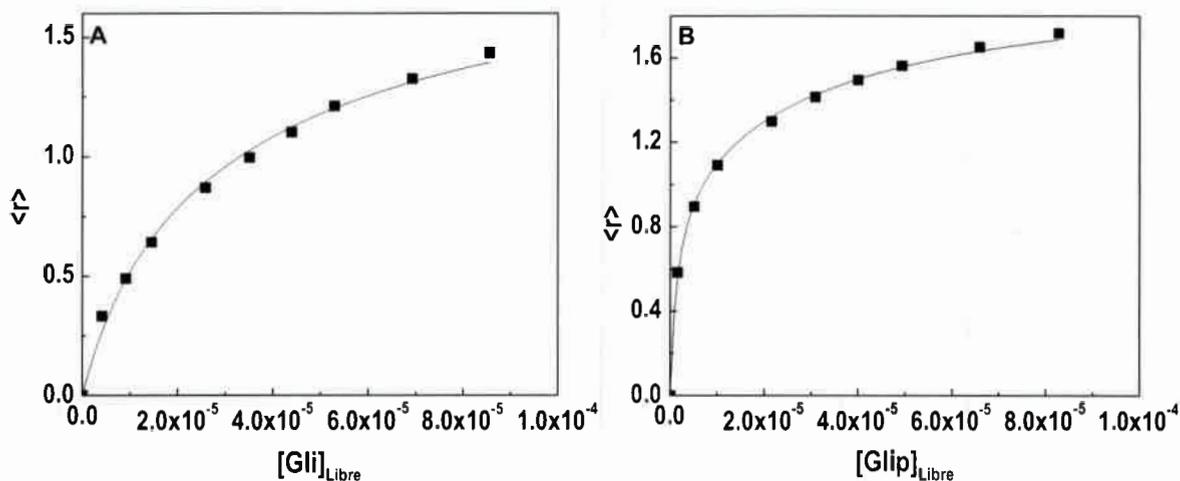


Figura 40: Isotermas de *binding* para la interacción A: Gli-HSA y B: Glip-HSA en presencia de glucosa $1,2 \times 10^{-2}$ M.

Los datos experimentales obtenidos para las isotermas de *binding* (Figura 40), pudieron ser ajustados adecuadamente suponiendo dos sitios de interacción en la proteína tanto para Gli como para Glip ($n=2$ en la Ecuación 18, Materiales y Métodos, sección II-3.1). Los correspondientes valores de constantes de asociación se muestran en la Tabla 12, se incluyen también los valores obtenidos en ausencia de glucosa (Resultados, sección III-1.2.1), a fines comparativos.

Tabla 12: Parámetros de *binding* para las interacciones Gli-HSA y Glip-HSA en ausencia y en presencia de glucosa $1,2 \times 10^{-2}$ M.

[Glucosa]	Sistema Gli-HSA		Sistema Glip-HSA	
	$K_{bi} \times 10^{-4} (M^{-1})$	$K_{bil} \times 10^{-4} (M^{-1})$	$K_{bi} \times 10^{-4} (M^{-1})$	$K_{bil} \times 10^{-4} (M^{-1})$
0	$4,4 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	31 ± 2	$2,5 \pm 0,1$
$1,2 \times 10^{-2}$	$6,5 \pm 0,8$	$1,4 \pm 0,1$	69 ± 4	$2,9 \pm 0,1$

Como se observa en la Tabla 12, los valores de constantes de asociación para uno de los sitios de interacción (identificado como sitio i) en presencia de glucosa para ambos Andb, aumentan respecto de los valores obtenidos en ausencia del carbohidrato. En este sentido, existen evidencias que indican un aumento en las constantes de *binding* de HSA con determinados sustratos en presencia de glucosa.³⁴² En nuestro caso, se podría proponer que el aumento en la afinidad de HSA por los Andb en presencia de glucosa, ocurriría a través de una asociación entre el carbohidrato y los Andb, tal que genere un aumento en la capacidad de formación de puentes de hidrógeno (como consecuencia de un aumento en la cantidad de grupos OH).³⁴² En este punto,

es importante recordar las evidencias experimentales que indicaron a los puentes de hidrogeno como posibles interacciones puestas en juego en el *binding* entre HSA y los Andb (Resultados, secciones III-1.2.2.c y III-1.2.2.d).

Otra hipótesis que podría explicar este comportamiento está relacionada a los resultados obtenidos en los experimentos de *quenching* de fluorescencia de HSA por glucosa, en comparación con los resultados obtenidos para triptófano libre en solución. A partir de estas observaciones, sería viable la posibilidad de que glucosa genere cambios en la proteína que alteren el entorno de los sitios donde se unen los Andb, exponiendo u ocultando algunos residuos, modificando consecuentemente su afinidad.

Por su parte, los valores de las constantes de asociación para el sitio de interacción identificado como sitio ii, podrían considerarse similares a los valores obtenidos en ausencia de glucosa, dentro del error experimental. Este último resultado indica que probablemente este sitio no se vea modificado en presencia del carbohidrato, de manera que las interacciones son similares a las que se establecen en ausencia del mismo.

III-4.2. ESTUDIOS DE LA INFLUENCIA DE GLUCOSA SOBRE LOS PROCESOS DE FOTODEGRADACIÓN MEDIADOS POR $O_2(^1\Delta_g)$

El efecto de glucosa sobre los procesos de fotodegradación mediados por $O_2(^1\Delta_g)$ de los sistemas Gli, Glip, HSA, Gli-HSA y Glip-HSA, fue estudiado a través de experimentos de fotooxidación sensibilizada por PN, por irradiación estacionaria (determinación de velocidades de consumo de oxígeno) y por medidas resueltas en el tiempo (determinación de las constantes de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$, k_t).

III-4.2.1. DETERMINACIÓN DE LAS VELOCIDADES RELATIVAS DE CONSUMO DE OXÍGENO DE LOS SISTEMAS Andb Y Andb-HSA

Se determinaron las velocidades de consumo de oxígeno, con PN como sensibilizador, para Gli 5×10^{-4} M, Glip 2×10^{-4} M, HSA 1×10^{-5} M y las mezclas Gli-HSA (5×10^{-4} M: 1×10^{-5} M) y Glip-HSA (2×10^{-4} M: 4×10^{-6} M) en ausencia y en presencia de glucosa a cuatro concentraciones: 1×10^{-3} M, 5×10^{-3} M, $1,2 \times 10^{-2}$ M y $1,7 \times 10^{-2}$ M. Los resultados se muestran en las siguientes tablas expresados como velocidades de consumo de oxígeno relativas a la velocidad de consumo de oxígeno de cada sistema en ausencia de glucosa.

Tabla 13: Velocidades relativas de consumo de oxígeno, con PN como sensibilizador, para Gli, HSA y Gli-HSA en ausencia y en presencia de glucosa a diferentes concentraciones. s/d: sin datos.

Glucosa		v_r				
		0 M	1×10^{-3} M	5×10^{-3} M	$1,2 \times 10^{-2}$ M	$1,7 \times 10^{-2}$ M
Sistema						
Gli		1.0	1.1	1.0	1.2	1.0
HSA		1.0	s/d	s/d	1.0	0.9
Gli-HSA		1.0	0.9	0.8	0.9	1.1

Tabla 14: Velocidades relativas de consumo de oxígeno, con PN como sensibilizador, para Glip, HSA y Glip-HSA en ausencia y en presencia de glucosa a diferentes concentraciones. s/d: sin datos.

Glucosa		v_r				
		0 M	1×10^{-3} M	5×10^{-3} M	$1,2 \times 10^{-2}$ M	$1,7 \times 10^{-2}$ M
Sistema						
Glip		1.0	2.0	3.6	4.6	4.3
HSA		1.0	s/d	s/d	1.0	0.9
Glip-HSA		1.0	0.8	1.0	0.9	1.1

Los resultados que se muestran en la Tabla 13, indican que las velocidades relativas de consumo de oxígeno por los sustratos Gli, HSA y Gli-HSA, no se ven afectados significativamente por la presencia de glucosa bajo las concentraciones empleadas.

Por otro lado, se puede notar un aumento en los valores de v_r de Glip con el incremento de la concentración de glucosa. Este comportamiento podría deberse, en principio, a un aumento en la viscosidad local del sistema, inducido por glucosa. Estudios previos, en los que se propone un mecanismo de reacción por formación de un complejo de encuentro entre el sustrato fotooxidable y $O_2(^1\Delta_g)$, han reportado un notable incremento en las velocidades de reacción con la viscosidad, bajo condiciones de pre-equilibrio (Introducción, sección I-3.4.2).³⁴³ Estas condiciones de pre-equilibrio se pueden alcanzar cuando los sustratos son poco reactivos o poseen valores de constantes de velocidad de desactivación reactiva de $O_2(^1\Delta_g)$ (k_r) del orden de $10^6 M^{-1}s^{-1}$ o valores menores.³⁴³ En estos casos, una vez que las especies se reúnen en el complejo, un aumento de viscosidad podría generar una disminución en los coeficientes de difusión de las especies y una consecuente disminución en la constante de velocidad de ruptura del complejo de encuentro (k_{dif}). Esto aumenta las probabilidades de colisión entre el sustrato y $O_2(^1\Delta_g)$, de manera que la

reactividad aumenta. Este podría ser el caso del comportamiento de Glip como sustrato fotooxidable.

Como puede observarse, el comportamiento reactivo de Glip frente a $O_2(^1\Delta_g)$ en presencia de glucosa de Glip es diferente al de Gli. Una hipótesis que podría explicar estas discrepancias se encuentra en los fundamentos del modelo de reacción por formación de un complejo de encuentro al que se hizo referencia en el párrafo anterior. Como se mencionó, solo los sustratos poco reactivos pueden alcanzar las condiciones de pre-equilibrio, en las que, factores como la viscosidad, pueden aumentar su reactividad frente a $O_2(^1\Delta_g)$. En este punto es interesante tener en cuenta los resultados de fotooxidación sensibilizada por PN en ausencia de glucosa (Resultados, sección III-2.2.2), en los que se observó que Gli es más reactiva que Glip. Además, en experimentos preliminares se estimaron los valores de k_r (mediante un método comparativo, empleando Furfuril Alcohol como compuesto de referencia)³⁴⁴ para ambos Andb. Los resultados obtenidos indicaron valores de k_r del orden de $10^7 M^{-1}s^{-1}$ para Gli, y del orden de $10^6 M^{-1}s^{-1}$ para Glip. Por lo tanto, la diferencia en el comportamiento de ambos Andb en presencia de glucosa puede deberse a que únicamente Glip pueda encontrarse en condiciones de pre-equilibrio y experimentar un aumento en su reactividad frente a $O_2(^1\Delta_g)$ debido a un incremento en la viscosidad del medio.

En presencia de HSA se observa que la velocidad de consumo de oxígeno por Glip no se ve afectada por la concentración de glucosa. El sistema Glip-HSA sigue la tendencia de comportamiento fotorreactivo de la proteína. Por lo tanto se puede inferir que en estas condiciones HSA estaría ejerciendo un efecto protector sobre la fotodegradación de Glip frente a un incremento en las concentraciones de glucosa.

III-4.2.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE DESACTIVACIÓN TOTAL DE $O_2(^1\Delta_g)$ (k_t)

El efecto de glucosa sobre la constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ (k_t) fue evaluado para los sistemas Gli, Glip, HSA, Gli-HSA y Glip-HSA en presencia de dos concentraciones de glucosa ($5 \times 10^{-3} M$ y $1,7 \times 10^{-2} M$). La cuantificación de k_t fue realizada mediante la técnica TRPD (Materiales y Métodos, sección II.2.6). A continuación se muestran algunos de los gráficos obtenidos del análisis clásico de *Stern-Volmer* (Figura 41) y los valores de k_t obtenidos se presentan en la Tabla 15.

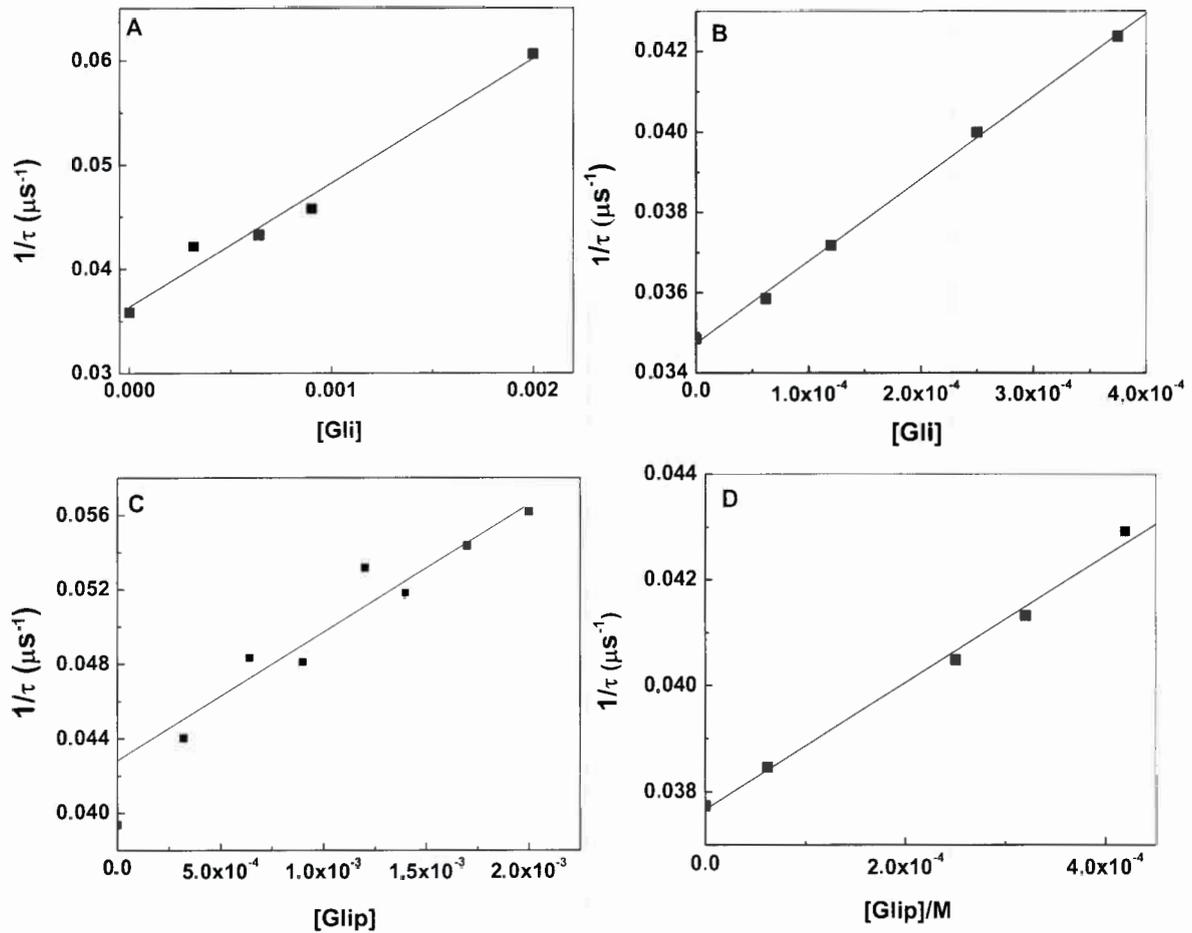


Figura 41: Gráficos de Stern-Volmer para la desactivación total de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por: A: Gli, B: Gli-HSA, C: Glip, D: Glip-HSA en solución reguladora de pD 7,4/ CD_3OD (10%)/glucosa $1,7 \times 10^{-2}$ M. En los sistemas que contienen la proteína, la concentración de la misma fue constante e igual a 1×10^{-5} M.

Tabla 15: Constantes de velocidad de desactivación total de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por Gli, Glip, HSA, Gli-HSA y Glip-HSA en ausencia y en presencia de glucosa, s/d: sin datos.

Glucosa		$k_t \times 10^{-7} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$		
		0 M	5×10^{-3} M	$1,7 \times 10^{-2}$ M
Sistema	Gli	$2,0 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
	Gli-HSA	$4,5 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,2$
	Glip	$1,2 \pm 0,1$	$0,82 \pm 0,08$	$0,68 \pm 0,08$
	Glip-HSA	$4,7 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,7$	$1,2 \pm 0,1$
	HSA	80 ± 8	s/d	s/d

Como se observa en la Tabla 15, los valores de k_t tienden a disminuir levemente en presencia de glucosa para Gli y Glip. En el caso específico de Gli, teniendo en cuenta que glucosa no causa un efecto apreciable sobre las velocidades relativas de consumo de oxígeno, puede decirse que la disminución en los valores de k_t podrían estar indicando que en presencia del carbohidrato, solo estaría desfavorecida la vía de desactivación física de $O_2(^1\Delta_g)$ por Gli (proceso [10] del Esquema 14, Introducción, sección I-3.5.5).

En el caso de Glip, se observó un aumento en las velocidades relativas de consumo de oxígeno con la concentración de glucosa. Sin embargo, en las mismas condiciones existe una disminución en los valores de k_t . Este resultado solo podría explicarse si la componente de desactivación física (k_q) predomina sobre la componente reactiva en el proceso de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$. De esta manera, en presencia de glucosa, la componente física se vería desfavorecida, causando así una disminución en los valores de constante de velocidad de desactivación total (k_t).

Por su parte, es interesante destacar que para los sistemas Gli-HSA y Glip-HSA, existe una disminución mucho más prominente en los valores de k_t con el incremento en la concentración de glucosa. Esto podría indicar que frente a situaciones de hiperglucemia, la interacción de los sistemas Andb-HSA con $O_2(^1\Delta_g)$ es mucho menor, respecto de la interacción de los sistemas Andb-HSA en ausencia de glucosa.

III-4.3. CONCLUSIONES

- ❖ Se pudo comprobar que en presencia de glucosa, el entorno que HSA proporciona a Trp214 se modifica y favorece la desactivación de fluorescencia por el carbohidrato, respecto del comportamiento de dicho aminoácido en solución.
- ❖ Los gráficos del análisis clásico de *Stern-Volmer* en presencia de glucosa, se comportan de igual manera que en ausencia de la misma: existe una curvatura hacia el eje de las abscisas, que puede deberse a la desactivación incompleta de la emisión de HSA por los Andb y/o a la existencia de diferentes tipos de sitios de interacción en la proteína.
- ❖ Las constantes de *binding* Andb-HSA aumentan en presencia de glucosa, debido probablemente a una asociación entre los Andb con el carbohidrato que causa un aumento en la capacidad de formar puentes de hidrógeno con los sitios interacción en la proteína y/o a modificaciones en la estructura de HSA en presencia de glucosa, que generan cambios en la afinidad.
- ❖ La velocidad relativa de consumo de oxígeno no se ve modificada por glucosa en el caso de Gli, mientras que experimenta un aumento en el caso de Glip. El mismo podría estar relacionado con un incremento en la reactividad de Glip, proveniente de un aumento en la viscosidad con la concentración de glucosa. Este aumento se ve disminuido en presencia de HSA, de manera que es posible que la proteína esté ejerciendo un efecto protector del sistema como un todo en presencia de glucosa.
- ❖ La contribución física al proceso de desactivación global de $O_2(^1\Delta_g)$ parece ser la componente dominante del proceso en el caso de Glip y se ve desfavorecida en presencia de glucosa para ambos Andb. Por su parte, la disminución observada en los valores de k_t de los sistemas Andb-HSA con la concentración de glucosa indica que dichos sistemas interaccionan en menor medida con $O_2(^1\Delta_g)$ en presencia del carbohidrato que en ausencia del mismo.

V.CONCLUSIONES

La interacción Gli-HSA y Glip-HSA pudo ser caracterizada a través de estudios de *quenching* de fluorescencia y de acoplamiento molecular. A través de los primeros, fue posible evidenciar la asociación Andb-HSA mediante la existencia de *quenching* estático y la curvatura hacia el eje de las abscisas del análisis clásico de *Stern-Volmer*. Además, se pudieron emplear estos datos para la construcción de isothermas de *binding* que permitieron deducir dos sitios diferentes de interacción para ambos Andb en HSA y la cuantificación de las constantes de *binding* (K_b). A partir de la variación de K_b en función de la temperatura, se pudo realizar un análisis termodinámico de la interacción Glip-HSA. Los resultados indicaron que dicho proceso es espontáneo y entálpicamente controlado. Estos estudios también sugirieron que las interacciones predominantes son las puentes de hidrogeno y las interacciones hidrofóbicas. Todos estos resultados fueron complementados por los experimentos de acoplamiento molecular, que confirmaron la asociación de ambos Andb en dos sitios, identificados como sitio II y sitio extra de HSA. Además se pudo especificar y corroborar que las interacciones son del tipo puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, a través de un estudio más detallado de las características de los aminoácidos que rodean los sitios involucrados. De esta manera, los resultados experimentales y los obtenidos por acoplamiento molecular son coincidentes y complementarios.

Los procesos de fotodegradación de los Andb sensibilizados por Rf permitieron observar principalmente la interacción de Gli y Glip con el estado electrónicamente excitado triplete de Rf ($^3Rf^*$). La misma se pudo evidenciar en una disminución en la zona típica de absorción del $^3Rf^*$ y la formación del radical neutro de Rf ($Rf\bullet$) en los espectros de especies transitorias del sensibilizador en presencia de los Andb. Los valores de 3k_q indicaron una mayor interacción de Gli que de Glip con $^3Rf^*$. Por otro lado, la evaluación de las velocidades relativas de consumo de oxígeno en presencia de inhibidores específicos para EROs, demostró la participación de $O_2(^1\Delta_g)$ para ambos Andb y $O_2\bullet^-$ para el caso de Gli en el mecanismo de fotodegradación de Andb sensibilizada por Rf.

La cuantificación de la participación de $O_2(^1\Delta_g)$ en el proceso degradativo de los sistemas en estudio, se realizó mediante estudios de fotodegradación sensibilizados por PN. Estos resultados indicaron que la presencia de HSA podría generar un efecto protector para el sistema Glip-HSA frente a $O_2(^1\Delta_g)$, respecto a la proteína libre. También, se observó que Gli es más reactiva frente a $O_2(^1\Delta_g)$ que Glip. Por otro lado, a partir de los valores de las constantes de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ (k_t), se pudo observar que HSA es un desactivador de $O_2(^1\Delta_g)$ más efectivo que los Andb y además, que el proceso de *binding* causa una disminución en los valores

de k_t de los sistemas Gli-HSA y Glip-HSA, efecto que se atribuye a una reducción en la disponibilidad de los residuos Tyr de HSA que pueden desactivar físicamente a $O_2(^1\Delta_g)$ y que están involucrados en la interacción con los Andb en ambos sitios de *binding*.

Por otra parte, el análisis de los productos de reacción de Gli con $O_2(^1\Delta_g)$ demostró que Gli reacciona con tres moléculas de oxígeno, formando dos fotoproductos principales. El primero incorpora dos átomos de oxígeno al heterociclo con enlaces carbonilo y el segundo incorpora cuatro oxidrilos distribuidos entre el anillo aromático y el heterociclo. En este sentido, se demostró que tanto Gli como sus productos de fotooxidación no resultan tóxicos sobre la línea celular Vero, bajo las condiciones experimentales ensayadas. Sin embargo, PN resulta tóxico en concentraciones mayores a 5 $\mu\text{g/mL}$. Es interesante notar que esta citotoxicidad resulta disminuida en presencia de Gli, el cual podría tener un efecto protector antioxidante en los cultivos celulares, lo cual hace que aumente la supervivencia celular.

Finalmente, en presencia de glucosa los Andb se unen a dos sitios de interacción y con una mayor afinidad que en ausencia del carbohidrato, comportamiento que podría ser atribuido a asociaciones entre el carbohidrato y los Andb que aumentaría sus capacidades de formar puentes de hidrogeno y/o a cambios estructurales en presencia de glucosa que afectarían la afinidad de la proteína por los Andb. Los procesos de fotodegradación mediada por $O_2(^1\Delta_g)$ indicaron que Gli no modifica su reactividad en presencia de glucosa, mientras que Glip aumenta su reactividad, probablemente debido a un aumento en la viscosidad local. Por su parte, se pudo notar que la contribución física al proceso de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ parece ser la componente dominante del proceso en el caso de Glip y que se ve desfavorecida en presencia de glucosa para ambos Andb. También se pudo observar que HSA reduce las interacciones con $O_2(^1\Delta_g)$ en condiciones de hiperglucemia. Este hecho se manifestó principalmente en una reducción en los valores de k_t de los sistemas Andb-HSA, relativo al comportamiento de los mismos en ausencia del carbohidrato.

V. APÉNDICE

V-1. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS ANTIDIABÉTICOS

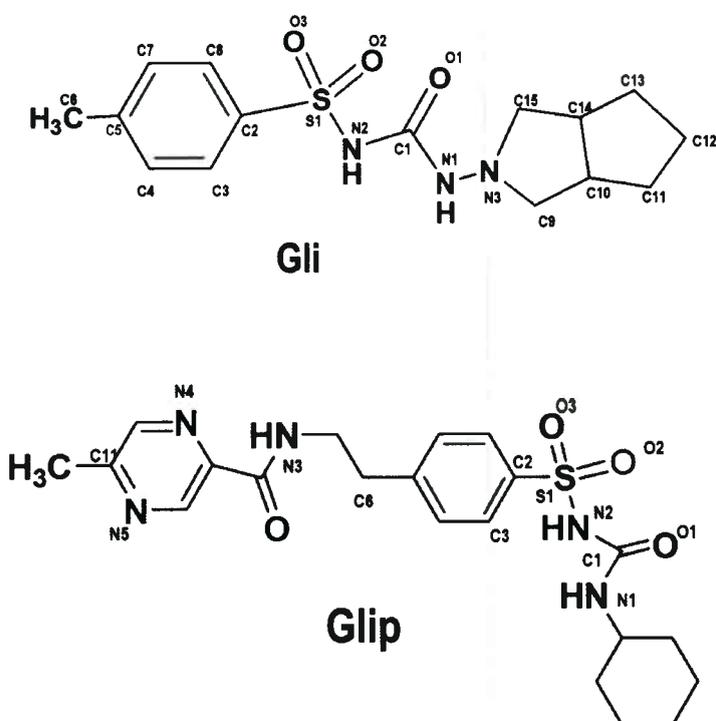


Figura 42: Estructuras químicas de Gliclazida (Gli) y Glipizida (Glip)

V-2. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE AMINOÁCIDOS FOTOOXIDABLES

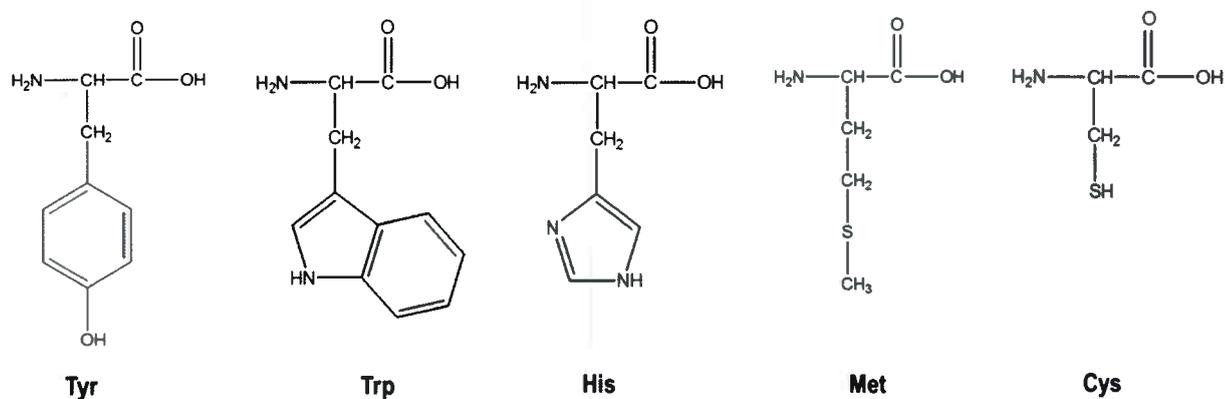


Figura 43: Estructuras químicas de aminoácidos fotooxidables.

V-3. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE SENSIBILIZADORES EMPLEADOS

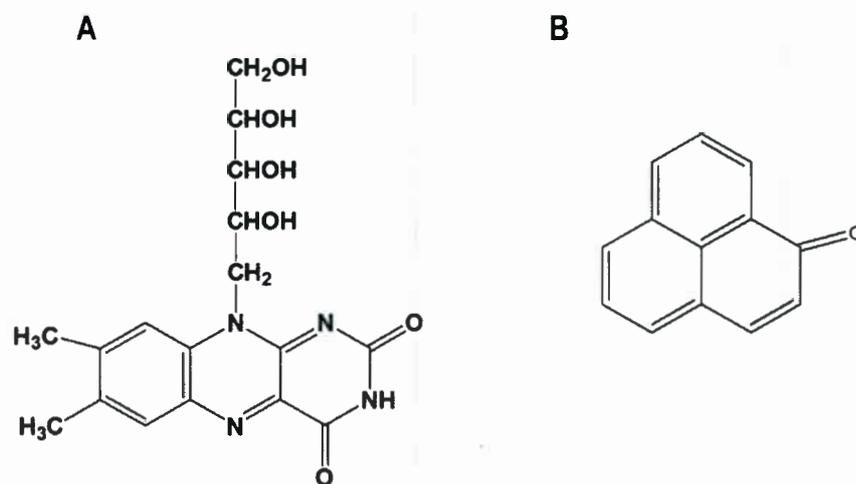


Figura 44: **A:** Estructura química de Rf: 7,8-dimetil-10 (1'-D-ribitilo) isoaloxazina, **B:** Estructura química de Perinaftenona (PN)

V. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Alfadda, A. A., Sallam, R. M. (2012) *J. Biomed. Biotechnol.*, 12, 1.
- ² Brieger, K., Schiavone, S., Miller F. J. Jr., Krause, K. H. (2012) *Swiss Med Wkly.*, 142:w13659.
- ³ Bayr, Hülya M. D. (2005) *Crit. Care Med.*, 33(12), S498.
- ⁴ Apel, K., Hirt, H. (2004) *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373.
- ⁵ International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 5th edition. (2011). Brussels, Belgium. International Diabetes Federation
- ⁶ Sawada, F., Inoguchi, T., Tsubouchi, H., Sasaki, S., Fujii, M., Maeda, Y., Morinaga, H., Nomura, M., Kobayashi, K., Takayanagi, R. (2008) *Metab., Clin. Exp.*, 57, 1038.
- ⁷ Remko, M. J. (2009) *J. Mol. Struct-THEOCHEM*, 897, 73.
- ⁸ Bourdon, E., Blache, D. (2001). *Antioxid. Redox Signal*, 3, 293.
- ⁹ Winterbourn, C. C., Hampton, M. B. (2008) *Free Radical Biol. Med.*, 45(5), 549.
- ¹⁰ Dröge, W. (2002) *Physiol. Rev.*, 82 (1), 47.
- ¹¹ Waris, G., Ahsan, H. (2006) *J. Carcinog.*, 5,14.
- ¹² Rudich, A., Tilrosh, A., Potashnik, R., Hemi, R., Kanety, H., Bashan, N. (1998) *Diabetes*, 47(10), 1562.
- ¹³ Loukogeorgakis, S. P., Van den Berg, M. J., Sofat, R., Nitsch, D., Charakida, M., Haiyee, B. (2010) *Circulation.*, 121(21), 2310.
- ¹⁴ Butterfield, D. A. (1997) *Chem. Res. Toxicol.* 10, 495.
- ¹⁵ Nohl H. (1993) *Br. Med. Bull.*, 49, 653.
- ¹⁶ Gribble, F. M., Riemann, F. (2003) *Diabetología*, 46, 875.
- ¹⁷ Bansal, B., Singh, M., Jindal, K. C., Singh, S. (2008) *J. Chromatogr. Sci.* 46, 510.
- ¹⁸ Selvaag, E., Anholt, H., Moan, J., Thune, P. (1997) *In Vivo*, 11(1), 103.
- ¹⁹ Selvaag, E.; Thune, P. (1996) *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*, 12, 79.
- ²⁰ Gupta, A., Ahmad, W., Zaheer, D.R., Iqbal, J. (2013) *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 4(1), 840.
- ²¹ Kragh-Hansen, U., Chuang, V.T.G., Otagiri, M., (2002) *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 695.
- ²² Wang, Y., Tang B., Zhang H., Zhou Q., Zhang G. (2009) *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 94, 183.
- ²³ Honoré, B. (1990) *Pharmacol Toxicol*, 66, 1.
- ²⁴ Mallick, A., Purkayastha, P., Chattopadhyay, N. (2007) *J. Photochem. Photobiol. C: Photochemistry Reviews*, 8(3), 109.
- ²⁵ Roche, M., Rondeau, P., Singh, N.R., Tarnus, E., Bourdon, E. (2008). *FEBS Lett.*, 582, 1783.
- ²⁶ Lee, H., Cha, M.K., Kim, I.H. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, 380, 309.
- ²⁷ Rubbo, H., Parthasarathy, S., Barnes, S., Kirk, M., Kalyanaraman, B., Freeman, B.A. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, 324, 15.
- ²⁸ Quinlan, G. J., Martin, G. S., Evans, T. W. (2005) *Hepatology*, 41, 1211.
- ²⁹ Gutteridge, J. M. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, 869, 119.
- ³⁰ Carballal, S., Alvarez, B., Turell, L., Botti, H., Freeman, B. A., Radi, R. (2007) *Amino Acids*, 32, 543.
- ³¹ Halliwell, B. (1988) *Biochem. Pharmacol.*, 37, 569.

- 32 Frostell-Karlsson, A., Remaeus, A., Roos, H., Andersson, K., Borg, P., Hämäläinen, M., Karlsson, R. (2000) *J. Med. Chem.*, 43, 1986.
- 33 Ascoli, G. A., Bertucci, C., Salvadori, P. (1998) *Biomed. Chromatogr.*, 12, 248.
- 34 Ahmad, B., Parveen, S., Khan, R.H. (2006) *Biomacromol.*, 7, 1350.
- 35 Watanabe, H., Tanase, S., Nakajou, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M. (2000) *Biochem. J.*, 349, 813.
- 36 Sinha, S.S., Mitra, R.K., Pal, S.K. (2008) *J. Phys. Chem. B*, 112, 4884.
- 37 Lucas, L. H., Price, K. E., Larive, C. K. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 14258.
- 38 Colmenarejo, G., Alvarez-Pedraglio, A., Lavandera, J.L. (2001) *J. Med. Chem.*, 44, 4370.
- 39 Mahesha, H.G., Singh, S.A., Srinivasan, N., Rao, A.G. (2006) *FEBS J*, 273, 451.
- 40 Garg, A., Manidhar, D.M., Gokara, M., Mallela, C., Reddy, C.S., Subramanyam, R. (2013) *PLoS One*, 8(5): e63805.
- 41 Abou-Zied, O. K., AlShihi, O. I. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 10793.
- 42 Liang, H., Huang, J., Tu, C. Q., Zhang, M., Zhou, Y. Q., Shen, P. W. (2001) *J. Inorg. Biochem.*, 85, 167.
- 43 Shen, X. C., Liang, H., Guo, J. H., Song, C., He, X. W., Yuan, Y. Z. (2003) *J. Inorg. Biochem* 95, 124.
- 44 Stewart, A. J., Blindauer, C. A., Berezenko, S., Sleep, D., Sadler, P. J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 3701.
- 45 Blindauer, C. A., Harvey, I., Bunyan, K. E., Stewart, A. J., Sleep, D., Harrison, D.J., Berezenko, S., Sadler, P.J. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 23116.
- 46 Vallner, J.J. (1977) *J. Pharm. Sci.*, 66, 447.
- 47 Meyer, M. C., Guttman, D. E. (1968) *J. Pharm. Sci.*, 57, 895.
- 48 Tillement, J. P., Duché, J. C., Barré, J. (2006) *Bull. Acad. Natl. Med.*, 190, 935.
- 49 Sudlow, G., Birkett, D. J., Wade, D. N. (1975) *Mol. Pharmacol.*, 11, 824.
- 50 Sudlow, G., Birkett, D. J., Wade, D. N. (1976) *Mol. Pharmacol.*, 12, 1052.
- 51 Bos, O. J., Remijn, J. P., Fischer, M. J., Wilting, J., Janssen, L. H. (1988) *Biochem. Pharmacol.*, 37, 3905.
- 52 Yang, F., Yue, J., Ma, L., Ma, Z., Li, M., Wu, X., Liang, H. (2012) *Mol. Pharm.*, 9, 3259.
- 53 Curry, S. (2009) *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 24, 342.
- 54 Kragh-Hansen U., (1988) *Mol. Pharmacol.*, 34, 160.
- 55 Yamasaki, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M., (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1295, 147.
- 56 Kragh-Hansen, U., (1991) *Biochem. J.*, 273, 641.
- 57 Meisner, H., Neet, K., (1978) *Mol. Pharmacol.*, 14, 337.
- 58 Mudge, G. H., Desbiens, N., Stibitz, G. R., (1978) *Drug Metab. Dispos.*, 6, 432.
- 59 Takamura, N., Maruyama, T., Ahmed, S., Suenaga, A., Otagiri, M., (1997) *Pharm. Res.*, 14, 522.
- 60 Brée, F., Urien, S., Nguyen, P., Tillement, J. P., Steiner, A., Vallat-Molliet, C., Testa, B., Visy, J., Simonyi, M. (1993) *J. Pharm. Pharmacol.*, 45, 1050.
- 61 Takamura, N., Haruta, A., Kodama, H., Tsuruoka, M., Yamasaki, K., Suenaga, A., Otagiri, M., (1996) *Pharm. Res.*, 13, 1015.
- 62 Otagiri, M., Nakamura, H., Maruyama, T., Imamura, Y., Takadate, A., (1989) *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 498.
- 63 Fleury, F., Ianoul, A., Berjot, M., Feofanov, A., Alix, A. J. P., Nabiev, I., (1997) *FEBS Lett.*, 411, 215.
- 64 Yamasaki, K., Rahman, M. H., Tsutsumi, Y., Maruyama, T., Ahmed, S., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M., (2000) *AAPS PharmSciTech* 1(2) article 12.
- 65 Takamura, N., Shinozawa, S., Maruyama, T., Suenaga, A., Otagiri, M. (1998) *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 174.

- ⁶⁶ He, X. M., Carter, D. C. (1992) *Nature*, 358, 209.
- ⁶⁷ Petipias, I., Bhattacharya, A. A., Twine, S., East, M., Curry, S. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 22804.
- ⁶⁸ Yang, F., Bian, C., Zhu, L., Zhao, G., Huang, Z., Huang, M. (2007) *J. Struct. Biol.*, 157, 348.
- ⁶⁹ Buttar, D., Colclough, N., Gerhardt, S., MacFaul, P. A., Phillips, S. D., Plowright, A., Whittamore, P., Tam, K., Maskos, K., Steinbacher, S., Steuber, H. (2010) *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 7486.
- ⁷⁰ Ghuman, J., Zunszain, P. A., Petipias, I., Bhattacharya, A. A., Otagiri, M., Curry, S. (2005) *J. Mol. Biol.*, 353, 38.
- ⁷¹ Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P., Franks, N. (1998) *Nat. Struct. Biol.*, 5, 827.
- ⁷² Lejon, S., Frick, I.M., Björck, L., Wikström, M., Svensson, S.J. (2004) *Biol. Chem.*, 279, 42924.
- ⁷³ Bhattacharya, A. A., Curry, S., Franks, N. P. J. (2000) *Biol. Chem.*, 275, 38731.
- ⁷⁴ Yamaguchi, S., Aldini, G., Ito, S., Morishita, N., Shibata, T., Vistoli, G., Carini, M., Uchida, K. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 824.
- ⁷⁵ Mao, H., Hajduk, P.J., Craig, R., Bell, R., Borre, T., Fesik, S. W. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 10429.
- ⁷⁶ Zsila, F. (2013) *Mol. Pharmaceutics*, 10, 1668.
- ⁷⁷ Zsila, F., Bikadi, Z., Malik, D., Hari, P., Pechan, I., Berces, A., Hazai, E. (2011) *Bioinformatics*, 27(13), 1806.
- ⁷⁸ Buttar, D., Colclough, N., Gerhardt, S., MacFaul, P. A., Phillips, S. D., Plowright, A., Whittamore, P., Tam, K., Maskos, K., Steinbacher, S., Steuber, H. (2010) *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 7486.
- ⁷⁹ Colmenarejo, G. (2003) *Med. Res. Rev.*, 23, 275.
- ⁸⁰ Chen, L., Chen, X., (2012) *J. Mol. Graphics Modell.*, 33, 35.
- ⁸¹ Maiti, T. K., Ghosh, K. S., Dasgupta, (2006) *S. Proteins.*, 64(2), 355.
- ⁸² Tian, J., Liu, J., He, W., Hu, Z., Yao, X., Chen, X. (2004) *Biomacromolecules*. 5(5), 1956.
- ⁸³ Ionescu, S., Matei, I., Tablet, C., Hillebrand, M. (2013) *Curr Drug Metab.* 14(4), 474.
- ⁸⁴ Seedher, N., Kanojia, M. (2008) *Chem Biol Drug Des*; 72, 290.
- ⁸⁵ Seedher, N., Kanojia, M. (2009) *Cent. Eur. J. Chem.*, 7(1), 96.
- ⁸⁶ Chignell, C. F. (1973) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 226, 44.
- ⁸⁷ Joseph, K.S., Hage, D. S. (2010) *Journal of Chromatography B*, 878, 1590.
- ⁸⁸ Karasu, C. (2010) *Open Cardiovasc. Med. J.* 4, 240.
- ⁸⁹ Horie, K., Miyata, T., Maeda, K., Miyata, S., (1997) *J. Clin. Invest.*, 12, 2995.
- ⁹⁰ Wendt, T., Tanji, N., Guo, J. (2003) *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14, 1383.
- ⁹¹ Wautier, M-P, Chappey, O., Corda, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M., Wautier, J. L. (2001) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E685.
- ⁹² Holland, H. (2006). *Philos. Trans. R.Soc. London, B* 361, 903.
- ⁹³ Mulliken, R. S. (1928) *Nature*, 122(3075), 505.
- ⁹⁴ Mulliken, R. S. (1932) *Rev. Mod. Phys.* 4, 1.
- ⁹⁵ Turro N. J., (1978) *Modern Molecular Photochemistry*. Menlo Park, CA. The Benjamin Publishing Company, Inc. Columbia University.
- ⁹⁶ Badger, R.M., Wright, A.C., Withlock, R.F., (1965), *J. Chem.Phys.*, 43, 4345.
- ⁹⁷ Cadenas, E. (1989) *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 79.
- ⁹⁸ Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed., Oxford, Clarendon.
- ⁹⁹ Scurlock, R. D.; Wang, B., Ogilby, P. R. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 388.

- 100 Bodesheim, M., Schmidt, R. (1997) *J. Phys. Chem. A*, 101, 5672.
- 101 Foote, C. S. (1968) *Acc. Chem. Res.*, 1, 104.
- 102 Clennan, E. L., Pace, A. (2005) *Tetrahedron*, 61, 6665.
- 103 Halliwell, B. (1991) *Am. J. Medicine*, 9, (Supp. 3), 14S.
- 104 Klotz, L. O., (2002) *Biol. Chem.*, 383, 443.
- 105 Fridovich, I. (1974) *Adv. Enzymol.*, 41, 35.
- 106 Fridovich, I. (1983) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23, 239.
- 107 Murphy, M. P. (2009) *Biochem. J.*, 417, 1.
- 108 Casteilla, L., Rigoulet, M., Penicaud, L. (2001) *IUBMB Life*, 52, 181.
- 109 Bokoch, G. M., Knaus, U. G. (2003) *Trends Biochem. Sci.*, 28, 502.
- 110 Brandes, R. P., Kreuzer, J. (2005) *Cardiovasc. Res.*, 65,16.
- 111 Wolff, S. P., Dean, R. T. (1987) *Biochem. J.*, 245, 243.
- 112 Albro, P. W., Corbett, J. T., Schreeder, J. L. (1986) *J. Inorg. Biochem.*, 27, 91.
- 113 Vina, J., Saez, G.T., Wiggins, D., Roberts, A. F. C., Hems, R., Krebs, H. A. (1983) *J. Biochem.*, 212, 39.
- 114 Bieiski, B. H., Cabeui, D. E. (1996) *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 291.
- 115 Halliwell, B. (2006) *Plant Physiology*, 141, 312.
- 116 Beckman, J. S., Koppenol, W.H. (1996) *Am. J. Physiol.*, 271, 1424.
- 117 Erdamar, H., Demirci, H., Yaman, H., Erbil, M.K., Yakar, T., Sancak, B. (2008) *Clin. Chem. Lab. Med.*, 46(7), 1004.
- 118 Tu, B. P., Weissman, J. S. (2004) *Journal of Cell Biology*, 164(3), 341.
- 119 Forman, H. J., Boveris, A. (1982) Pryor WA (ed). *Free radicals in biology*. Vol. 5 (pp 65-90), New York: Academic Press.
- 120 Puppo, A.; Halliwell, B. (1988) *Biochem. J.* 249,185.
- 121 Goldstem, S., Meyerstein, D., Czapski, G. (1993) *Free Radic. Biol. Med.* 15, 435.
- 122 Weiss, S. S. (1989) *N. Engl. J. Med.*, 320, 365.
- 123 Halliwell, B, Aruoma, O. I. (1991) *FEBS Lett.*, 281, 9.
- 124 Aruoma, O. I, Halliwell, B., Dizdaroglu, M. (1989) *J. Biol Chem.*, 264, 13024.
- 125 Asmus, K. D. (1983) Sulfur-centered free radicals. En O.F. Nygaard and M.G. Simic (Eds.). *Radioprotectors and Anticarcinogens* (pp 23-42). Academic Press, New York, NY.
- 126 Sevilla, M. D., Yan, M., Becker, D., Gillich, S. (1989) *Free Radic. Res. Commun.* 6, 21.
- 127 Monig, J., Asmus, K. D., Forni, L. G., Willson, R. L. (1987) *Int. J. Radiat. Biol.*, 52, 589.
- 128 Liu, Y., Zhao, H., Li, H., Kalyanaraman, B., Nicolosi, A. C., Gutterman, D. D. (2003) *Circ. Res.*, 93(6), 573.
- 129 Guzy, R. D., Schumacker, P. T. (2006) *Exp. Physiol.*, 91(5), 807.
- 130 Dröge, W. (2002) *Physiol. Rev.*, 82(1), 47.
- 131 Rajendran, R., Garva, R., Krstic-Demonacos, M., Demonacos, C. (2011) *J. of Biomed. Biotechnol.*, 1-17, Article ID: 368276.
- 132 Robertson, A. P. (2004) *J. Biol. Chem.* 279(41), 42351.
- 133 Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., Lenzen, S. (1997) *Diabetes*, 46(11), 1733.
- 134 Liao, D., Corle, C., Seagroves, T.N., Johnson, R. S. (2007) *Cancer Res.*, 67(2), 563.
- 135 Sorce, S., Krause, K. H. (2009) *Antioxid. Redox Signal*, 11(10), 2481.

- ¹³⁶ Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) *Physiol. Rev.*, 59, 527.
- ¹³⁷ Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, 246, 501.
- ¹³⁸ Wefers, H., Sies, H. (1988) *Eur. J. Biochem.* 174, 353.
- ¹³⁹ Rosen, H., Michel, B. R. (1997) *Infect. Immun.* 65, 4173.
- ¹⁴⁰ Kiryu, C., Makiuchi, M., Miyazaki, J., Fujinaga, T., Kakinuma, K. (1999) *FEBS Lett.*, 443, 154.
- ¹⁴¹ Kanofsky, J. R., Hoogland, H., Wever, R., Weiss, S. J. J. (1988) *Biol. Chem.*, 20, 9692.
- ¹⁴² Teixeira, M. M., Cunha, F. Q., Noronha-Dutra, A., Hothersall, J. (1999) *FEBS Lett.*, 453, 265.
- ¹⁴³ Steinbeck, M. J., Khan, A. U., Karnovsky, M. J.J. (1993) *Biol. Chem.*, 268, 15649.
- ¹⁴⁴ Di Mascio, P., Bechara, E. J., Medeiros, M. H., Briviba, K., Sies, H. (1994) *FEBS Lett.* 355, 287.
- ¹⁴⁵ Rosenthal, I. (1985) Singlet Oxygen. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- ¹⁴⁶ Turro, N., Chow, M. F., Rigaudy J. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, 103(24), 7218.
- ¹⁴⁷ Nakano, M., Takayama, K., Shimizu, Y., Tsuji, Y., Inaba, H., Migita, T., (1976) *J. Am. Chem. Soc.* 98, 1974.
- ¹⁴⁸ Criado, S. N. (1997) Tesis Doctoral: Fotodegradaciones sensibilizadas de compuestos de importancia biológica. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC).
- ¹⁴⁹ Bellus, D. (1978). En Ranby, B., Rabek, J. F. (Eds.) Singlet oxygen. Reactions with organic compounds and polymers. (61-110). New York. John Wiley and Sons.
- ¹⁵⁰ Young, R. H. (1978). En Ranby, B., Rabek, J. F. (Eds.) Singlet oxygen. Reactions with organic compounds and polymers. (36-48). New York. John Wiley and Sons.
- ¹⁵¹ Gorman, A. A., Hamblett, I., Lambert, C., Spencer, B., Standen, M. C. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 8053.
- ¹⁵² Palumbo, M. C., García, N. A., Argüello, G. (1990) *Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 7, 33.
- ¹⁵³ Gorman, A. A., Lovering, G., Rodgers M. A. J. (1979) *J. Am Chem. Soc.* 101, 3050.
- ¹⁵⁴ García, N. A. (1994). *Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 22, 185.
- ¹⁵⁵ Gorman, A. A., Gould, I. R., Hamblett, I., Standen, A. C. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* 106, 6956.
- ¹⁵⁶ Gorman A. A., Gould I. R., Hamblett, I. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7098.
- ¹⁵⁷ Foote C. S. (1991) *Photochem. Photobiol.* 54, 659.
- ¹⁵⁸ Ameta, S. C., Punjabi, P. B., Chobisa, C. S., Mangal, N., Bhardwaj, R. (1990). *Asian J. Chem. Rev.* 1 (2), 106.
- ¹⁵⁹ Bobrowski, M., Liwo, A., Odziej, S., Jeziorek, D., Ossowski, T. (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 22, 8112.
- ¹⁶⁰ Kearns, D. R., Fenical, W., Radlick, P. (1970) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 171, 32.
- ¹⁶¹ Bartlett, P. D., Mendenhall, G. D., Schaap, A. P. (1970) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 171, 79.
- ¹⁶² Fenical, W., Kearns, D. R., Radlick, P. (1969) *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 3396.
- ¹⁶³ Bonnett, R., (2000) Chemical Aspects of Photodynamic Therapy (Advanced Chemistry Texts V.1). Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.
- ¹⁶⁴ Zheng Huang, M. D, (2005) *Technol. Cancer Res. Treat.*, 4(3), 283.
- ¹⁶⁵ Redmond, R. W., Kochevar, I. E. (2006) *Photochem. Photobiol.*, 82, 1178.
- ¹⁶⁶ Cadet, J., Ravanat, J. L., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (2006) *Photochem. Photobiol.*, 82, 1219.
- ¹⁶⁷ Plaetzer, K., Kiesslich, T., Verwanger, T., Krammer, B. (2003) *Med. Laser Appl.*, 18, 7.
- ¹⁶⁸ Kuimova, M. K., Botchway, S. W., Parker, A. W., Balaz, M., Collins, H. A., Anderson, H. L., Suhling, K., Ogilby, P.R. (2009) *R. Nat. Chem.*, 1, 69.

- ¹⁶⁹ Jiménez-Banzo, A., Sagrista, M. L., Mora M., Nonell, S. (2008) *Free Radical Biol. Med.*, 44: 1926–1934.
- ¹⁷⁰ Ogilby, P.R. (2010) *Chem. Soc. Rev.*, 39, 3181.
- ¹⁷¹ Davies, M. (2003) *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 761.
- ¹⁷² Wilkinson, F., Helman, W. P., Ross, A. B. (1995) *J. Phys. Chem.*, 24, 663.
- ¹⁷³ Spikes, J. D., Livingston, R., (1969) *Adv. Radiation Biol.*, 3, 29.
- ¹⁷⁴ Straight, R. C., Spikes, J. D. A.A. (1985) *Singlet Oxygen*. Vol. 4. CRC Press, Boca Raton, FL. Frimer (ed).
- ¹⁷⁵ Spikes, J. D., MacKnight, M. L., Ann, N. Y., (1970) *Acad. Sci.*, 171, 149.
- ¹⁷⁶ Bertolotti, S. G., Argüello, G. A., García, N. A. (1991) *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 10, 57.
- ¹⁷⁷ Criado, S., Soltermann, A. T., García, N. A. (1995) *Amino Acids*. 8, 367.
- ¹⁷⁸ Foote, C.S. (1976) *Free Radicals in Biology*. Vol. 2, (pp 85) Pyror. W.A, Ed. Academic Press. N.Y.
- ¹⁷⁹ Nakagawa, M., Yoshikawa, K., Hino, T. (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 6496.
- ¹⁸⁰ Nakagawa, M., Okajima, H., Hino, T. (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 4424.
- ¹⁸¹ Langlois, R., Ali, H., Brasseur, N., Wagner, J. R., Van Lier, J. E. (1986) *Photochem. Photobiol.*, 44, 117.
- ¹⁸² Walrant, P., Santus, R. (1974) *Photochem. Photobiol.*, 19, 411.
- ¹⁸³ Bertolotti, S. G., García, N. A. (1991) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 10, 57.
- ¹⁸⁴ Mathenson, L.B.C., Lee, J. (1979) *Photochem. Photobiol.*, 29, 878.
- ¹⁸⁵ Wright, A., Bubb, W. A., Hawkins, C. L., Davies, M. J. (2002) *Photochem. Photobiol.*, 76, 35.
- ¹⁸⁶ Tomita, M., Irie, M., Ukita, T. (1969) *Biochemistry*, 8, 5149.
- ¹⁸⁷ Kang, P., Foote, C.S. (2000) *Tetrahedron Lett.*, 41, 9623.
- ¹⁸⁸ Kai, S., Suzuki, M. (1996) *Heterocycles*, 43, 1185.
- ¹⁸⁹ Kraljac, I., Sharpatyi, V. A. (1978) *Photochem. Photobiol.*, 28, 583.
- ¹⁹⁰ Miskoski, S., García, A. N. (1993) *Photochem. Photobiol.*, 57, 447.
- ¹⁹¹ Sysak, P. K., Foote, C. S., Ching, T. Y. (1977) *Photochem. Photobiol.*, 26, 19.
- ¹⁹² Rougee, M., Bensasson, R. V., Land, E. J., Pariente, R. (1988) *Photochem. Photobiol.*, 47, 485.
- ¹⁹³ Ando, W., Takata, T. (1985). Photooxidation of sulfur compounds, en: A.A. Frimer (Ed.), *Singlet O₂*, 1-117. Vol. 3, Boca Raton, FL. CRC Press.
- ¹⁹⁴ Michaeli, A., Feitelson, J. (1994). *Photochem. Photobiol.*, 59(3), 284.
- ¹⁹⁵ Grossweiner, L.I., (1984) *Curr. Eye Res.*, 3, 137.
- ¹⁹⁶ Morgan, P. E., Dean, R. T., Davies, M. J. (2004) *Free Rad. Biol. Med.*, 36(4), 484.
- ¹⁹⁷ Kuimova, M. K., Yahioglu, G., Ogilby, P. R. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 332
- ¹⁹⁸ Jensen, R. L., Ambjerg, J., Ogilby, P.R., (2012) *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 9820.
- ¹⁹⁹ Canistraro, J., Van de Vorst, A. (1983). *Photobiochem. Photobiophys.* 3, 353.
- ²⁰⁰ Wilkinson F., Brummer, J. G. (1981) *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 10, 809.
- ²⁰¹ Khan, A. U., Kasha, M., (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76, 6047.
- ²⁰² Ogilby, P. R., Foote, C. S., (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 2069.
- ²⁰³ Hurst, J. R., Mac Donald, J. D., Schuster, G.B. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 2065.
- ²⁰⁴ Parker, J. G., Stanbro, W. D. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 2067.
- ²⁰⁵ Rodgers, M. A.G., Snoeden, P. T. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 5541.
- ²⁰⁶ Scaiano, J. C. (1989) *Handbook of Organic Photochemistry*. Ed. CRC Press.

- 207 Foote C. S. (1984) *Porphyryn Localization and Treatment of Tumours*. New York : Alan R. Liss. D. Doiron and C. Gomer (Ed.).
- 208 Merkel, P. B., Kearns, D. R. (1972) *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 7244.
- 209 Ogryzlo, E. A., Tang, C. W. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* 92, 5034.
- 210 Hall, R. D., Chignell, C. F. (1987) *Photochem Photobiol.* 45, 459.
- 211 DiMascio, P., Kaiser, S., Sies, H. (1989). *Arch Biochem Biophys.* 274, 532.
- 212 Fukazawa, K. (2000). *Meth Enzymol.* 319, 101.
- 213 Miskoski S. (2004) Tesis Doctoral: Fotooxidación sensibilizada de compuestos de importancia biológica: tetraciclinas y hormonas tiroideas. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC).
- 214 Taylor M. B., Radda G. K., (1971) *Methods Enzymol.*, 18:496.
- 215 Song P.S. (1971) Chemistry of flavins in their excited states. En H. Kamin (Ed). *Flavins and Flavoproteins*, (37). Baltimore, University Park Press.
- 216 Schuman, J. M., Schollhammer, G., Hemmerich, P. (1975) *Eur. J. Biochem.*, 57, 35.
- 217 Ahmad, I., Fasihullah, Q., Noor, A., Ansari, I. A., Ali, Q. N. M. (2004) *Int. J. Pharm.*, 280, 199.
- 218 Ahmad, I., Fasihullah, Q., Vaid, F. H. M (2004) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 75, 13.
- 219 Ahmad, I., Fasihullah, Q., Vaid, F. H. M. (2005) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 78, 229.
- 220 Sato, Y., Chaki, H., Suzuki, Y. (1984) *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 1232.
- 221 Treadwell, G. E., Cairns, W. L., Metzler, D. E. (1968) *J. Chromatogr.*, 35, 376.
- 222 Sato, Y., Yokoo, M., Takahashi, S., Takahashi, T. (1982) *Chem. Pharm. Bull.*, 30, 1803.
- 223 Ahmad, I., Fasihullah, Q., Vaid, F. H. M. (2006) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 82, 21.
- 224 Belitz, H. D., Grosch, W. (1999) *Food Chemistry*. 2nd Edition. Berlin. Springer.
- 225 Siassi, F., Ghadirian, P., (2005) *Cancer Detect. Prevent.*, 29(5), 464.
- 226 Posadaz, A., Biasutti, A., Casale, C., Sanz, J., Amat-Guerri, F., García, N. A. (2004). *Photochem. Photobiol.*, 80, 132.
- 227 Joshi, P. C. (1985) *Toxicol. Lett.*, 26, 211.
- 228 Haggi, E., Blasich, N., Díaz, J., Díaz, M., Massad, W., Amat- Guerri, F., García, N. A. (2007) *Photochem. Photobiol.*, 83, 520.
- 229 Soltermann, A. T., Biasutti, A. M., Senz, A., García, N. A. (1995) *Amino Acids* 9, 123.
- 230 John, M., Jaworski, C., Chen, Z., Subramanian, S., Ma, W., Sun, F., Li, D., Spector, A., Carper, D. (2004) *Exp. Eye Res.*, 79, 839.
- 231 Criado, S., Mártire, D., Allegretti, P., Furlong, J., Bertolotti, S. G., La Falce, E., García, N. A. (2002). *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 788.
- 232 Flors, C., Nonell, S. (2001) *Helv. Chim. Acta*, 84, 2533.
- 233 Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., Wolff, C. (1994) *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 79, 11.
- 234 Marti, C., Jürgens, O., Cuenca, O., Casals, M., Nonell, S. (1996) *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 97, 11.
- 235 Surgio, S., Kashima, A., Muchizuji, Noda, S. M., Kobayashi, K. (1999) *Protein Eng.* 12, 439.
- 236 Gelamo, E.L., Silva, C.H.T.P, Imasato, H., Tabak, M. (2004) *Biochem. Biophys. Acta*, 1700, 27.
- 237 Peters T Jr., (1996) *All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications*, San Diego, CA. Academic Press.

- 238 Drmanovic, Z., Voyatzi, S., Kouretas, D., Sahpazidou, D., Papageorgiou, A., Antonoglou, O. (1999) *Anticancer Res.*, 19, 4113.
- 239 Agarwal, R. P., Phillips, M., McPherson, R. A., Hensley, P. (1986) *Biochem. Pharmacol.*, 35, 3341.
- 240 Carter, D. C., Ho, J. X. (1994) *Adv. Protein Chem.*, 45, 153.
- 241 Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P., Frans, N. (1998) *Nat. Struct. Biol.*, 5, 827.
- 242 Ferrer, M. L., Duchowicz, R., Carrasco, B., García de la Torre, J., Acuña, A.U. (2001) *Biophys. J.*, 80, 2422.
- 243 Maggio, E. T., Ramnarayan, K. (2001) *Trends Biotechnol.*, 19, 266.
- 244 Abagyan, R., Totrov, M. (2001) *Curr Opin Chem Biol.*, 5, 375.
- 245 Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., Nussinov, R. (2002) *Proteins: Struct., Funct. Genet.*, 47, 409.
- 246 Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., Tasumi, M. (1977) *J. Mol. Biol.*, 112, 535.
- 247 National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound database. (2012-1014).
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- 248 Irwin, J. J., Shoichet, B. K. (2005) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 45(1), 177. Sitio web: <http://zinc.docking.org/>
- 249 Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996) *J. Mol. Graph.*, 14, 33.
- 250 Abagyan, R.A., Totrov, M. M., Kuznetsov, D. A. (1994) *J. Comp. Chem.*, 15, 488.
- 251 Kuntz, I., Blaney, J., Oatley, S., Langridge, R., Ferrin, T. (1982) *J. Mol. Biol.*, 161, 269.
- 252 Connolly, M. (1986) *Biopolymers*, 25, 1229.
- 253 Lee, R. H., Rose, G. D. (1985) *Biopolymers*, 24, 1613.
- 254 DesJarlais, R. L., Sheridan, R. P., Dixon, J. S., Kuntz, I. D., Venkataraghavan, R. (1986) *J. Med. Chem.*, 29, 2149.
- 255 Wodak, S. J., Janin, J. (1978) *J. Mol. Biol.*, 124, 323.
- 256 Wodak, S. J., De Crombrughe, M., Janin, J. (1987) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 49, 29.
- 257 Goodford, P. J. (1985) *J. Med. Chem.*, 28, 849.
- 258 Goodsell, D. S., Morris, G. M., Olson, A. J., (1996) *J. Mol. Recog.*, 9, 1.
- 259 Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., Goodsell, D. S. (2007) *J. Comput. Chem.*, 28, 1145.
- 260 Harrison. (2006) *Principios de Medicina Interna* 16a edición. Diabetes Mellitus. Capítulo 338 Ed. Mc. Graw Hill.
- 261 American Diabetes Association. (2010) *Diabetes care*. 33(1), 11.
- 262 American Diabetes Association. (2004) *Diabetes care*, 27(1), 5.
- 263 Fuller, J. H., Shipley, M. J., Rose, G., Jarrett, R. J., Keen, H. (1980) *Lancet*, 1, 1373.
- 264 Alberti, K. G. M. (1996) *M. Diabet. Med.*, 13, 927.
- 265 Japan and Pittsburgh Childhood Diabetes Research Groups. (1985) *Diabetes*, 34, 1241.
- 266 The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993) *N. Engl. J. Med.*, 329, 977.
- 267 DeFronzo, R. A. (1991) *Ann. Int. Med.*, 131, 281.
- 268 Sleevi, M. (2003) *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Autocoids, Diagnostics, and Drugs from New Biology*, sixth ed., vol. 4, New York. D.J. Abraham (Ed.), John Wiley & Sons, Inc.
- 269 Kar, P., Holt, I.G. (2008) *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 22, 207.
- 270 Rendell, M. (2004) *Drugs*, 64, 1339.
- 271 Rorsman, P. (1997) *Diabetologia*, 40, 487.

- 272 Giannaccini, G., Lupi, R., Trincavelli, M. L., Navalesi, R., Betti, L., Marchetti, P., Lucacchini, A., Del Guerra, S., Martini, C. (1998) *J. Cell. Biochem.*, 71, 182.
- 273 Parvez, M., Arayne, M. S., Zaman, M. K., Sultana, N. (1999) *Acta Cryst. C* 55, 74.
- 274 Bai, Y., Milne, J. S., Mayre, L., and Englander, S. W. (1993) *Proteins* 17, 75–86.
- 275 O'Connor, D. V., Philips, D. (1984). *Time-Correlated Single Photon Counting*. London. Academic Press.
- 276 Posadaz, A. (2006) Tesis Doctoral: Estudio Cinético de procesos fotosensibilizados, mediados por oxígeno singlete, en derivados de aminoácidos, péptidos y proteínas. Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). Facultad de Ciencias Exactas Físicoquímicas y Naturales. Córdoba, Argentina.
- 277 Montejano, H. A., Gervaldo, M., Bertolotti, S. G. (2005) *Dyes and Pigm.*, 64, 117.
- 278 Origin (OriginLab, Northampton, MA).
- 279 Schweitzer, C., Schmidt, R. (2003) *Chem. Rev.* 103, 1685.
- 280 Woodbury, C.P. (2008). *Introduction to macromolecular binding equilibria*. Boca Raton, FL. CRC Pres. Taylor and Francis Group.
- 281 Ward, L.D. (1985) *Methods Enzymol.* 117, 400.
- 282 Hu, Y.J., Liu, Y., Zhang, L. X. (2005) *J. Mol. Struct.* 750, 174.
- 283 Lackowics, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence spectroscopy*. 3rd Edition. Baltimore, Maryland, USA. Ed. Springer.
- 284 Lin, S. Y., Li, M. J., Wei, Y. S. (2008) *Spectrochim. Acta, Part A* 60, 97.
- 285 Kronman, M. J., Holmes L. G., (1971) *Photochem. Photobiol.*, 14, 134.
- 286 Valeur, B. (2002) *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*. Weinheim (Federal Republic of Germany) WILEY-VCH Verlag GmbH, 69469.
- 287 Tian, J. N., Liu, J. Q., He, W. Y., Hu, Z. D., Yao, X. J., Ghen, X. G. (2004) *Biomacromol.* 5, 1956.
- 288 Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., Tasumi, M. (1977). *J. Mol. Biol.*, 112, 535.
- 289 Carugo, O., Pongor, S. (2001). *Protein Sci.* 10, 1470.
- 290 Schweitzer, C., Schmidt, R. (2003) *Chem. Rev.*, 103, 1685.
- 291 Chacón, J. N., McLearn, J., Sinclair, R. S. (1988) *Photochem. Photobiol.*, 47, 647.
- 292 Ahmad, I., Tollin, G., (1981). *Photochem. Photobiol.*, 34, 441.
- 293 Ahmad, I., Cusanovich, M. A., Tollin, G. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 6724.
- 294 Ahmad, I., Fasihullah, Q., Vaid, F. H. M. (2004). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 75, 13.
- 295 Heelis, P. F. (1982). *Chem. Soc. Rev.*, 11, 15.
- 296 Heelis, P. F. (1991). The photochemistry of flavins. En: Muller, F. (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, vol. 1. (pp. 171–193). CRC Press, Boca Raton, FL.
- 297 Budavari, S., (1989). *The Merck Index*, 11th ed. (pp. 1304–1305). Rahway, NJ, O'Neil, M. J., Budavari, S. (Ed.), Merck & Co., Inc.
- 298 Zang, P. G., Misra, H. P. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 17547.
- 299 Tratnyek, P. G., Hoigné J. J. (1991) *Environ. Sci. Technol.*, 25, 1596.
- 300 Silva, E., Ugarte, R., Andrade, A., Edwards, A. M. (1994) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 23, 43.
- 301 Alarcón, E., Edwards, A.M., Aspee, A., Moran, F.E., Borsarelli, C.D., Lissi, E. A., Gonzalez-Nilo, D., Poblete, H., Scaiano, J.C. (2010) *Photochem. Photobiol. Sci.*, 9, 93.

- 302 Ogilby, P. R., Foote, C. S. (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 3423.
- 303 Nonell, S. L., Moncayo, F., Trull, F., Amat-Guerri, F., Lissi, E., Soltermann, A. T. (1995) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 29, 157.
- 304 Arencibia Arrebola D. F., Rosario Fernández L. A., Curveco Sánchez D.L. (2009). *Retel (revista de toxicología) en línea*. 19, 40.
- 305 Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006) *Toxicol. Lett.*, 160(2), 171.
- 306 Zanon, S.M. (2005). Tesis Doctoral: Acción antiviral de *Mintostachys verticillata*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- 307 Waschman, M. (1987). Tesis Doctoral: Actividad antiviral de productos naturales. Fac. Cs. Exact. y Nat. UBA., Bs. As., Argentina.
- 308 Andrei, G.M. (1988). Tesis Doctoral: Caracterización y purificación de un factor antiviral presente en la planta superior *Melia azedarach* L. Determinación de su mecanismo de acción. Fac. Cs. Ex. y Nat. UBA, Bs. As., Argentina.
- 309 Pujol, C. (1995). Tesis Doctoral: Actividad antiviral y mecanismos de acción de polisacáridos sulfatados obtenidos a partir de las algas *Notogenia fastigiata* y *Pterocladia capillacea*. Fac. de Cs. Ex. y Nat. UBA, Bs. As., Argentina.
- 310 Li, Y., Ma, S., Yang, Y., Ye, S., But, P. (2002). *J. of Ethnopharmacol.* 79, 365.
- 311 Ooi, L., Wang, H., Luk, C., Ooi, V. (2004). *J. of Ethnopharmacol.* 94, 117.
- 312 Gutleb, A.C., Morrison, E., Murk, A.J. (2002) *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11, 309.
- 313 Davis, M., Truscott, R. J. W., (2001) *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 63, 114.
- 314 Varlan, A., Hillebrand, M. (2010) *Rev. Roum. Chim.*, 55, 69.
- 315 Khan, S. N., Islam, B., Khan, A.U. (2007) *Int. J. Integrat. Biol.*, 1, 102.
- 316 Song, S., Hou, X., Wu, Y., Shuang, S., Yang, C., Inoue, Y., Dong, C. (2009) *J. Lumin.*, 129, 169.
- 317 Wang, Y. Q., Zhang, H. M., Zhang, G. Ch., Tao, W. U., He Tang, S. (2007) *J. Lumin.* 126, 211.
- 318 Liu, J., Tian, J., Tian, J., Zhang, Z., Chen, X. (2003) *Anal. Bioanal. Chem.*, 376, 864.
- 319 Gao, X., Tag, Y., Rong, W., Zhang, X., Zhao, W., Zi, Y. (2011) *Am. J. Anal. Chem.*, 2, 250.
- 320 Hess, M., Jo, B. W., Wunderlich, S. (2009) *Pure Appl. Chem.*, 81,439.
- 321 Nalk, D. V., Paul, W. L., Threatte, R. M., Schulman, S.J. (1975) *Anal. Chem.*, 47, 267.
- 322 Chatelain, P., Matteazzi, J. R., Laurel, R. (1994) *J. Pharm. Sci.*, 83, 674.
- 323 Suresh, D. V., Mahesha, H. G., Appu Rao, A. G., Srinivasan, K. (2007) *Biopolymers*, 86, 265.
- 324 Lakowicz, J. R., Gryczynsky, I. (1992) *Biophys. Chem.* 45, 1.
- 325 Alarcón, E., Aspeé, A., Abuin, E. B., Lissi, E. A. (2010) *J. of Photochem. Photobiol. B: Biology*, 106, 1.
- 326 Helms, M. K., Petersen, C. E., Bhagavan, N. V., Jameson, D. M. (1997) *FEBS Lett.* 408, 67.
- 327 Davis, D. M., McLoskey, D., Brich, D. J., Gellert, P. R., Kit-tlety, R. S., Swart, R. M. (1996) *Biophys. Chem.* 60, 63.
- 328 Marzola, P., Gratton, E. J. (1991) *Phys. Chem.* 95, 9488.
- 329 Vos, K., Van Hoek, A., Visser, A.J.W.G. (1987) *Eur. J. Biochem.* 165,55.
- 330 Kasai, S., Horie, T., Mizuma, T., Awazu, S. (1987) *J. Pharm. Sci.* 76, 387.
- 331 De Lauder, W. B., Wahl, P. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 398.
- 332 Ross P. D., Subramanian, S. (1981) *Biochem.*, 20, 3096.
- 333 An, J., Totrov, M., Abagyan, R. (2005). *Mol. Cell. Proteomics.* 4(6):752. http://www.molsoft.com/icm_pro.html
- 334 Keshavarz, F., Alavianmher, M. M., Yousefi, R. (2012) *Mol. Biol. Res. Comm.*,1,65.

- ³³⁵ Orellana B., Rufs A. M., Encinas M. V., Previtali C. M., Bertolotti S. (1999) *Macromolecules*, 32, 6570.
- ³³⁶ Koizumi, M., Kato, S., Mataga, N., Matsuura, T., Isui, I. (1978) *Photosensitized Reactions*. Kyoto, Japan. Kagakudogin Publishing Co.
- ³³⁷ Murov, S. L. (1973). *Handbook of photochemistry*. New York. M Decker.
- ³³⁸ Schweitzer, C.; Schmidt, R. (2003) *Chem. Rev.*, 103, 1685.
- ³³⁹ Orivelos, E., Murasecco, P. S., Saghafi, T. A., Braun, A. M., Hansen, H. (1991) *J. Helv. Chim. Acta*, 79, 74.
- ³⁴⁰ Takahashi, N., Takahashi, Y., Blumberg, B., Putnam, F. W. (1987). *Biochem.* 84, 4413.
- ³⁴¹ Sliwinska, A.; Rogalska, A.; Szwed, M.; Kasznicki, J.; Jozwiak, Z.; Drzewoski, J. (2012) *Mol Biol Rep.*, 39, 5253.
- ³⁴² Du, S., Xie, Y., Chen, X. (2013) *Mol. BioSyst.*, 9, 55.
- ³⁴³ Scurlock, R. D., Kristiansen M, Ogilby, P. R., Taylo V. L, Clough, R. L. (1998) *Polym. Degrad. Stab.*, 60, 145.
- ³⁴⁴ Foote, C. S., Ching, T. Y. (1975) *J. Am. Chem. Soc.* 97, 6209.