



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

**“ESTUDIO DEL EFECTO DE β -CAROTENO EN EL
MECANISMO DE DESACTIVACIÓN DE OXÍGENO SINGLETE
EN CÉLULAS MAMÍFERAS”**

Gabriela Natalia Bosio
(Directores: Daniel O. Mártire y Peter R. Ogilby)

2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA – FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

“Estudio del efecto de β -caroteno en el mecanismo de desactivación de oxígeno singlete en células mamíferas”

G. Bosio, 2013

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Exactas ha sido desarrollado en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, y el Center of Oxygen Microscopy Imaging (COMI), Universidad de Århus, Dinamarca, bajo la dirección del Dr. Daniel O. Mártire y la codirección del Prof. Peter R. Ogilby.

Para Emma.

Agradecimientos

El 10 de Mayo de 2010 comenzó este proyecto. Desde entonces, son muchas las personas a las cuales les debo mi más profundo agradecimiento, ya que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo de tesis.

A mis directores. Daniel, por su inmensurable apoyo, su optimismo, su valoración, su calidad científica y su calidez humana. Peter, por la confianza depositada en mí, por darme la libertad de equivocarme, por su buen humor y su genio científico.

A Mónica González, por poner el hombro en pro del grupo, siempre positiva y emprendedora.

A mis compañeros y amigos del grupo LEAR: Valeria NP, ML, Manu, Cris, Juanjo, Marce, Lucho, Fabio, Hernán, Danila, Virginia, Flor, Belén, Paula, Janina, y Laura. No sólo su ayuda científica, sino los momentos compartidos, las risas, las “frases célebres”, los afters, las dietas, las no dietas, etc., han llenado mis días y hecho más que placentero mi paso por el INIFTA.

A Edgardo Donati, como referente desde mis primeros pasos en esta carrera. Su imagen y consejo han sido siempre un estímulo para la superación constante.

A Thomas Breitenbach, de quien he aprendido muchas técnicas nuevas en mi estadía en Århus y me ha enriquecido con sus discusiones científicas y aporte de ideas.

Al equipo del COMI: Elsa, Frances, Brian, Jacob, Haiping, Rasmus L., Frederico, Francesca, Anita, Marina, Rikke y Puk, por su colaboración y cordialidad.

Al Dr. Catalá, por su colaboración en la preparación de liposomas y por las charlas llenas de color.

A la gente del primer piso y la casita del INIFTA: Carolina, Andrés, Laura D., Mariana S., Mariana V., Paula D., Bea, Marina, Diana, el Chino, Fabricio, Héctor, Ezequiel, Carlos y Adela, Paula B., Eugenia T., por los momentos compartidos.

Al personal técnico del INIFTA, que facilitó el desarrollo de esta tesis.

A Julieta Parisi y el Dr. Miguel Reigosa, por su participación en los experimentos biológicos llevados a cabo en el IMBICE, su ayuda desinteresada y su aporte científico.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP y las del INIFTA, por haber accedido a la realización de mis actividades científicas en sus instalaciones.

A la UNLP, CONICET y Århus University, por la financiación recibida durante la realización de este trabajo.

Y por último, desde mi corazón:

A Carlos Bosio, mi viejo, por su ejemplo de vida, por incentivarme siempre en la búsqueda y el análisis, por enseñarme a estudiar, por escucharme, por orientarme tanto en la vida como en la carrera, por su apoyo incondicional y todo su amor.

A Silvia Herbón, mi mamá: Por sus sacrificios, su trabajo, su cariño, y su infinita dulzura.

A mis hermanitas del alma: Valeria y Vero, sin ellas mi historia sería otra. Gracias por quererme tanto.

Al compañero de mi vida: Nico, con quien hemos pasado muchas etapas hermosas durante la tesis. Por su apoyo constante, su paciencia, su entusiasmo por mis logros y su forma simple y pura de hacerme ver la vida.

Índice

Símbolos y Abreviaturas	8
Introducción	10
Terapia fotodinámica (TFD).....	10
Detección de oxígeno singlete en el laboratorio	13
Carotenos.....	14
Carotenos – proteínas – sistemas heterogéneos	16
Objetivos del presente trabajo de Tesis	20
Objetivo General	20
Objetivos Específicos.....	20
Capítulo 1: Mímica en sistemas heterogéneos modelo (Liposomas – BSA – Car).....	21
Materiales y métodos.....	22
Preparación de liposomas de PC.....	22
Determinación de la concentración de β -caroteno	23
Medidas de fluorescencia en estado estacionario	23
Dispersión dinámica de luz (DLS)	24
Microscopía de transmisión electrónica	24
Mediciones fosforescencia de oxígeno singlete	25
Medida de la constante de asociación de β -caroteno con BSA	25
Resultados y discusión	26
Síntesis y caracterización de liposomas	26
Determinación de la constante de asociación entre β -caroteno y BSA	31
Mediciones de fosforescencia de oxígeno singlete	34
Conclusiones	44
Capítulo 2: Incorporación de β -caroteno en células mamíferas.....	47
Cromatografía HPLC:	48
Espectroscopía UV-visible y espectroscopía de fluorescencia:	50
Fluorescencia de β -caroteno en células.....	51
Espectroscopía Raman	54
Métodos alternativos utilizados para la incorporación del β -caroteno en células HeLa	55

Conclusiones	59
Capítulo 3: Experimentos de fosforescencia de oxígeno singlete resueltos en el tiempo	61
Materiales y Métodos:.....	62
El sistema femtosegundo	63
La configuración.....	63
Microscopio de Oxígeno Singlete.....	64
PMT	65
Detección del oxígeno singlete a nivel de una sola célula.....	66
Detección de oxígeno singlete en suspensiones celulares	66
Sensibilizadores empleados y condiciones de irradiación.....	68
Resultados	70
Conclusiones	78
Capítulo 4: Otro Quencher: MitoQ₁₀	81
Materiales y métodos.....	83
Microscopía de excitación bifotónica:.....	83
Protocolo de irradiación bifotónica de las células en la plataforma del microscopio para determinar la posición del punto focal del láser en el campo de visión del microscopio:.....	84
Elección y condiciones del sensibilizador	84
Formación de imágenes de la fluorescencia de los colorantes.....	85
Resultados	85
Irradiación bifotónica.....	87
Conclusiones	97
Capítulo 5: Estudios de citotoxicidad	99
Toxicidad inherente del β -caroteno en oscuridad:	100
Ensayos de Azul de Tripán.....	100
Ensayos de MTT	102
Ensayos con la Técnica de Giemsa	103
Toxicidad durante Irradiación Fotosensibilizada:	104
Ensayo de Azul de Tripán.....	104
Tinción de Giemsa	105
Ensayo de MTT.....	106
Sensibilizadores hidrofóbicos:	107
Sensibilizadores hidrofílicos:.....	107
Discusión y conclusiones	112

Capítulo 6: Reactividad de β -caroteno con otras ROS.....	115
Condiciones experimentales	118
Experimentos bifotónicos.....	118
Ensayos con DCFH-DA.....	119
Ensayos con DHE.....	125
Ensayos con Thiol Tracker	128
Conclusiones	129
 Capítulo 7: Conclusiones Generales.....	 132
 Apéndice.....	 136
1-Cálculo de la concentración de β -caroteno en una célula.....	136
2-Sensibilizadores hidrofóbicos fluoro-clorina y TPPCOOMe	139
3-Síntesis y caracterización de CF.....	140

Símbolos y abreviaturas

(Φ_{Δ}) eficiencia cuántica de generación de oxígeno singlete	(k_a) constante de velocidad de formación de excímero
$([Car])$ concentración de equilibrio de β -caroteno	(k_{app}) constante aparente de velocidad de formación de excímero.
$([Car]_0)$ concentraciones analíticas del soluto	$(k_{d, aq})$ decaimiento de pseudoprimer orden de $O_2(a^1\Delta_g)$ en fase acuosa.
$([P]_0)$ concentraciones analíticas de la proteína	$(k_{d, lip})$ decaimiento de pseudoprimer orden de $O_2(a^1\Delta_g)$ en fase lipídica
$([A_T])$ concentración total de $O_2(a^1\Delta_g)$	$(k_{d, o})$ velocidad de decaimiento del $O_2(a^1\Delta_g)$ en ausencia del carotenoide
(ADN) ácido desoxirribonucleico	(k_{FE}) constantes de velocidad de emisión de fluorescencia de excímero
(ALA) ácido 5-amino levulínico	(k_{FM}) constantes de velocidad de emisión de fluorescencia de monómero
(ALPcS ₄) ftalocianina tetrasulfonada de aluminio	(k_q) constante de quenching del oxígeno singlete
(BBO) cristal de borato de bario	$(k_{t, ap})$ constante de quenching total aparente
(BSA) seroalbúmina bovina	$(k_{t, aq})$ constante de velocidad de quenching en fase acuosa
(Car) β -Caroteno	$(k_{t, lip})$ constante de velocidad de quenching en fase lipídica
(CF) aducto de fluoresceína y caroteno	(K_{Δ}) constante de partición
(COM) Center for Oxygen Microscopy and Imaging	(K_{Δ}) constante de partición del $O_2(X^3\Sigma_g^-)$ en liposomas de DMPC
(DCFH-DA) 2',7'-Diacetato de diclorofluoresceína	(m) moléculas de β -caroteno
(DCM) diclorometano	(M) monómero
(DHE) dihydroethidium	(MetOH) metanol
(DLS) dispersión dinámica de luz	(MitoQ ₁₀) 10-(6'-ubiquinol)
(DMSO) dimetil sulfóxido	(MitoQ ₁₀ H ₂) 10-(6'-ubiquinona)
(E) excímero	$(n(Car_{inc}))$ número de moles incluidos de β -caroteno en la membrana liposomal
(E ⁻) transferencia de electrones	$(n(Car_o))$ número de moles totales de β -caroteno
(f) fracción de volumen de la fase orgánica	(ND) filtro de densidad neutra
(F_{prot}^*) intensidad de fluorescencia cuando todos los sitios de unión se encuentran ocupados por el soluto	(NSL) liposomas no sometidos a ultrasonidos
(F_{prot}^o) intensidad de fluorescencia de la proteína en ausencia de β -caroteno	$(O_2(a^1\Delta_g))$ Oxígeno singlete
(F_{prot}) intensidad de fluorescencia de la proteína en presencia de β -caroteno	$(O_2(X^3\Sigma_g^-))$ Oxígeno en estado fundamental
(GSH) glutatión reducido	
(GTP) polrizador Glan Taylor	
(HAT) transferencia de átomos de hidrógeno,	
(IY) rendimiento de incorporación de β -caroteno	
(K) constante de equilibrio	

(OPA) amplificador paramétrico óptico	(THF) tetrahidrofurano
(PC) fosfatidilcolina	(TPPMeCOO) tetrafenilporfirina-metil-éster
(PCL) liposomas de fosfatidilcolina	(TS) platina móvil
(PI) índice de polideispersidad	(ULV) liposomas unilamelares
(PMT) fotomultiplicador enfriado	(V_{aq}) volumen de l fase acuosa
(PPa) pirofeofórbido	(V_{LIP}) volumen de la fase orgánica
(PPIX) protoporfirina IX	(V_T) volumen total de las muestras
(RAF) formación de aductos radical	(Δ_{aq}) moléculas de $O_2(a^1\Delta_g)$ en la fase acuosa
(Rh 123) rodamina 123	(Δ_{LIP}) moléculas de $O_2(a^1\Delta_g)$ en la bicapa lipídica
(ROS) especies reactivas de oxígeno	(θ) fracción de sitios de unión de la proteína ocupados por ligando.
(SL) liposomas sonicados	(τ_E) tiempo de vida del exímero
(TEM) microscopía d transmisión electrónica	(τ_Δ) tiempo de decaimiento de $O_2(a^1\Delta_g)$
(TFD) Terapia fotodinámica	

Introducción

La luz puede ser usada para causar daño a los tejidos de diversas maneras, ya sea, térmica, mecánica o químicamente. Las aplicaciones de la luz incluyen técnicas terapéuticas en oftalmología, fotocoagulación, fotodisrupción y la fotoquímica.

La fotoquímica difiere sustancialmente de las demás técnicas, ya que no implica ningún daño térmico o mecánico. El daño fotoquímico puede ocurrir naturalmente por exposición a la luz, induciendo mecanismos oxidativos. Por ejemplo, las consecuencias del estrés oxidativo de la retina generado por exposición a la luz, implican daño oxidativo de ADN, lípidos y proteínas (1,2).

Durante años se ha incursionado en la utilización de diferentes terapias para la cura del cáncer. Una de ellas es la Terapia Fotodinámica. El presente trabajo de tesis se enmarca en este contexto, ahondando en el efecto del β -caroteno en el mecanismo de desactivación de oxígeno singlete en células mamíferas, a través del monitoreo directo de esta especie reactiva de oxígeno y la utilización de modelos donde se mimetiza tanto el ambiente heterogéneo al cual se enfrenta el carotenoide en la célula como la interacción con proteínas.

Terapia fotodinámica (TFD)

La base de la TFD es la iniciación de procesos químicos en los tejidos blanco a través de la irradiación lumínica. Los dos pasos principales en el proceso de TFD son la inyección intravenosa de un fotosensibilizador y la posterior irradiación con luz de una longitud de onda específica que es apropiada para ser absorbida por el sensibilizador.

Aunque los mecanismos biológicos exactos de TFD subyacentes pueden variar con la naturaleza del fotosensibilizador, el sitio de localización, y otros parámetros, la fotoquímica primaria, al menos en solución, parece ser similar para todos los fotosensibilizadores.

Una representación esquemática de los procesos fotoquímicos/fotofísicos involucrados en la TFD se presenta en la Figura 1. En pocas palabras, la energía lumínica es absorbida por el fotosensibilizador, que se transforma a partir de su estado

fundamental singlete S^0 al estado singlete excitado S^1 . La fluorescencia se genera directamente desde S^1 , mientras que la fosforescencia puede derivar de T^1 después del “*intersystem crossing*” o entrecruzamiento de sistemas. Alternativamente, T^1 puede iniciar reacciones fotoquímicas directamente mediante la generación de radicales libres reactivos citotóxicos, o indirectamente por transferir su energía al oxígeno en estado fundamental ($O_2(X^3\Sigma_g^-)$) dando lugar a la formación de oxígeno en estado excitado, oxígeno singlete ($O_2(a^1\Delta_g)$). Mediante ambos mecanismos se provoca daño foto-oxidativo a targets biológicos a nivel celular y subcelular. Al primer mecanismo se lo conoce como un proceso de Tipo I, mientras que al segundo (mediado por oxígeno singlete) como una vía de reacción Tipo II.

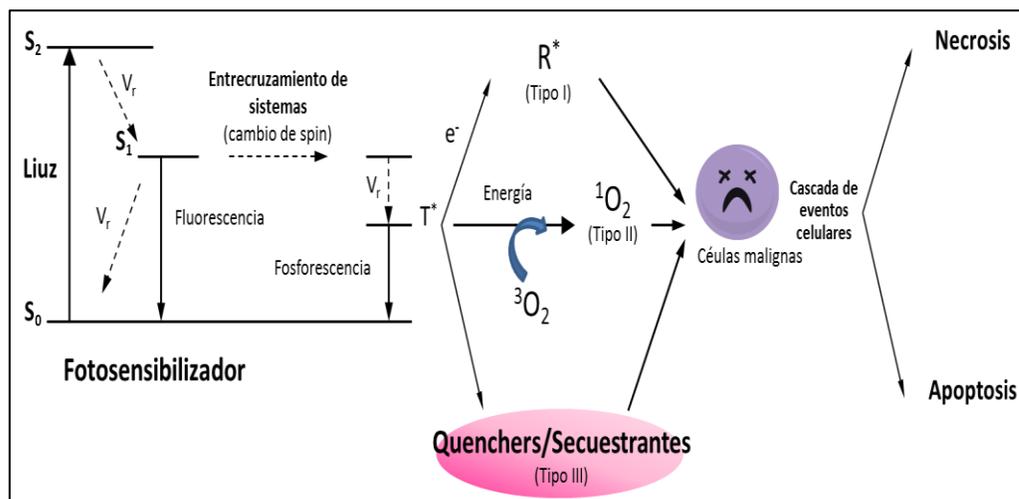


FIGURA 1: Mecanismo de muerte celular mediada por un proceso de fotosensibilización en TFD, esquematizado según diagrama de Jablonsky.

Para las reacciones Tipo II se requiere necesariamente la disponibilidad de oxígeno. En las reacciones Tipo I, se inicia la transferencia de un electrón o átomo de hidrógeno, lo que conduce a la producción de aniones superóxido. También se han detectado los radicales hidroxilo durante las reacciones de TFD, para la generación de los cuales (Tipo I) a partir del triplete no es necesaria la presencia de oxígeno.

La alta reactividad de las especies de oxígeno generadas en los dos tipos de procesos, produce daños similares en su entorno biológico. Ambos tipos de reacción pueden producirse ya sea simultánea o exclusivamente, dependiendo de la estructura química del fotosensibilizador. Sin embargo, generalmente se cree que la formación de $O_2(a^1\Delta_g)$ es el mecanismo primario de daño inducido por TFD para la mayoría de los sensibilizadores estudiados en la actualidad. Los posibles blancos biológicos del

oxígeno singlete y los radicales libres incluyen ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, enzimas, y membranas, cuya interacción con la especie reactiva conduce a cambios en la fisiología y fisiopatología de membranas celulares y en casos extremos al daño y muerte celular (3-5).

Los mecanismos de destrucción de tejidos inducidos por la TFD son complejos y todavía no se entienden completamente. Sin embargo, parece que hay tres mecanismos primarios: celular, vascular, e inmunológico. Por otra parte, una mezcla de estos tres mecanismos puede estar implicada en la destrucción del tejido y cada mecanismo puede influir en los otros. La contribución de cada mecanismo depende de las características del fotosensibilizador, el tejido que está siendo tratado, y los parámetros de tratamiento utilizados.

En el caso de las neoplasias, la respuesta a la TFD se cree que es causada por una combinación de citotoxicidad directa y oclusión vascular, que conduce a una isquemia de la masa tumoral (6).

La destrucción celular directa está mediada en gran parte por oxígeno singlete, que tiene en los sistemas biológicos una vida muy corta, del orden de nano a microsegundos. Este corto tiempo de vida restringe el daño a la vecindad inmediata del sensibilizador. Por lo tanto, el conocimiento de la distribución y localización del fotosensibilizador dentro de la célula es fundamental para poder predecir su zona de acción (6-8).

La localización intracelular de los fármacos fotosensibilizantes está relacionada con el mecanismo por el cual son incorporados por las células y determina los dominios subcelulares en los cuales se producirá el fotodaño (9). La mayoría de los fotosensibilizadores poseen un peso molecular de 600 a 1000 Da y el patrón de distribución subcelular es altamente dependiente de su estructura química. Las porfirinas hidrófobas tienen una clara tendencia a localizarse en las mitocondrias y en las membranas, mientras que aquellos sensibilizadores hidrófilos tienden a localizarse en el citoplasma y pueden migrar al núcleo tras la irradiación (10).

La profundidad de penetración en los tejidos de la radiación empleada en los tratamientos de TFD depende de su longitud de onda, la cual se elige según el espectro de absorción del fotosensibilizador utilizado. La longitud de onda más apropiada es la que corresponde al máximo de absorción del fotosensibilizador. En general, se utiliza la luz dentro de una "ventana fototerapéutica" de 600-900 nm, donde se encuentran los valores más altos de penetración tisular que dependen tanto de la dispersión como de la absorción de la luz (11).

Además, existe cierta captación preferencial y retención de los fotosensibilizadores en el tejido tumoral, pero también se distribuyen y son retenidos por los tejidos normales, particularmente aquellos con componentes del sistema reticuloendotelial (12).

Detección de oxígeno singlete en el laboratorio

Podría decirse que, la forma más inequívoca para monitorear oxígeno singlete es mediante la observación directa de su fosforescencia a 1270 nm. Aunque esta fosforescencia es débil, φ (rendimiento de fosforescencia) $\approx 10^{-7}$, los trabajos del grupo del Prof. Ogilby han demostrado que, no obstante, puede detectarse a partir de una única célula, en experimentos tanto de estado estacionario como resueltos en el tiempo tras la irradiación de un sensibilizador incorporado en la célula (microscopía de oxígeno singlete) (13-16).

Un aspecto clave del trabajo del Prof. Ogilby y de esta tesis, es el uso de un haz de láser enfocado que permite la excitación del sensibilizador confinada a pequeños dominios subcelulares (16, 18,19). A través de la utilización de este recurso, ahora es posible proporcionar una visión única de procesos mediados por oxígeno singlete que se producen en una célula.

Como el tiempo de vida del oxígeno singlete depende significativamente del medio circundante y además exhibe efectos isotópicos de solvente, en nuestro trabajo sobre células individuales se ha aprovechado esto último para mejorar la intensidad de la señal de fosforescencia de oxígeno singlete detectado. Específicamente, la vida del oxígeno singlete es de $\sim 67 \mu\text{s}$ en D_2O (20) pero sólo $\sim 3,5 \mu\text{s}$ en H_2O , (21). Además la eficiencia cuántica de fosforescencia del oxígeno singlete es mayor en D_2O que en H_2O (22, 23). De esta manera, se eligió trabajar bajo condiciones en las que el H_2O intracelular se ha intercambiado por D_2O . Se ha demostrado, que este intercambio no afecta la viabilidad celular durante el transcurso de los experimentos (17).

La mediación del oxígeno singlete en la TFD y la fotoprotección que puedan ejercer moléculas que presenten poder antioxidante dependerá de la difusión de los reactivos en distintos entornos celulares. Está bien establecido que los coeficientes de difusión "aparentes" de pequeñas moléculas dentro de una célula pueden ser notablemente menores que aquellos en medios homogéneos, ya sean acuosos u orgánicos (24). Esto es válido para el coeficiente de difusión aparente intracelular de oxígeno singlete (25-28). Los datos registrados indican un valor para el coeficiente de difusión de oxígeno que podría ser de hasta un orden de magnitud menor que en agua a 25 °C. Es importante tener en cuenta que, dada la heterogeneidad de una célula y las diferencias en la resolución espacial de las técnicas utilizadas para cuantificar el movimiento de traslación de oxígeno, es conveniente hablar de un promedio o valor "aparente" para el coeficiente de difusión intracelular (29).

En trabajos anteriores del grupo del Prof. Peter Ogilby se ha intentado determinar mediante experimentos de microscopía de oxígeno singlete si la constante de desactivación o quenching de oxígeno singlete por una molécula incorporada en la célula dependía del dominio subcelular en el que se incorporara la molécula. Se vio que la composición química de un dominio dado no es tan importante como la velocidad de difusión de las especies en ese dominio (es decir, la viscosidad y heterogeneidad del medio ambiente local).

Continuando en esta línea de trabajo en este trabajo de tesis se eligió emplear por primera vez un antioxidante natural y quencher de oxígeno singlete por excelencia, el β -caroteno (ver subtítulo siguiente), ya que hasta ahora sólo se había incorporado a las células la azida sódica (hidrofílica) en este tipo de experimentos (29).

Una premisa fundamental en los experimentos de esta tesis es el hecho de que el medio intracelular es muy heterogéneo, y puesto que el coeficiente de difusión de oxígeno intracelular puede ser pequeño, podrían crearse poblaciones de oxígeno singlete confinadas a determinados dominios subcelulares. Si bien es posible alcanzar una resolución espacial en nuestros experimentos irradiando el sensibilizador en la célula con un láser enfocado, con un haz de diámetro de ≈ 1 micra (20, 23), aún es de mayor magnitud que las estructuras que definen la heterogeneidad intracelular. Sin embargo, el uso de fotosensibilizadores de distinta naturaleza nos puede dar un indicio acerca de dónde se produce y hacia dónde difunde el oxígeno singlete.

Carotenos

Los carotenos naturales son pigmentos lipofílicos con dobles enlaces conjugados casi exclusivamente con configuración trans. Los carotenoides aparecieron por primera vez durante la evolución en arqueobacterias. Son polienos rígidos cuyas rotaciones están restringidas. Los carotenoides con grupos polares (ej: xantófilas) que se encuentran en muchas plantas, se anclan en la interfase agua/lípidos y son de especial importancia en la estabilidad de las membranas. Los carotenoides también juegan un rol crucial en la fotosíntesis de bacterias y plantas en la recolección de la luz, el evento primario para la aparición de toda la vida aeróbica en la Tierra, y en la transferencia de electrones seguida por la disipación de energía en forma de calor, durante la exposición intensa a la luz solar. Estos no se sintetizan en animales, sin embargo poseen importantes funciones en ellos protegiendo a organelas y tejidos sensibles durante el estrés oxidativo y la exposición excesiva a la luz. Se localizan en las zonas hidrofóbicas de membranas celulares animales debido a su esqueleto y a su longitud de cadena apropiada. La diversidad estructural que éstos presentan y el balance hidrofílico/hidrofóbico permiten orientaciones específicas en la membrana resultando en un efecto

sinérgico en sus propiedades antioxidantes por combinación de varios tipos de ellos en las células (30).

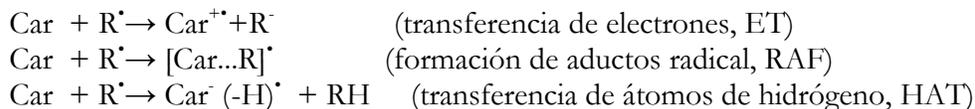
El rol de los carotenoides como antioxidantes en vivo a través del secuestro de especies reactivas de oxígeno y radicales de lípidos ha sido siempre tema de discusión. Los carotenoides poseen importantes funciones como quenchers de oxígeno singlete en tejidos expuestos a la luz, donde fotosensibilizadores como la clorofila (Tipo II), pueden activar el estado basal de la molécula de oxígeno. El quenching de oxígeno singlete por los carotenoides, depende de la diferencia de energía entre el orbital molecular más bajo desocupado (LUMO) y el más alto ocupado (HOMO), y de la energía de ionización.

Teniendo en cuenta que la constante de quenching de oxígeno singlete por los carotenoides se encuentra en el límite de la difusión y está afectada por el número de los dobles enlaces presentes en la cadena de polieno en estas moléculas (31), será importante en el presente trabajo de tesis, determinar si las características antioxidativas de los carotenoides se manifestarán en la susceptibilidad de una célula dada a la muerte mediada por oxígeno singlete.

Los carotenoides también cumplen su rol como antioxidantes en la eliminación de radicales como se demostró para los radicales fenoxilo (32).

Se encontró que la velocidad de secuestro de radicales libres aumenta con el número de dobles enlaces coplanares en los carotenoides, mientras que la presencia de grupos hidroxilo y especialmente los grupos ceto como en la astaxantina y la cantaxantina disminuyen dicha velocidad. Los cálculos de mecánica cuántica parecen indicar que la naturaleza del radical es de igual o incluso mayor importancia que la estructura de los carotenoides para la eficiencia de su secuestro (33).

En cuanto a la captación de radicales oxidantes por los carotenoides, principalmente se han considerado tres vías de reacción:



Los cationes radicales carotenoides resultantes de las reacciones de ET tienen tiempo de vida del orden de los milisegundos y absorben en la región del infrarrojo cercano alrededor de 1000 nm (32, 34, 35).

Los aductos de radicales carotenoides absorben alrededor de 520nm y son, de acuerdo con cálculos teóricos recientes, capaces de secuestrar un radical libre

adicional, que conduce a la formación de productos no radicalarios y en consecuencia terminar la reacción en cadena de radicales libres característica de la peroxidación de lípidos (36).

Carotenos – proteínas – sistemas heterogéneos

Las albúminas son importantes transportadores de diferentes moléculas en células de mamíferos. La capacidad de la albúmina de suero bovino, BSA, de formar un complejo con β -caroteno fue empleada por Wackerbarth *et al.* para facilitar la formulación de emulsiones de alimentos fortificados en carotenos evitando el uso de disolventes orgánicos (37).

La fluorescencia estacionaria, debido a su relativa simplicidad es una de las técnicas más empleadas para evaluar la asociación no covalente de pequeñas moléculas (ligandos) a proteínas. Existe una extensa cantidad de datos disponibles que comprenden una variedad de ligandos, y dado el número reducido de fluoróforos intrínsecos de las albúminas, el tratamiento de datos resulta más simple que para otras proteínas.

Con estos antecedentes en mente, hemos propuesto como parte de los objetivos de esta tesis, investigar cuantitativamente la interacción de BSA con β -caroteno y el efecto de la BSA sobre la interacción entre oxígeno singlete y β -caroteno. Para este fin, se realizaron medidas resueltas en el tiempo del oxígeno singlete en experimentos con suspensiones de liposomas con sensibilizadores hidrófilos e hidrófobos como sistemas modelo.

Referencias

- (1) Jarrett S G. and Boulton M. E. *Mol Aspects Med.* 2012; 33, 399–417.
- (2) Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011; 3, 52–60.
- (3) Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J. and Peng Q. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998, 90, 889-905.
- (4) Ochsner M. J. *of Photochem. and Photobiol.* 1997, 39, 1–18.
- (5) Akaike T., Nishida M., Fujii S. *J Biochem.* 2013, 153, 131-8.
- (6) Cavalcante R.S., Imasato H., Bagnato Perussi V.S., J.R., *Laser Phys. Lett.* 2008, 10, 746–751.
- (7) Röder B. and Meyers R.A. *Encycl. Anal. Chem.*, Wiley, Chinchester, 2000, 302–320.
- (8) Redmond R.W., Kochevar I.E., *Photochem. Photobiol.* 2006, 82, 1178–1186.
- (9) Moan J., Berg K., Kvam E., Western A., Malik Z., Rock A. and Schneckenburger H. In *Ciba Foundation Symposium.* 1989, 146, 95-111.
- (10) Berg K. and Moan J., *Photochem. Photobiol.* 1997, 65, 403-409.
- (11) O'Connor A.E., Aisling E, Gallagher W., William M., Byrne A.T., Annette T., *Photochem. Photobiol.* 2009, 5, 1053-1054.
- (12) Spangler C.W.; Starkey J.R.; Rebane A.; Meng F.; Gong A.; Drobizhev M. XV. *Proceedings of the SPIE 6139.* 2006, 219–228.

- (13) Zebger I.; Snyder J. W.; Andersen L. K.; Poulsen L.; Gao Z.; Lambert J. D. C.; Kristiansen U.; Ogilby P. R. *Photochem. Photobiol.* 2004, 79, 319–322.
- (14) Skovsen, E.; Snyder, J. W.; Lambert, J. D. C.; Ogilby, P. R. *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 8570–8573
- (15) Snyder, J. W.; Skovsen, E.; Lambert, J. D. C.; Ogilby, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 14558–14559.
- (16) Snyder, J. W.; Skovsen, E.; Lambert, J. D. C.; Poulsen, L.; Ogilby, P. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006, 8, 4280–4293.
- (17) Hatz, S.; Lambert, J. D. C.; Ogilby, P. R. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2007, 6, 1106–1116.
- (18) Snyder, J. W.; Zebger, I.; Gao, Z.; Poulsen, L.; Frederiksen, P. K.; Skovsen, E.; McIlroy, S. P.; Klinger, M.; Andersen, L. K.; Ogilby, P. R. *Acc. Chem. Res.* 2004, 37, 894–901.
- (19) Skovsen, E.; Snyder, J. W.; Ogilby, P. R. *Photochem. Photobiol.* 2006, 82, 1187–1197.
- (20) Ogilby, P. R.; Foote, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105, 3423–3430.
- (21) Egorov, S. Y.; Kamalov, V. F.; Koroteev, N. I.; Krasnovsky, A. A.; Toleutaev, B. N.; Zinukov, S. V. *Chem. Phys. Lett.* 1989, 163, 421–424.
- (22) Ogilby, P. R. *Acc. Chem. Res.* 1999, 32, 512–519.
- (23) Schweitzer, C.; Schmidt, R. *Chem. Rev.* 2003, 103, 1685–1757.
- (24) Kao, H. P.; Abney, J. R.; Verkman, A. S. *J. Cell Biol.* 1993, 120, 175–184.
- (25) Uchida, K.; Matsuyama, K.; Tanaka, K.; Doi, K. *Respir. Physiol.* 1992, 90, 351–362.

- (26) Dutta, A.; Popel, A. S. J. *Theor. Biol.* 1995, 176, 433–445.
- (27) Sidell, B. D. *J. Exp. Biol.* 1998, 201, 1118–1127.
- (28) Hatz, S.; Poulsen, L.; Ogilby, P. R. *Photochem. Photobiol.* 2008, 84, 1284–1290.
- (29) Kuimova, M. K.; Yahioglu, G.; Levitt, J. A.; Suhling, K. J. *Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 6672–6673.
- (30) Stahl, W.; Junghans, A.; de Boer, B.; Driomina, E. S.; Briviba, K.; Sies, H., *FEBS Lett.* 1998, 427, 305–308.
- (31) Baltshun, D.; Beutner, S.; Briviba, K.; Martin, H. D.; Paust, J.; Peters, M.; Rover, S.; Sies, H.; Stahl, W.; Steigel, A.; Stenhorst, F. Singlet oxygen quenching abilities of carotenoids. *Liebigs Ann.-Recl.* 1997, 9, 1887–1893.
- (32) Mortensen, A.; Skibsted, L. H., *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 2970–2977.
- (33) Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, J. *Phys. Chem. B.* 2009, 113, 12113–12120.
- (34) El-Agamey, A.; McGarvey, D. J., *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 3330–3340.
- (35) Mortensen, A.; Skibsted, L. H., *FEBS Lett.* 1997, 417, 261–266.
- (36) Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A., *Theor. Chem. Acc.* 2010, 127, 595–603.
- (37) Wackerbarth, H.; Stoll, T.; Gebken, S.; Pelters, C.; Bindrich, U., *FRIJ.* 2009, 42, 1254–1258.

Objetivos del presente trabajo de Tesis

Objetivo General

Estudiar los efectos antioxidantes sobre la incorporación en células de un desactivador de oxígeno singlete lipofílico, el β -caroteno, haciendo estudios comparativos entre células adherentes y en suspensión y contrastar dichos resultados con los obtenidos en sistemas liposomales modelo.

Objetivos Específicos

1. Realizar estudios de fosforescencia de oxígeno singlete en sistemas que mimeticen las membranas intracelulares, como los liposomas que contienen β -caroteno, en presencia de fotosensibilizadores de diferente localización en los liposomas.
2. Corroborar y cuantificar la incorporación de β -caroteno en células HeLa y HL-60, mediante el empleo de técnicas de fluorescencia, absorción, Raman y HPLC.
3. Monitorear el decaimiento de la señal de fosforescencia de oxígeno singlete a nivel de células individuales o suspensiones celulares haciendo uso de sensibilizadores de diferente localización subcelular y estudiar el efecto de quenching del β -caroteno.
4. Emplear otros quenchers de oxígeno singlete de diferente naturaleza y realizar estudios de alta resolución espacial con irradiación bifotónica.
5. Analizar el efecto fotoprotectivo del β -caroteno frente a la irradiación fotosensibilizada mediante varios ensayos de citotoxicidad.
6. Estudiar el efecto del β -caroteno sobre otras especies reactivas de oxígeno en la terapia fotodinámica en células mamíferas.

Mímica en sistemas heterogéneos modelo (Liposomas – BSA – Car)

No se puede desatar un nudo sin saber cómo está hecho.

Aristóteles

Durante la primera etapa de este trabajo de tesis, tres fotosensibilizadores de oxígeno singlete, de diferente hidrofiliidad, se han introducido en liposomas construidos con fosfatidilcolina (PCL). Los sensibilizadores empleados fueron la ftalocianina tetrasulfonada de aluminio (AlPcS₄, hidrófilo), pirofcofórbido (PPa, hidrófobo) y TPPMeCOO (tetrafenilporfirina-metil-éster, hidrófobo). Al mismo tiempo tres desactivantes diferentes fueron elegidos como controles para dilucidar dónde se produce y hacia dónde difunde el oxígeno singlete (1). Los desactivantes utilizados fueron seroalbúmina bovina (BSA), (localización extra-liposomal), azida sódica (localización dentro y fuera del liposoma) y β -caroteno (lipofílico).

Se sintetizaron pequeños liposomas unilamelares mediante el método de sonicación según ilustra la Figura 1, y siguiendo la literatura (2). La concentración de β -caroteno y fotosensibilizadores incorporados en los liposomas se evaluó a partir de espectroscopías de absorción y fluorescencia, respectivamente (2). Para la caracterización de los liposomas, la fluidez de la membrana de PCL / tampón pH 7.4 o PCL/H₂O y de los liposomas que contienen diferentes concentraciones de β -caroteno se determinaron utilizando al pireno como sonda fluorescente (2). El tamaño de los liposomas se determinó por dispersión dinámica de luz (DLS) (3).

Materiales y métodos

Preparación de liposomas de PC

Los lípidos de PC equivalentes a ~ 1 mM (1mg/mL) disueltos en cloroformo, puro o mezclado con 1, 2, 5 ó 5% en moles de β -caroteno (la masa molecular de PC de yema de huevo se tomó como 760 (4), se secaron a partir del disolvente bajo atmósfera de Ar para obtener una capa delgada de lípido en la parte inferior de un frasco especial de vidrio apto para ser sonicado. La película resultante se hidrató con 5 ml de tampón TRIS 50 mM o PBS (ambos de pH 7,4) o agua pura filtrada con un poro de $0,1 \mu\text{m}$ y se dispersó a temperatura ambiente usando un agitador vortex para obtener liposomas no sometidos a ultrasonidos (NSL). Los liposomas sonicados (SL) se prepararon por ultrasonidos bajo enfriamiento con hielo, utilizando un procesador ultrasónico de líquido, la sonda-sonicador Modelo XL-2000 Microson TM. La potencia de salida fue fijada en 15 W. Para la preparación de liposomas fueron necesarios unos 10 minutos con intervalos de 60 s para alcanzar los valores de densidad óptica aparente mínimos. De esta manera se formaron pequeños liposomas unilamelares (ULV). El residuo, β -caroteno no integrado en liposomas, se eliminó por centrifugación en dos pasos a $9000 \times g$. El sobrenadante contenía sólo PC dopada con β -caroteno. Los sensibilizadores hidrófobos tales como TPPCOOMe o PPa se añadieron en la primera etapa junto con los lípidos y, tanto el beta-caroteno como el sensibilizador hidrófilo, en la etapa de resuspensión en tampón. Ver Figura 1.

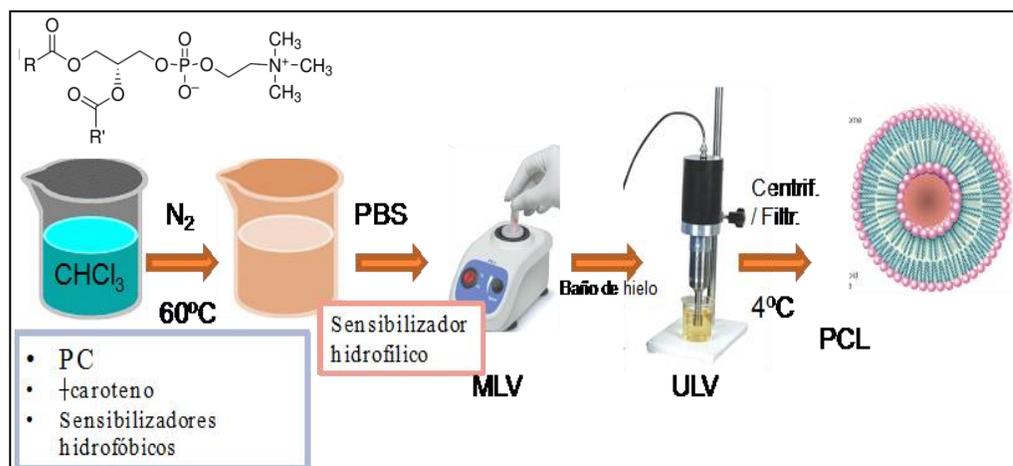


FIGURA 1: Preparación de liposomas por el método de sonicación, según se describe en literatura (2). Los sensibilizadores hidrofóbicos, así como el carotenoide, son incorporados junto con los lípidos, mientras que el sensibilizador hidrofílico se agrega al resuspenderse el film en buffer acuoso. MLV significa vesículas multilaminares.

Determinación de la concentración de β -caroteno

La concentración de β -caroteno incorporado en liposomas se evaluó a partir de espectros de absorbancia (entre 350 y 600nm) de un extracto en etanol, utilizando para el coeficiente de absorción molar de β -caroteno en etanol a 453 nm, el valor de $141 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (2). Los resultados se utilizaron para determinar el rendimiento de incorporación de β -caroteno (IY) calculado como las relaciones entre el número de moles incorporados y totales de β -caroteno.

Medidas de fluorescencia en estado estacionario

La fluidez de la membrana de PCL / buffer o liposomas PCL/H₂O y de los liposomas que contienen diferentes concentraciones de β -caroteno se determinó utilizando el pireno como sonda fluorescente que forma excímeros (E) a partir de monómeros (M) por un proceso controlado por difusión en las membranas lipídicas, que está directamente relacionado con la fluidez de la membrana. El pireno se añadió a los liposomas a una concentración de 4% en moles con respecto a los lípidos a partir de una solución madre de concentración 2 mM en etanol. Se tuvo la precaución de que la cantidad de etanol añadido no exceda de 0,5%. La mezcla de liposomas-pireno se incubó a 25 °C durante 20 min y la fluorescencia del pireno se registró con un espectrofluorímetro HORIBA. La longitud de onda de excitación fue 332 nm y se registró la emisión en la región de 350-550 nm. Los anchos de rendijas fueron 5 nm. El pireno, siendo una molécula no polar, está completamente inmerso dentro de la región hidrófoba de la membrana (5,6). En su forma monomérica, el pireno da lugar a una banda de emisión en la región de 365-395 nm y otra más ancha alrededor de 470 nm, que viene dada por el excímero. Se midieron las intensidades de fluorescencia del pireno en su forma monomérica con picos vibrónicos en 373 nm (pico 1, I1) y en 383 nm (pico 3, I3) y del excímero a 470 nm (E) y se calculó la extensión de la excimerización ($E / I1 = E / M$). La relación entre las intensidades de excímero a monómero se utiliza tradicionalmente para medir la movilidad lateral en las membranas (6). En general, esta relación obedece a una dependencia lineal con la concentración de la sonda, como es de esperar para una reacción controlada por difusión:

$$E / M = (k_{FE} / k_{FM}) \tau_E k_a C \quad (\text{ec. 1})$$

donde k_{FE} y k_{FM} son respectivamente las constantes de velocidad de emisión de fluorescencia de excímero y monómero, k_a es la constante de velocidad de formación de excímero en la reacción bimolecular, τ_E es el tiempo de vida del excímero y C es la concentración molar total de pireno.

La constante aparente de velocidad de formación del excímero, k_{app} (ec. 2) se calcula a partir de la pendiente del ajuste lineal de la dependencia de E/M.

$$k_{app} = (k_{FE} / k_{FM}) \tau_E k_a \quad (\text{ec. 2})$$

Dispersión dinámica de luz (DLS)

La Dispersión Dinámica de Luz (Dynamic Light Scattering, DLS) es una técnica que permite medir el tamaño de partículas, generalmente en la región del sub-micrón (10^{-6} m). Dicha determinación se realiza a partir del movimiento Browniano de las partículas (en nuestro caso liposomas). El movimiento Browniano es el movimiento aleatorio de las partículas al fluir en el solvente en el que se encuentran suspendidas. En DLS la muestra se ilumina con un haz de láser y la intensidad de la luz dispersada es registrada por un detector óptico. La intensidad de la luz dispersada por los liposomas fluctúa a una velocidad que es dependiente del movimiento Browniano. Cuanto más pequeñas son las partículas más lentamente se mueven. Si se sigue este movimiento de las partículas a intervalos de tiempo cortos, puede obtenerse información de cuánto se han movido y relacionarlo así con su tamaño y distribución.

La velocidad del movimiento Browniano depende del coeficiente de difusión traslacional (D). El tamaño de los liposomas se calcula a partir de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

donde $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico; k la constante de Boltzman; T la temperatura absoluta; D el coeficiente de difusión traslacional y η la viscosidad. El diámetro medido aplicando la técnica de DLS corresponde al diámetro de una esfera que posee el mismo coeficiente de difusión traslacional que los liposomas.

El tiempo de correlación de la intensidad de dispersión de luz se midió a 90° con un goniómetro, ALV/CGS-5022F, y con un correlador digital, ALV-5000/EPP, que cubre rango de tiempos un 10^{-6} - 10^3 s. La fuente de luz fue un láser de helio / neón con una longitud de onda de 633 nm que opera a 22 mW. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25° C utilizando 80 μ L de liposomas (2 g /L de lípidos) en suspensión en cada uno de los medios acuosos a volumen final de 2 mL. Cada función de correlación se analizó mediante el bien conocido ajuste de cumulantes obteniéndose el coeficiente de difusión aparente media y la distribución δD de este valor (7). También se realizó un análisis por el método de Laplace (CONTIN).

Microscopía de transmisión electrónica

Diferentes suspensiones de liposomas preparados según el mismo protocolo utilizado en el resto de los experimentos se secaron sobre soportes de cobre recubiertos con membranas de carbono. Se realizó sobre las muestras una tinción con ácido

fosfotúngstico durante 20 segundos y después se analizaron con un instrumento JEOL 1200EX II capaz de aumentar la resolución de la muestra hasta 200 000 veces.

Mediciones fosforescencia de oxígeno singlete

La instrumentación empleada para las mediciones de O_2 ($a^1\Delta_g$) ha sido descrita previamente (8,9). En pocas palabras, la salida de 800 nm de un láser de femtosegundo se amplificó, la frecuencia fue doblada a 400 nm y se pasó a través de un amplificador OPA para obtener 650 nm. Los experimentos se realizaron en cubetas de 1 cm de paso de luz. La intensidad de fosforescencia del O_2 ($a^1\Delta_g$) obtenido a partir de la cubeta se midió mediante la colocación de un filtro de interferencia de 1275 nm frente a un fotomultiplicador enfriado (PMT, de Hamamatsu modelo R5509-42) que se usó en un modo de conteo de fotones. Los experimentos se realizaron utilizando la salida fuera de foco del láser (diámetro del haz ~ 7 mm) que funciona a una frecuencia de repetición de 1 kHz, de tal manera que se entregaron a la muestra $5 \mu\text{J pulso}^{-1}$.

Se utilizaron dos fotosensibilizadores diferentes hidrófobos: PPa y TPPCOOMe y la AlPcS₄ como sensibilizador hidrófilo. Los quenchers de oxígeno singlete: BSA (que se supone posee una localización extra-liposomal, NaN₃ (localizada en el medio acuoso externo y la bicapa lipídica), y β -caroteno (lipófilo) fueron empleados para dilucidar dónde se produce este estado excitado y hacia dónde difunde (10).

Para las mediciones de O_2 ($a^1\Delta_g$) el método de preparación de los liposomas fue el mismo que se ha descrito anteriormente, pero la hidratación de las películas lipídicas se realizó con tampón preparado en D₂O. De esta manera, tomamos ventaja del hecho de que la sustitución de H₂O por D₂O resulta en un aumento de tiempo de vida de $O_2(a^1\Delta_g)$ (2), haciendo que el sistema sea más sensible a los efectos de inactivadores añadidos (11).

Medida de la constante de asociación de β -caroteno con BSA

La fluorescencia de BSA ($\lambda_{exc} = 285$ nm) en soluciones de diferentes concentraciones de β -caroteno se midió en el intervalo de longitudes de onda de 350-600 nm. El fluorómetro empleado para estos ensayos fue el mismo que para los experimentos de fluidez de la membrana.

Resultados y discusión

Síntesis y caracterización de liposomas

La Tabla 1 muestra la concentración de β -caroteno incorporado en las diferentes preparaciones de liposomas:

$100 \times [\beta\text{-caroteno}] / [\text{lípidos}]$	$[\beta\text{-caroteno}]$ incorporado (μM)
1,0	1,4
1,5	2,2
2,0	2,9
2,5	3,6
3,0	4,3

TABLA 1: Concentración de β -caroteno incorporado en los liposomas utilizados como función de su concentración total utilizada.

Los promedios de los radios hidrodinámicos de liposomas determinados por estudios de DLS^(a) se presentan en la Tabla 2.

<i>Tipo de liposoma</i>	<i>Medio Acuoso</i>	<i>Radio hidrodinámico</i> (nm) (Método cumulantes/Laplace) ^(b)	<i>Índice de polidispersidad</i> (PI)
Sin β -caroteno	Agua	69/15y50	0.42
Sin β -caroteno	20 mM buffer pH 7.4	75 /-	0.30
Con- β -caroteno 33,2 μM	Agua	280/20y60	0.50

^(a) Los datos recogidos son promedio de 3 medidas independientes. ^(b) Se muestran los valores obtenidos por el método de Laplace y el de Cumulantes.

TABLA 2: Promedio de los valores de radio hidrodinámico e índice de polidispersidad obtenidos por dispersión dinámica de la luz en suspensiones de liposomas sonicados de lípidos de fosfatidilcolina en diferentes medios acuosos.

Se encontró que el valor medio del rendimiento de incorporación por ciento de β -caroteno (% IY) es prácticamente constante (11 ± 2). La Tabla 1 muestra la

concentración de β -caroteno incorporado en los liposomas calculados con este valor de % IY como una función de la cantidad de β -caroteno añadido al sistema.

En la Tabla 2 observamos que los liposomas sometidos a ultrasonidos muestran una distribución de tamaño bimodal, cuando se analizaron por el método de transformada inversa de Laplace (CONTIN), un resultado que es compatible con el alto índice de polidispersidad ($PI > 0,4$) del ajuste por cumulantes. Los resultados de los liposomas (PC) formados por sonicación mostraron, a través del método de cumulantes, radios hidrodinámicos en el orden de 70 nm, mientras que para aquellos que contenían β -caroteno los valores obtenidos fueron 280 nm, lo que indica una influencia significativa de la incorporación del caroteno sobre el tamaño aunque la distribución de tamaños encontrada por el método de Laplace sea similar. El análisis básico de la señal arroja que hay objetos más grandes, aunque en menor cantidad, que no aparecen en el análisis de la distribución en peso. Por esta razón el método de cumulantes daría un tamaño más grande que el de las poblaciones reportadas.

La estructura de las diferentes preparaciones de liposomas fue analizada por TEM, como se muestra en la Figura 2.

Las imágenes obtenidas por TEM (Figura 2) muestran una clara desestabilización de la estructura de los liposomas en presencia de BSA, tendiendo a agruparse frente a la incorporación de la proteína. Por otra parte los tamaños parecen aumentar en el caso de la incorporación del caroteno, en coincidencia con los resultados obtenidos por DLS. Los tamaños son del mismo orden que los diámetros hidrodinámicos obtenidos por DLS, aunque es más difícil su determinación debido a la tinción efectuada. Se muestran al menos dos poblaciones diferentes en tamaño para todas las muestras. El agregado de PPa, no parece afectar la forma ni el tamaño de los liposomas.

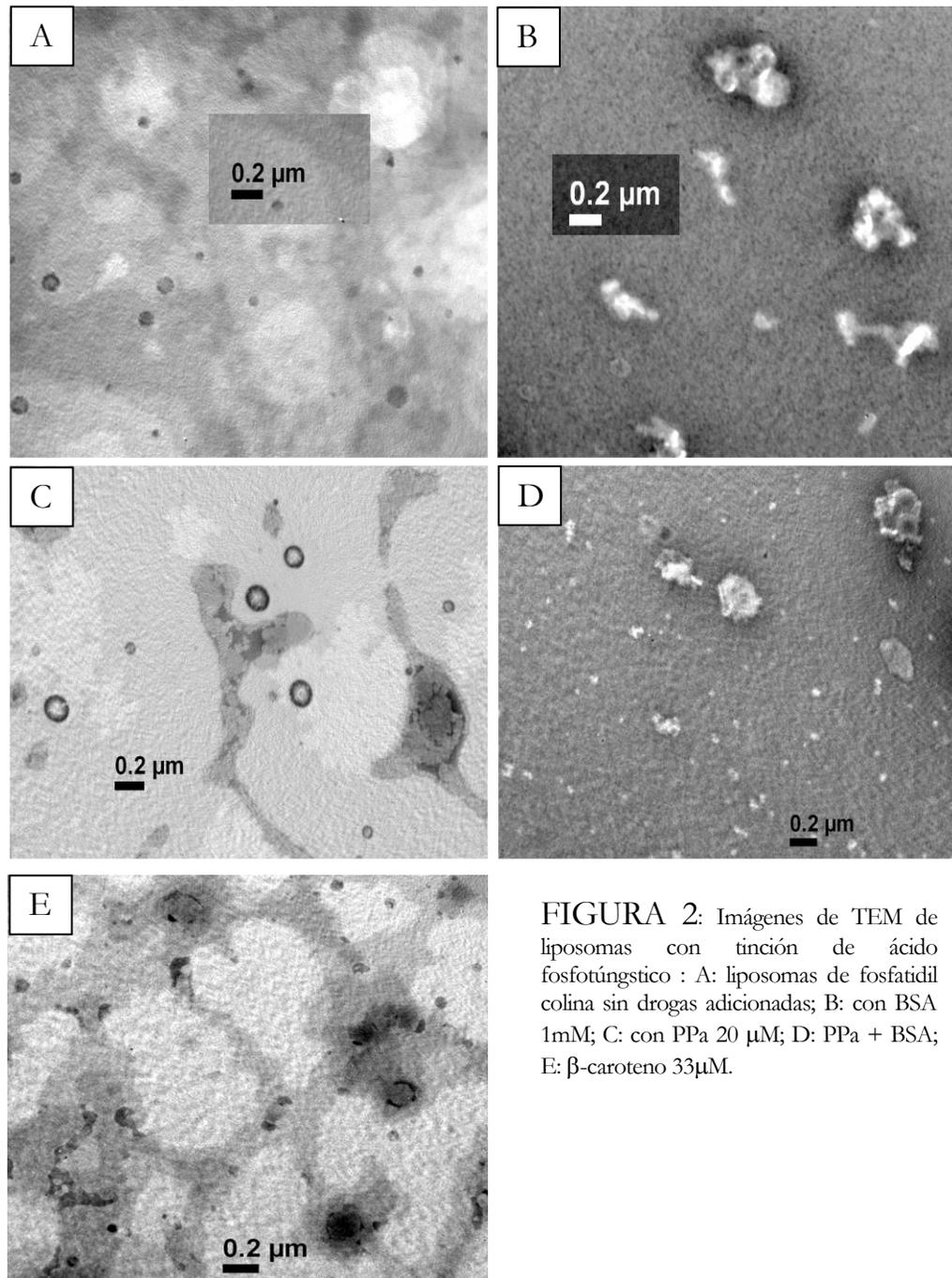


FIGURA 2: Imágenes de TEM de liposomas con tinción de ácido fosfotúngstico : A: liposomas de fosfatidil colina sin drogas adicionadas; B: con BSA 1mM; C: con PPa 20 μM; D: PPa + BSA; E: β-caroteno 33μM.

La Figura 3 muestra el espectro de emisión de los liposomas sin el carotenoide suspendidos en solución tampón (pH =7.4) en presencia de diferentes concentraciones de pireno.

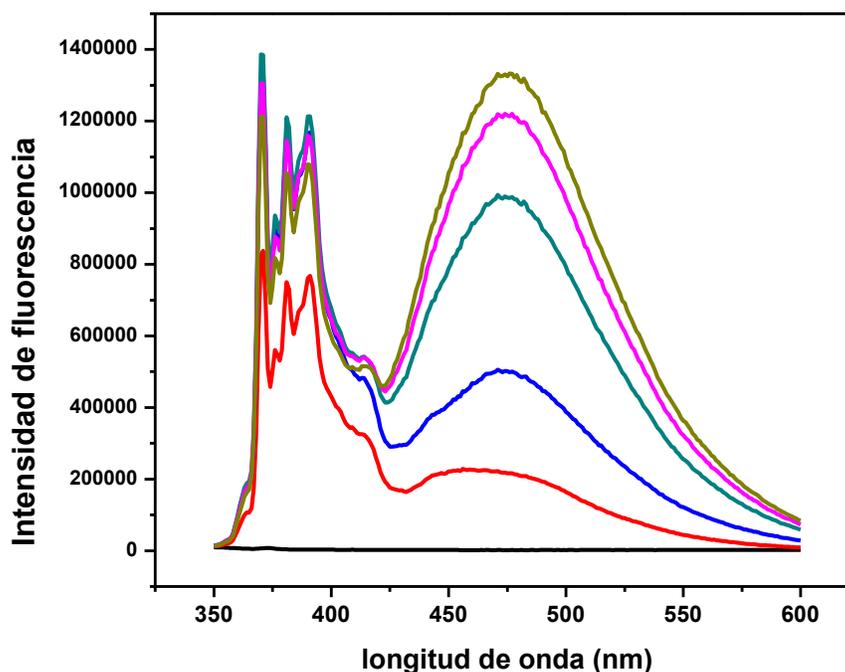


FIGURA 3: Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 342$ nm) obtenidos en presencia de varias concentraciones de pireno (de abajo hacia arriba): 0, 13, 26, 39, 52, and 65 μ M.

En las condiciones de trabajo, la concentración total de pireno es lo suficientemente baja como para descartar la formación de excímeros en solución homogénea. Sin embargo, esta sonda se reparte preferentemente en la membrana, donde sí, la concentración local es suficientemente alta como para formar excímeros, como puede observarse en la región de 470 nm.

La amplitud de los cambios en los espectros de emisión mostrados en la Figura 2 depende de la relación [pireno]/[lípidos], es decir, de la concentración local de la sonda. Por lo tanto, una correcta evaluación de la movilidad del pireno debe hacerse por determinación de k_{app} (ver las ecuaciones. 1 y 2). Esta constante se obtiene a partir de la pendiente de la gráfica lineal de E / M vs [pireno] (Figura 4). Como puede verse en la figura, los datos obtenidos en ausencia y en presencia de tampón en el medio acuoso son coincidentes dentro del error experimental.

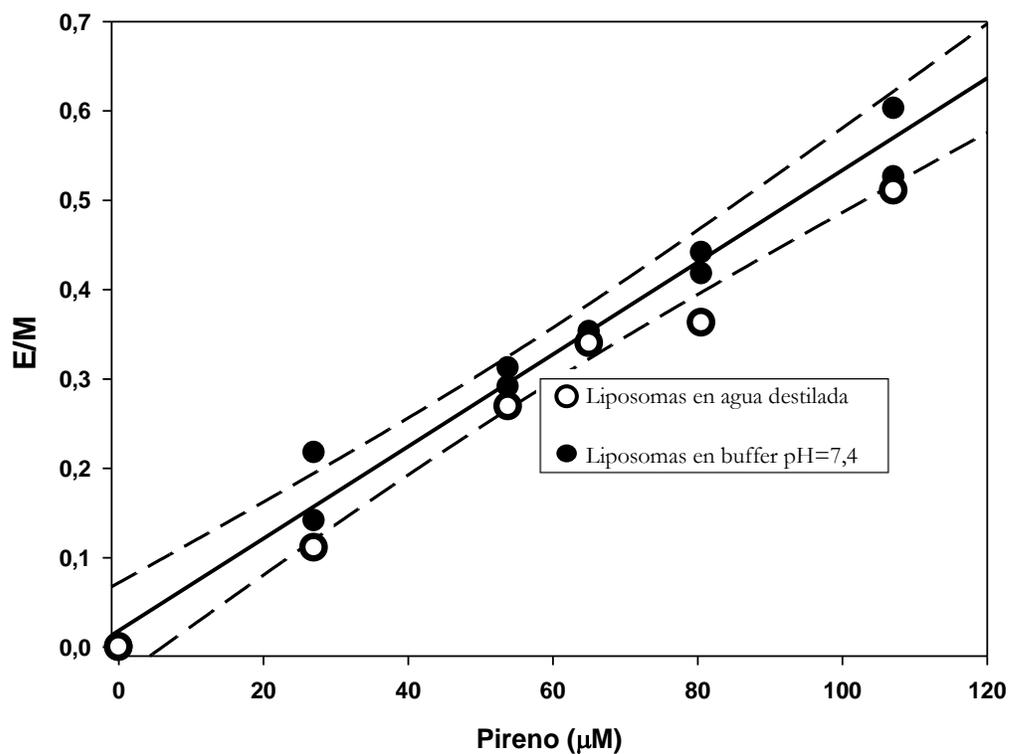


FIGURA 4: Dependencia de la relación excímero-a-monómero (E/M) obtenida a partir del análisis de los espectros de emisión con la concentración de pireno en suspensiones de liposomas en agua y en buffer pH 7.4. En líneas discontinuas se muestra el intervalo con 99% de confianza.

Para una concentración de 65 μM de pireno la relación E/M toma el valor de 1,10. La incorporación de β -caroteno produce un aumento de esta relación, tal como se ve en la Figura 5.

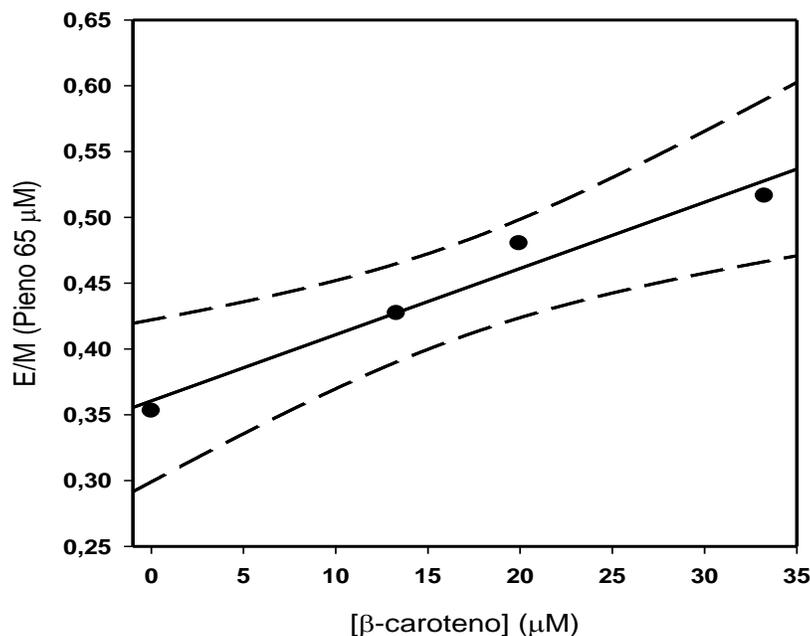


FIGURA 5: Dependencia de la relación E/M obtenida a partir de espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 342$ nm) de suspensiones de liposomas en buffer pH 7.4 con la concentración de β -caroteno. En líneas discontinuas se muestra el corredor de errores con un 99% de confianza.

De los datos obtenidos, podemos ver que la concentración del excímero de pireno aumenta con la concentración de β -caroteno. Esto sugiere que el carotenoide afecta la localización del fluoróforo, desplazándolo a una región más hidrófoba y de ese modo puede inferirse que no sólo aumenta la fluidez de los liposomas con el aumento de la concentración de β -caroteno incorporado, sino que además una posible separación de los lípidos en las membranas de los liposomas daría lugar a un aumento de su tamaño, tal como pudo verse en el análisis de dispersión de luz dinámica (DLS). Esto es, los carotenos pueden afectar a la estructura y las propiedades dinámicas de la membrana lipídica.

Determinación de la constante de asociación entre β -caroteno y BSA

Se ha informado la formación de complejos de BSA con β -caroteno (2,12). Por lo tanto, para entender los experimentos de desactivación O_2 ($a^1\Delta_g$) en la presencia de BSA, es necesario cuantificar la interacción entre el carotenoide y la proteína mediante la medición de la constante de unión a partir de experimentos de quenching de la fluorescencia intrínseca de la proteína por el carotenoide.

La emisión de fluorescencia de BSA se midió en soluciones con diferentes cantidades del carotenoide en el rango de temperatura de 25-55 °C. Los datos fueron corregidos por los efectos de filtro interno a las longitudes de onda de excitación y emisión producidos por la adición del inhibidor suponiendo que la intensidad de fluorescencia recogida viene desde el centro de la cubeta (13).

La unión reversible de pequeños solutos a las proteínas puede ser descrita en términos de un modelo de sitios de unión (14).

De acuerdo con el modelo de sitios de unión, podría ocurrir que m moléculas de β -caroteno (Car) se unan a un sitio por molécula de proteína (ec. 3), es decir, m es la molecularidad del soluto en la etapa de unión.



La constante de equilibrio K puede ser expresada por medio de las ecuaciones 4 and 5.

$$K = \frac{[\text{sitios ocupados}]}{[\text{sitios libres}][\text{Car}]^m} \quad (\text{ec. 4})$$

$$K = \left[\frac{\theta}{(1-\theta)} \right] \left(\frac{1}{[\text{Car}]^m} \right) \quad (\text{ec. 5})$$

En las ec. 4 y 5, $[\text{Car}]$ es la concentración de equilibrio del soluto (Car). La fracción de sitios de unión de la proteína ocupados por el soluto, θ , puede escribirse en términos de parámetros de fluorescencia (ec. 6).

$$\theta = \frac{(F_{\text{prot}}^o - F_{\text{prot}})}{(F_{\text{prot}}^o - F_{\text{prot}}^*)} \quad (\text{ec. 6})$$

En la ec. 6, F_{prot} y F_{prot}^o son las intensidades de fluorescencia de la proteína en presencia y ausencia de cierta cantidad de Car, respectivamente; y F_{prot}^* la intensidad de fluorescencia cuando todos los sitios de unión se encuentran ocupados por el soluto.

En nuestro caso, podemos suponer que $F_{\text{prot}}^* = 0$ porque no se ha observado efecto de saturación con el agregado de Car. Bajo estas condiciones puede obtenerse la ec. 7(15).

$$\ln \left[\frac{(F_{\text{prot}}^o - F_{\text{prot}})}{F_{\text{prot}}} \right] = \ln K + m \ln[\text{Car}] \quad (\text{ec. 7})$$

La ec. 8 relaciona $[Car]$ con las concentraciones analíticas del soluto, $[Car]_o$, y la proteína, $[P]_o$.

$$[Car] = [Car]_o - m\theta[P]_o \tag{ec. 8}$$

Combinando las ec. 7 y 8 obtenemos la ec. 9.

$$\ln \left[\frac{(F_{prot}^o - F_{prot})}{F_{prot}} \right] = \ln K + m \ln([Car]_o - m\theta[P]_o) \tag{ec. 9}$$

Para todos los experimentos la concentración analítica de proteína $[P]_o = 1.26$ mM. La Figura 6 muestra la gráfica del término de la izquierda de la ec. 9 vs. $[Car]_o$ a diferentes temperaturas. Los valores de K y m obtenidos a partir de un ajuste no lineal, se muestran en la Tabla 3.

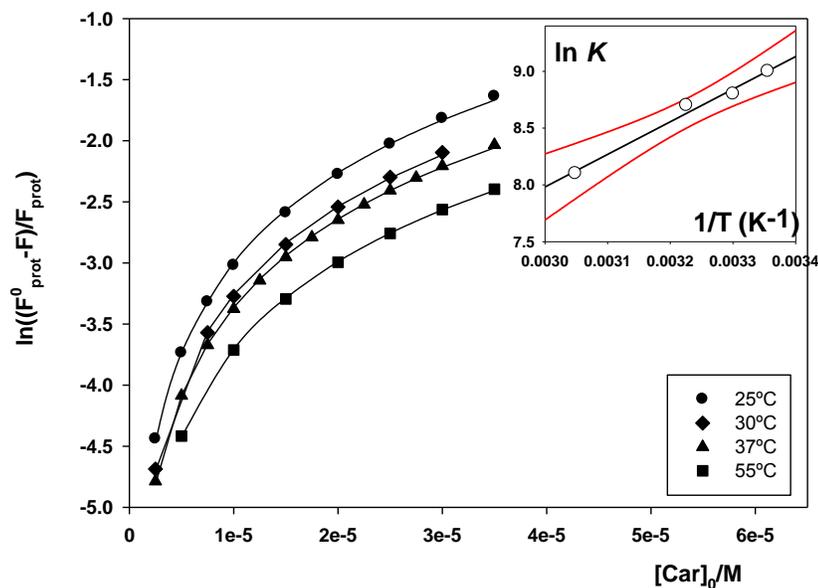


FIGURA 6: Término de la izquierda de la ec. 9 vs. $[Car]_o$. Inset: Gráfico de $\ln K$ vs. T^{-1} . Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas sólidas muestran el ajuste no lineal de los datos de la ec. 9.

T/ K	ln K	<i>m</i>
298	9±1	1.07±0.04
303	8.8±0.4	1.05±0.01
310	8.7±0.4	1.04±0.01
328	8.1±0.3	1.03±0.01

TABLA 3: Valores de lnK y *m* obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales de la ec. 9.

En la mayoría de los casos estudiados en literatura para la unión de pequeños ligandos a albúminas, $m = 1$ (13). Esto está en acuerdo con los datos obtenidos aquí para β -caroteno con BSA. En ausencia de cooperatividad, los valores de estos parámetros corresponden al número de moléculas del ligando que interactúan (simultáneamente) con un único sitio de unión y no están relacionados con el número de sitios de unión equivalentes (13, 15, 16).

Como puede observarse en la Tabla 3, existe una leve dependencia de K con la temperatura, lo cual indica una entalpía de reacción muy baja. A partir de la pendiente y la ordenada al origen del gráfico lineal de van 't Hoff de lnK vs. T^{-1} (recuadro de la Figura 6) se estimaron los valores de, $\Delta H^\circ = -24 \pm 2 \text{ kJmol}^{-1}$, y $\Delta S^\circ = 5 \pm 7 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$, respectivamente.

Mediciones de fosforescencia de oxígeno singlete

Para los ensayos de fosforescencia de oxígeno singlete, se eligieron tres sensibilizadores diferentes cuyos espectros de fluorescencia en liposomas y en solución se presentan en la Figura 7.

Como puede verse en la Figura 7 uno de los sensibilizadores hidrófobos, PPa, forma agregados en liposomas, mientras que el otro, TPPCOOMe, no lo hace (12). Esto puede deberse a una localización diferente dentro de la bicapa, ya que se espera que el resto éster de TPPCOOMe tenga una mayor afinidad por la fase acuosa, por lo tanto, es probable que se encuentre en la bicapa cerca de la interfase liposoma / agua. El espectro de emisión de ALPcS₄ (hidrófilo) en liposomas es coincidente con el que se obtiene en solución acuosa, tal como se predijo a partir de su localización preferente en el medio acuoso.

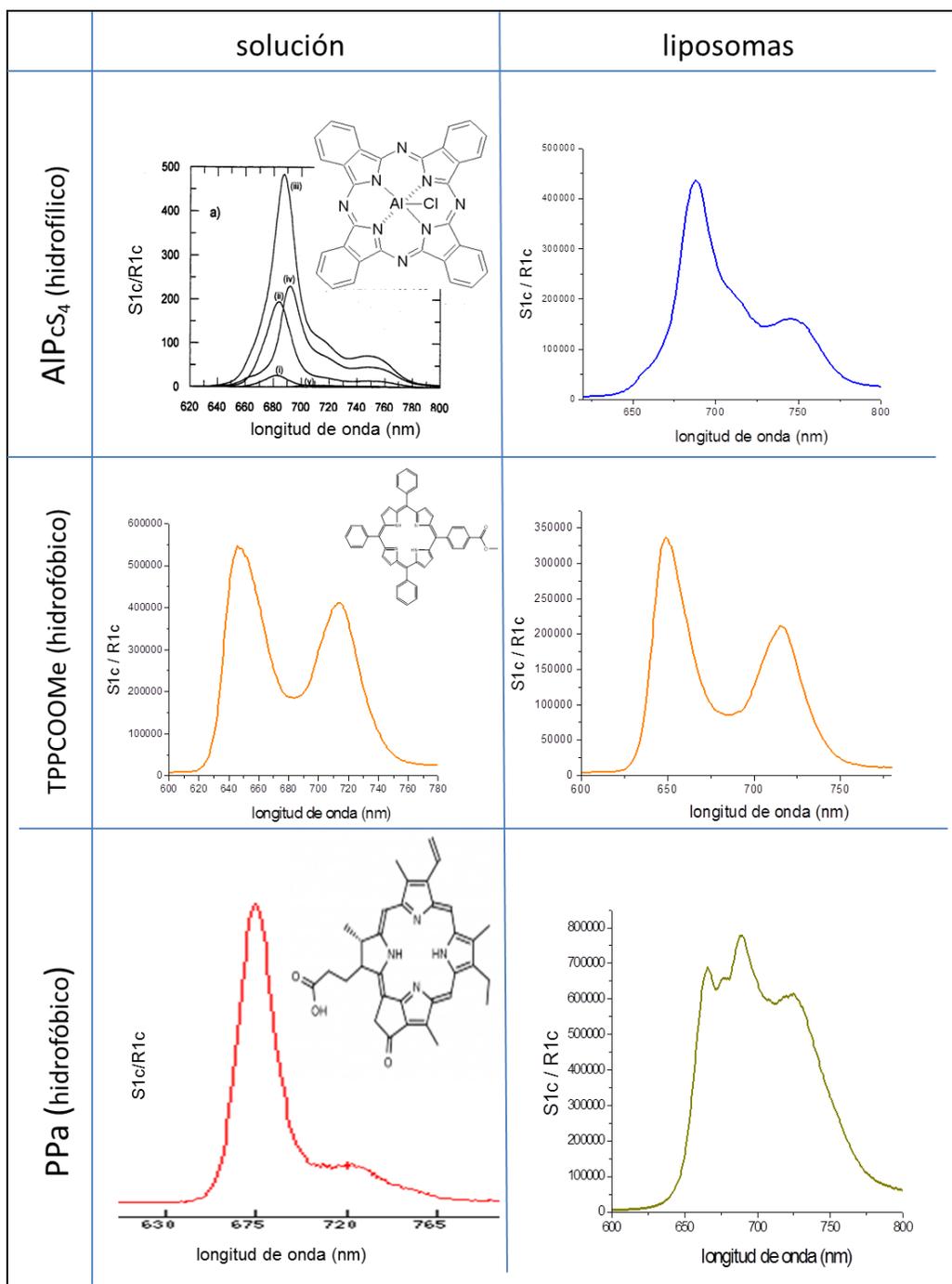


FIGURA 7: Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda^{exc} = 420$ nm) de los sensibilizadores usados para los ensayos de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ en solución (AlPcS₄ en buffer acuoso, TPPCOOMe y PPa en DMSO) y en dispersiones de liposomas.

La Tabla 4 muestra los tiempos de vida del $O_2(a^1\Delta_g)$ medidos en dispersiones de liposomas en buffer preparadas con D_2O que contienen $33,2 \mu M$ β -caroteno, $1,26 mM$ BSA ó $40 \mu M$ NaN_3 . En medio homogéneo las concentraciones de quenchers empleadas aquí son lo suficientemente altas como para desactivar al menos un 96% del $O_2(a^1\Delta_g)$ producido (17, 18). El tiempo de vida medio de $O_2(a^1\Delta_g)$ en D_2O puro es de $\sim 67 \mu s$. (19). Los datos obtenidos aquí en ausencia de quenchers añadidos cuando el $AlPcS_4$ ó PPa se emplean como sensibilizadores, indican que el $O_2(a^1\Delta_g)$ detectado ópticamente está situado principalmente en el medio acuoso. Por lo tanto, el tiempo de vida menor medido para el sensibilizador PPa es probablemente debido a un efecto de auto-quenching en la bicapa antes de llegar a la región acuosa.

Los resultados muestran un papel de desactivación eficiente de la NaN_3 hidrofílica, capaz de atravesar la bicapa lipídica. La proteína BSA, sería incapaz de llegar a la laguna de agua interior de los liposomas, debido a su tamaño y al hecho de que ésta se añade al sistema después de haberse formado la suspensión de liposomas, lo cual da como resultado un quenching más efectivo cuando se emplean sensibilizadores hidrófobos. Esto se explica considerando que la BSA puede unirse a los liposomas de acuerdo con los datos reportados (20). Si tenemos en cuenta el volumen de una molécula de BSA ($2,24 \times 10^5 \text{ \AA}^3$ (21)), probablemente muchas moléculas de proteína sean capaces de interactuar con un liposoma mucho más grande (volumen calculado = $9 \times 10^8 \text{ \AA}^3$ para uno de radio de 60 nm).

Los datos obtenidos para el quencher β -caroteno son dependientes del sensibilizador empleado en los experimentos. Como se muestra arriba, β -caroteno es capaz de afectar la localización del pireno y producir su desplazamiento a una región más hidrófoba (Figura 5). El hecho de que el tiempo de vida del $O_2(a^1\Delta_g)$ se haga más largo en presencia del carotenoide cuando $TPPCOOMe$ es el sensibilizador, puede explicarse si el antioxidante también puede afectar la localización de este sensibilizador y, por lo tanto, la producción de oxígeno singlete y su disipación dentro de la bicapa. De acuerdo con el espectro de fluorescencia (Figura 7), se espera que $TPPCOOMe$ se localice en la bicapa cerca de la interfaz de liposoma/agua y, por tanto, la incorporación de carotenoides en los liposomas puede producir un desplazamiento del sensibilizador a un medio ambiente más polar.

Sensibilizador	Condiciones	τ_{Δ} / μs
AlPcS ₄	Solo sensibilizador	64,4 \pm 0.2
	+ BSA	18,8 \pm 0.2
	+ NaN ₃	3,00 \pm 0.02
	+ β -caroteno	34,73 \pm 0.05
TPPCOOMe	Solo sensibilizador	43,9 \pm 0.4
	+ BSA	3,28 \pm 0.03
	+ NaN ₃	3,66 \pm 0.09
	+ β -caroteno	56,9 \pm 0.4
PPa	Solo sensibilizador	68,3 \pm 0.3
	+ BSA	6,18 \pm 0.06
	+ NaN ₃	1,14 \pm 0.01
	+ β -caroteno	56,8 \pm 0.4

TABLA 4: Tiempos de vida del $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ obtenidos en suspensiones de liposomas en D_2O con diferentes cantidades de sensibilizadores y quenchers.

Las trazas de decaimiento de $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$, así como un esquema propuesto para la localización de los diferentes componentes de los sistemas estudiados, se muestran en la Figura 8.

Se investigó, además, la desactivación de $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ para el sensibilizador hidrófobo PPa en el intervalo de concentraciones 0-70 μM tanto en ausencia como en presencia de BSA (Figura 9).

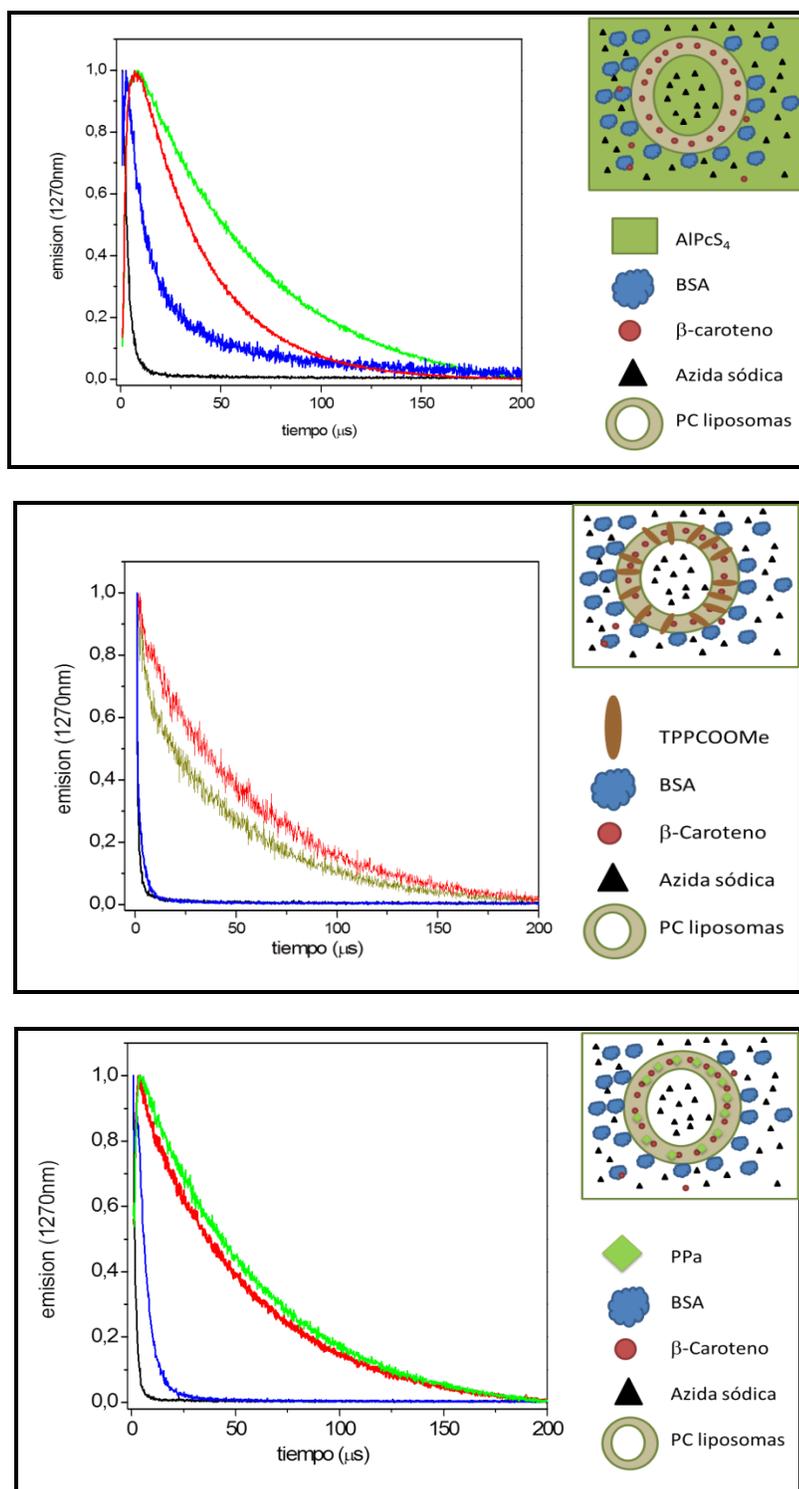


FIGURA 8: Trazas de decaimiento de $O_2 (a^1\Delta_g)$ en preparaciones de liposomas con los fotosensibilizadores ALPcS₄ (A), TPPCOOMe (B) y PPa (C), sólo o con el agregado de β-caroteno, BSA o azida sódica, según se indica en la figura. Recuadro: esquema propuesto para la localización de los distintos componentes del sistema heterogéneo liposoma/agua.

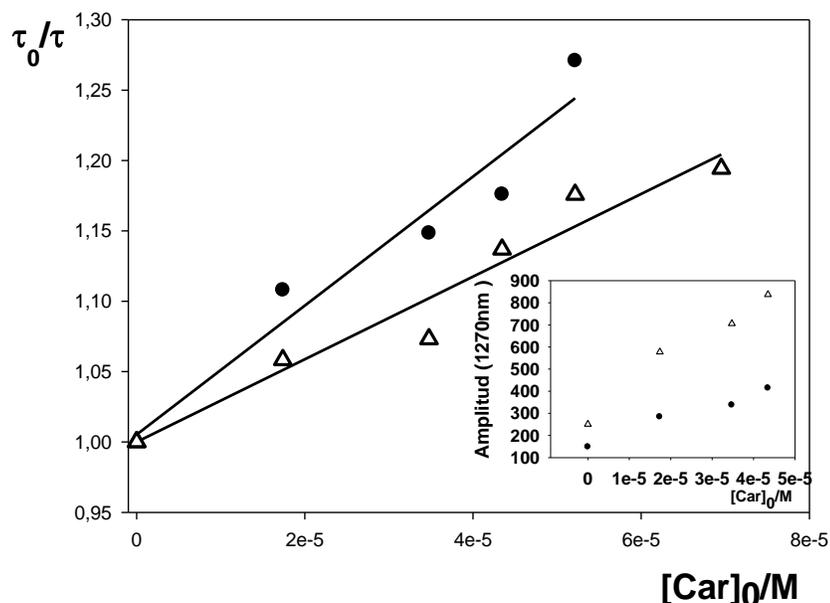


FIGURA 9: Gráfico de τ_0^{-1} vs. concentración analítica de β -caroteno, $[\text{Car}]_0$. Recuadro: intensidad máxima de fosforescencia de $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ a 1270nm vs. $[\text{Car}]_0$. (Δ) sin BSA, (\bullet) con BSA.

Es notable un aumento de la intensidad máxima de fosforescencia del $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ con la concentración de $[\text{Car}]_0$, tanto para sistemas con o sin BSA, tal como se muestra en el recuadro de la Figura 9. La mayor cantidad de $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ producido en presencia del carotenoide indica que su incorporación favorece la desagregación del sensibilizador.

Para analizar el efecto de quenching, vamos a considerar el valor medio del % IY (Tabla 1), lo que indica que en promedio el 11% de las moléculas de β -caroteno están unidas a los liposomas, ya sea en el interior de la bicapa o en la cara expuesta al medio acuoso, como se muestra por la ec. 10.

$$n(\text{Car}_{\text{inc}}) / n(\text{Car}_0) = 0.11 \quad (\text{ec. 10})$$

en la ec. 10 $n(\text{Car}_{\text{inc}})$ y $n(\text{Car}_0)$ representan el número de moles incluidos y totales de β -caroteno, respectivamente. El balance de masa para β -caroteno arroja la ec. 11.

$$V_T \times [\text{Car}]_0 = V_{\text{LIP}} \times [\text{Car}]_{\text{inc}} \quad (\text{ec. 11})$$

En la ec. 11, $[\text{Car}]_0$ es la concentración analítica del carotenoide, V_T es el volumen total de las muestras, y V_{LIP} es el volumen de la fase orgánica. La ec. 11 también puede reescribirse en términos de la fracción de volumen de la fase orgánica, f , (ec. 12).

$$[\text{Car}]_0 = f \times [\text{Car}]_{\text{inc}} \quad (\text{ec. 12})$$

El valor de $f = 0.001$ puede ser estimado a partir de la concentración de lípidos (1.32 mM) y el volumen por molécula de lípido (1253 \AA^3) (22).

Combinando las ec. 10 y 12 se obtiene la ec. 13 para la concentración de β -caroteno en la fase orgánica.

$$[\text{Car}]_{\text{inc}} = (0.11/f) \times [\text{Car}]_o = 110 \times [\text{Car}]_o \quad (\text{ec. 13})$$

El modelo de pseudofase asume la partición del $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ entre el agua y las pseudofases orgánicas (Ver Figura 10). Este modelo se simplifica si se acepta que para $\text{O}_2(X^3\Sigma_g^-)$ y $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ el equilibrio entre las pseudofases interna y externa es mucho más rápido que la velocidad de decaimiento del $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ en ambas pseudofases (23, 24). Bajo esta condición, es esperable que las moléculas de $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ en la bicapa lipídica, Δ_{LIP} , y en el medio acuoso Δ_{aq} , decaigan con un único tiempo de vida, es decir $\tau_{\Delta} = 1/k_{\Delta}$, (23, 25) en concordancia con el decaimiento monoexponencial observado en este trabajo, y que ambos están relacionados por la constante de partición K_{Δ} dada por la ec. 14.

$$K_{\Delta} = \frac{[\Delta_{\text{LIP}}]}{[\Delta_{\text{aq}}]} \quad (\text{ec. 14})$$

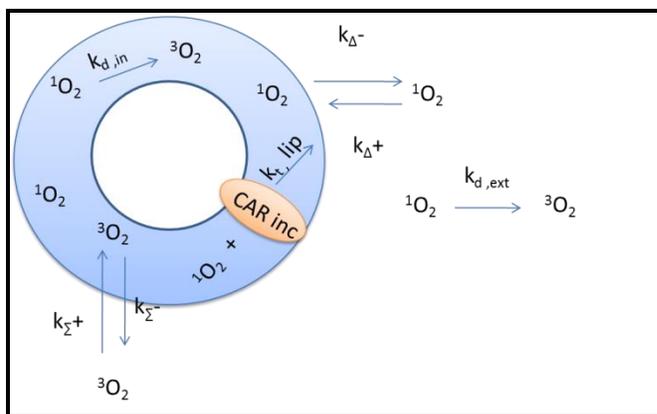


FIGURA 10: Esquematación del Modelo de Pseudofase utilizado en la interpretación de los resultados para el sistema liposomas/ β -caroteno. En las ecuaciones enunciadas en el texto, el $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ en los liposomas se lo denota como Δ_{LIP} y al acuoso como Δ_{aq} , respectivamente. La zona coloreada en celeste corresponde a la bicapa liposomal y el medio circundante es acuoso.

De acuerdo a este modelo, el decaimiento para el $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ viene dado por la ec. 15.

$$d[\Delta_T]/dt = f d \frac{[\Delta_{\text{LIP}}]}{dt} + (1 - f) d \frac{[\Delta_{\text{aq}}]}{dt} \quad (\text{ec. 15})$$

En las ec. 15 y 16, $[\Delta_T]$ se refiere a la concentración total de O_2 ($a^1\Delta_g$). Como Δ_{LIP} y Δ_{aq} decaen con un tiempo de vida común κ_d^{-1} , puede escribirse la ec. 16.

$$d \frac{[\Delta_T]}{dt} = k_d[\Delta_T] = k_d(f[\Delta_{LIP}] + (1-f)[\Delta_{aq}]) \quad (\text{ec. 16})$$

Vamos a considerar que: i) el β -caroteno lipofílico se unirá a la parte interna de la bicapa del liposoma y no estará formando parte de la interfase liposoma/agua (26), ii) el proceso de quenching ocurre en la bicapa lipídica con una constante de velocidad $\kappa_{t,LIP}$ y iii) el decaimiento de pseudo-primer orden del O_2 ($a^1\Delta_g$) está dado por $\kappa_{d,LIP}$ y $\kappa_{d,aq}$ respectivamente (ec. 17).

$$-d \frac{[\Delta_T]}{dt} = f(k_{d,LIP}[\Delta_{LIP}] + \kappa_{t,LIP}[\Delta_{LIP}][Car]_{inc}) + (1-f)(k_{d,aq}[\Delta_{aq}]) \quad (\text{ec. 17})$$

A partir de las ecs. 13-14, 16 y 17, podemos obtener la ec. 18.

$$k_d = \frac{fk_{d,LIP}K_\Delta + (1-f)k_{d,aq}}{fK_\Delta + (1-f)} + \left(\frac{fk_{t,LIP}K_\Delta \times 110}{fK_\Delta + (1-f)} \right) [Car]_o = k_{d,o} + k_{t,ap}[Car]_o \quad (\text{ec. 18})$$

En la ec. 18, $\kappa_{d,o} = (\tau_\Delta^o)^{-1}$ es la velocidad de decaimiento del $O_2(a^1\Delta_g)$ en ausencia del carotenoide, y $\kappa_{t,ap}$ es la constante de quenching total aparente obtenida del gráfico $\tau_\Delta^o/\tau_\Delta$ vs. $[Car]_o$ (Figura 7 para los experimentos llevados a cabo con PPa). Tomando $K_\Delta = 4$, la constante de partición del $O_2(X^3\Sigma_g^-)$ en liposomas de DMPC (27), la cantidad $fK_\Delta + (1-f)$ es ~ 1 . De esta forma, la ec. 19 muestra que el valor predicho para $\kappa_{d,o}$ es coincidente, dentro del error experimental, para el que se observa en D_2O puro (2) en absoluta concordancia con el valor obtenido aquí en ausencia de BSA ($1.5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$).

La Tabla 5 enumera los valores de $\kappa_{t,LIP}$ obtenidos a partir de la ec. 18 y los valores de $\kappa_{t,ap}$ medidos para el sensibilizador PPa (datos de la Figura 9 en ausencia de BSA) y ALPcS₄ (estimados a partir de la información presentada en la Tabla 4).

La constante de velocidad aparente mayor medida cuando se emplea el sensibilizador $AlPcS_4$ puede ser un indicio de la interacción intermolecular entre la ftalocianina y β -caroteno en el medio acuoso polar, que no es un buen disolvente para el carotenoide.

Suponiendo que el proceso sólo se produce en la membrana lipídica, se ha reportado una constante de quenching de $O_2(a^1\Delta_g)$ por β -caroteno en liposomas del orden de $10^7 M^{-1} s^{-1}$ (28). Los valores más bajos medidos en liposomas, como también encontramos aquí, en comparación con soluciones alcohólicas en donde la constante de quenching es $\sim 1 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$ (17), se explican sobre la base: i) a que las velocidades de difusión son más bajas en las membranas y ii) a que la difusión es lateral en las membranas, mientras que es tridimensional en solución.

<i>AlPcS₄</i>	<i>Constantes de velocidad (M⁻¹s⁻¹)</i>
k_q^{app}	4×10^8
$k_{t,LIP}$	9×10^8
<i>PPa</i>	
k_q^{app}	$4,3 \times 10^7$
$k_{t,LIP}$	1×10^8

TABLA 5: Constantes de velocidad de quenching aparente y local de $O_2(a^1\Delta_g)$ por β -caroteno.

En presencia de BSA, el decaimiento de $O_2(a^1\Delta_g)$ medido es más rápido que en ausencia de la proteína, como se esperaba a partir del valor reportado para la constante de velocidad de quenching de $O_2(a^1\Delta_g)$ por la BSA ($5 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$) (18). También podemos ver en la Figura 9 que la desactivación de $O_2(a^1\Delta_g)$ por β -caroteno es más rápida en presencia de BSA. La explicación del efecto de BSA en el proceso de quenching no es sencilla. La razón podría ser simplemente que el complejo de BSA con β -caroteno en el medio acuoso sea un mejor desactivador de $O_2(a^1\Delta_g)$ que el β -caroteno libre. Sin embargo, otras razones también podrían argumentarse. Por ejemplo, se informó que en las células, las proteínas de unión mejoran el transporte difusivo mediante la reducción de la unión del ligando a las membranas intracelulares inmóviles (30). Por lo tanto, BSA presumiblemente podría ser también capaz de extraer el carotenoide de la bicapa lipídica tras la formación del complejo. Además, se informó que la adsorción de BSA en liposomas podría causar la desestabilización de la membrana seguida por la fuga del contenido interior del liposoma (31-32), como

resultado de esta interacción el β -caroteno presente en la bicapa también podría terminar unido a la proteína. Esta última hipótesis podría ser la responsable de los efectos observados por TEM en los liposomas preparados en presencia de BSA (Figura 2). Sería interesante estudiar el quenching de $O_2(a^1\Delta_g)$ por β -caroteno en suspensiones de liposomas en presencia de concentraciones más bajas de BSA para evitar que la proteína afecte la estructura de las vesículas en las condiciones del experimento.

Conclusiones

Se prepararon y caracterizaron liposomas de fosfatidilcolina (PCL). Las mediciones de fluorescencia de pireno mostraron que la incorporación de β -caroteno en los liposomas no sólo aumenta la fluidez lateral de la bicapa, sino que también produce una separación de los lípidos que da lugar a un aumento del tamaño de los liposomas, lo cual está en concordancia con los datos arrojados por el estudio por DLS.

El estudio de la interacción entre β -caroteno y BSA investigada por desactivación de la fluorescencia intrínseca de la proteína por el carotenoide condujo a una constante de unión de 6×10^3 a 37°C y de su ligera dependencia con la temperatura se obtuvieron los valores de $\Delta H^\circ = -24 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$, y $\Delta S^\circ = 5 \pm 7 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$.

La asociación de solutos y proteínas puede ser interpretada teniendo en cuenta un modelo de dos pasos. El primer paso consiste en la penetración mutua de las capas de hidratación que causan desorden del disolvente, seguida por otras interacciones de corto alcance. La variación neta de energía libre ΔG^0 , se determina por el cambio de entropía positiva de la primera etapa y el cambio de entalpía negativa de la segunda. Los pequeños cambios de entalpía, como los determinados en la interacción de BSA con β -caroteno, se asignan a interacciones no covalentes (Van der Waals) (34).

El decaimiento de $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ por β -caroteno en presencia de liposomas fue interpretado en términos del modelo de pseudofase, del que se obtuvieron las constantes de velocidad de quenching en la bicapa lipídica.

Referencias

- (1) da Silva E. F. F., Pedersen B. W., Breitenbach T., Toftegaard R., Kuimova M. K., Arnaut L. G., Ogilby P. R., *J. Phys. Chem. B.* 2012 , 116, 445-461.
- (2) Andreeva A. and Popova A., *J. Phys.: Conf. Series* 253. 2010, 012066.
- (3) Fagali N, Catalá A. *Chem Phys Lipids.* 2009, 159, 88-94.
- (4) Tomado del catálogo de Avanti Polar Lipids.
- (5) P. Müller. *Chem. Phys. Lipids.* 2000, 106, 89–99.
- (6) Galla H.J., Hartmann E., *Chem. Phys. Lipids*, 1980, 27, 199–219.
- (7) Koppel, D. E. *J. Chem. Phys.* 1972, 57, 4814.
- (8) Arnbjerg, M. Johnsen, P. K. Frederiksen, S. E. Braslavsky and P.R. Ogilby, *J. Phys. Chem. A*, 2006, 110, 7375–7385.
- (9) E. Skovsen, J. W. Snyder, J. D. Lambert and P. R. Ogilby, *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109, 8570–8573.
- (10) Noiseux I. ; Mermut O. ; Bouchard J.-P.; Cormier J.-F. ; Desroches P. ; Fortin M. ; Gallant P. ; Leclair S. ; Vernon M.L. ; Diamond K.R. ; Patterson M.S., *J. Biom. Optics.* 2008, 13, 041313.
- (11) Silva, E. F. F.; Pedersen, B. W.; Breitenbach, T.; Toftegaard, R.; Kuimova, M. K.; Arnaut, L. G.; Ogilby, P. R. *J. Phys. Chem. B* 2012, 116, 445–461.
- (12) Smotkin E.S, Moy F.T. and Plachy W.Z. *Bioch. Biophys. Acta.* 1991, 1061, 33-38.
- (13) van de Weert, M., Stella, L., *J. Mol. Struct.* 2011, 998, 144–150.
- (14) Alarcón E., Aspée A., Abuin E.B., Lissi E.A., *J. Photochem. Photobiol.* 2012, 106, 1–17.
- (15) E. Lissi, E. Abuin, *J. Fluoresc.* 2011, 21, 1831–1833.
- (16) van de Weert M., *Fluorescence* 2010, 20, 625–629.
- (17) Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem.* 1995, 24, 663–1021,
- (18) Davila, J.; Harriman, A. *Photochem. Photobiol.* 1990, 51, 9-19.
- (19) P. R. Ogilby and C. S. Foote. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 2069–2070.

- (20) Dimitrova M.N., Matsumura H., Terezova N., Neytchev V. *Coll. Surfaces B*: 2002, 24, 53–60.
- (21) Wright A.K. and Thompson M.R. *Biophys J.* 1975, 15, 137–14.
- (22) Huang C. and Mason J.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978, 75, 308-310.
- (23) Lee, P. C. and Rodgers M. A. *JJ. Phys. Chem.* 1983, 87, 4894–4898.
- (24) Montenegro M.A., Nazareno M.A., Durantini E.N., Borsarelli C. D., *Photochem. Photobiol.* 2002, 75, 353–361.
- (25) Martínez, L. A., Martínez C. G., Klopotek B., Lang J., Neuner A., Braun A. M. and Oliveros E. J. *Photochem. Photobiol.* 2000, 58, 94–107.
- (26) Skibsted L.H. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 2409–2417.
- (27) Nagovitsyn I. A., Chudinova G. K., Savranskii V. V., and Komissarov G. G. *Biophysics*, 2007, 52, 389–392.
- (28) Fukuzawa K., Inokami Y., Tokumura A., Terao J., and Suzuki A. *Lipids.* 1998, 33, 751-756.
- (29) Cantrell A., Mc Garvey D.J., Truscott T., Rancan F., and Böhm F., *Arch. Biochem. Bioph.* 2003, 412, 47–54.
- (30) Weisiger, R. A. *Hepatology* 1996, 24, 1288-1295.
- (31) Dimitrova M., Matsumura H., Neitchev V., Furusawa K. *Langmuir.* 1998, 14, 5438-5445.
- (32) Dimitrova M., Matsumura H., Neitchev V., Furusawa K. *Langmuir.* 1997, 13, 6516-6523.
- (34) Ross P.D. and Subramanian S. *Bioquímica.* 1981, 20, 3096-3.102.

Incorporación de β -caroteno en células mamíferas

Hay un libro abierto siempre para todos los ojos: la naturaleza.

Jean Jacques Rousseau.

Luego del estudio realizado en sistemas heterogéneos modelos (liposomas) se evaluó la posibilidad de comparar comportamientos análogos en un sistema real como son las células HeLa.

En el libro *The Immortal Life of Henrietta Lacks* de Rebecca Skloot, el autor explica que las células HeLa tienen una versión activa de la telomerasa durante la división celular, que previene el acortamiento gradual de los telómeros, implicados en el envejecimiento y eventual muerte de las células. De este modo, las células HeLa eluden el límite de Hayflick, que es el número limitado de divisiones celulares que la mayoría de las células normales pueden llevar a cabo antes de morir en el cultivo celular. Además, al ser éstas un tipo de células adherentes, crecen en monocapa sobre las placas de cultivo, y esto permite su localización individual en las técnicas de microscopía que utilizaremos.

También se hicieron algunos estudios comparativos con una línea celular diferente: las HL-60 (células de leucemia promielocítica humana). Las células HL-60, a diferencia de las HeLa, proliferan continuamente en cultivos en suspensión suplementados con suero bovino fetal, L-glutamina, HEPES y antibióticos químicos. El tiempo de duplicación es de aproximadamente 36-48 horas. Esta línea celular se deriva de una mujer de 36 años de edad, con leucemia promielocítica aguda del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. (1)

Un aspecto clave de este estudio, fue asegurar que una cantidad apreciable de β -caroteno lograra incorporarse en las células examinadas ya que estudios posteriores de quenching de oxígeno singlete ameritaban lograr un cambio apreciable dentro de la escala de tiempos examinada.

Por trabajos anteriores en los laboratorios del COMI, es sabido que el tiempo de vida media del oxígeno singlete en una célula, a la cual se le ha realizado un intercambio de

su medio acuoso por D_2O , es de $\sim 15 \mu s$ (2), y que la constante de desactivación de oxígeno singlete por β -caroteno obtenido en soluciones líquidas, $\sim 1 \times 10^{10} s^{-1} M^{-1}$ (3), es característica para un proceso controlado por difusión. Sin embargo, es de esperar que en el entorno intracelular más viscoso esta constante de velocidad sea menor. Si suponemos un valor de $\sim 5 \times 10^8 s^{-1} M^{-1}$ para el quenching del oxígeno singlete por β -caroteno en una célula, (4) entonces sólo se esperaría ver un cambio notable en el tiempo de vida del oxígeno singlete, para concentraciones intracelulares de β -caroteno que excedan $\sim 10 \mu M$.

Según datos de bibliografía (5), puede incorporarse fácilmente una cantidad apreciable de β -caroteno en las células, incubándolas durante un periodo de 48 h en un medio que contenga 0,1% (en volumen) de una mezcla 1:1 de THF y DMSO con el caroteno disuelto. El método para la incorporación de carotenoides en una solución acuosa, fue adaptado en esta tesis del de Bertram et al. quienes demostraron la naturaleza tipo micelar en la mezcla de solventes orgánicos. Específicamente, 5 a 10 μL de una solución de β -caroteno en THF: DMSO (1: 1) (0,5-3 mmol / L) se adicionó en 1 mL de medio de cultivo para dar una concentración final variable en un rango de 1 a 40 $\mu mol / L$, y se agitó durante 30 min. Luego, en este medio acondicionado con β -caroteno, se incubaron las células previamente cultivadas hasta confluencia.

Para obtener evidencia de la incorporación de β -caroteno en las células, se realizaron los ensayos que se describen a continuación:

Cromatografía HPLC:

Después de incubar las células HeLa con β -caroteno 10 μM , éstas se lavaron con medio libre de β -caroteno. Las células fueron entonces despegadas con tripsina 0.25%, se suspendieron y se lisaron. Se hizo una extracción del caroteno con hexano y se evaporó el solvente bajo corriente de nitrógeno hasta sequedad. Se realizó la corrida de HPLC de soluciones independientes de la muestra y de β -caroteno (FLUKA 97% pureza) como estándar.

Instrumentación: La detección de los carotenoides se realizó por HPLC utilizando un instrumento Shimadzu (módulo de suministro de disolvente LC-20AT, en línea con un desgasificador DGU-20A5, detector de fotodiodo UV-visible de matriz de SPD-M20A, horno de columna CTO-10 A5 VP y muestreador automático SIL - 20AAT) equipado con una columna Lichrospher (RP-C18, 4 mm de diámetro x 125 mm de largo). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 ° C. Condiciones de elución: fase móvil compuesta por acetonitrilo: MetOH: DCM (60:20:20) + 1% de acetato de amonio 1 M, tasa de flujo: 1 mL min⁻¹, longitud de onda de detección: 460 nm. El volumen de inyección fue 50 μL .

Resultados

Se encontró que el β -caroteno se incorpora en una cantidad de $\sim 2 \times 10^{-15}$ mol / célula, un valor que es coherente con lo que se ha publicado utilizando el mismo método. (5,6) Si el diámetro de una célula suspendida es de $\sim 20 \mu\text{m}$ y el volumen correspondiente celular de $\sim 4 \text{ pL}$, entonces ésto nos proporciona una concentración intracelular de β -caroteno de $\sim 500 \mu\text{M}$. Además, como el volumen hidrófobo intracelular en el que se localice propiamente el β -caroteno será menor que $\sim 4 \text{ pL}$, la concentración efectiva será mayor que $500 \mu\text{M}$. (ver apéndice con cálculos realizados).

Los perfiles cromatográficos de HPLC de β -caroteno en el solvente de corrida y los extractos de células HeLa se muestran en la Figura 1. El pico de absorbancia a 460nm a un tiempo de retención de $8,02 \text{ min}$, sólo presente en las muestras que contienen β -caroteno, fue asignado al β -caroteno. Los espectros de absorción UV-visible tomados a $8,02 \text{ min}$ apoyan aún más la asignación del pico de β -caroteno (Figura 1).

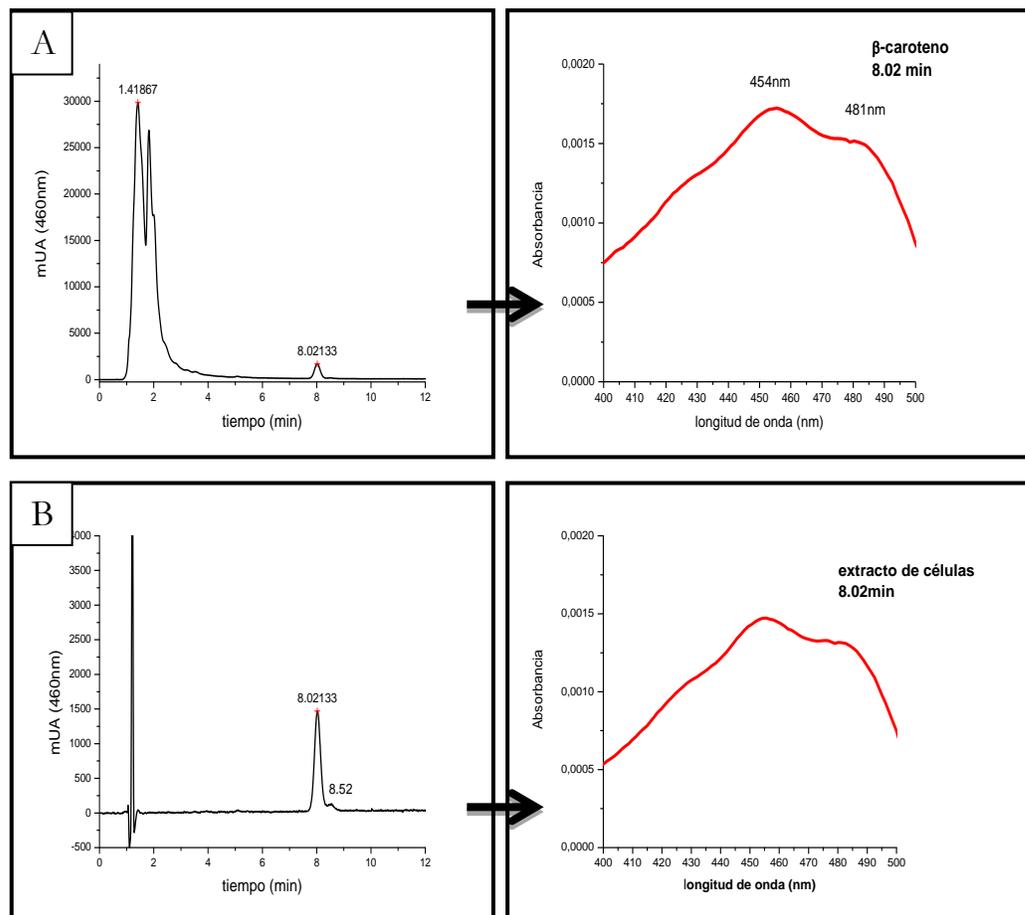


FIGURA 1 Izquierda: Cromatografía de β -caroteno en: el solvente de trabajo (A) y el extracto de células (B). Derecha: Espectros de absorción correspondiente del pico al tiempo de retención de $8,02 \text{ min}$.

Espectroscopías UV-visible y de fluorescencia:

Los extractos de células HeLa incubadas con β -caroteno, preparados como se ha descrito anteriormente volvieron a disolverse en CS_2 , y se examinaron utilizando la absorbancia y fluorescencia de β -caroteno como sonda (Figura 2). Se utilizaron nuevamente diferentes soluciones de β -caroteno como estándares para correlacionar los datos observados con la concentración de β -caroteno. Los resultados arrojaron una cantidad intracelular de β -caroteno de $\sim 1 \times 10^{-15}$ mol/ célula, lo cual es consistente con los datos obtenidos por HPLC. Los controles se prepararon con extractos lipídicos de células, a los que se les adicionó el estándar.

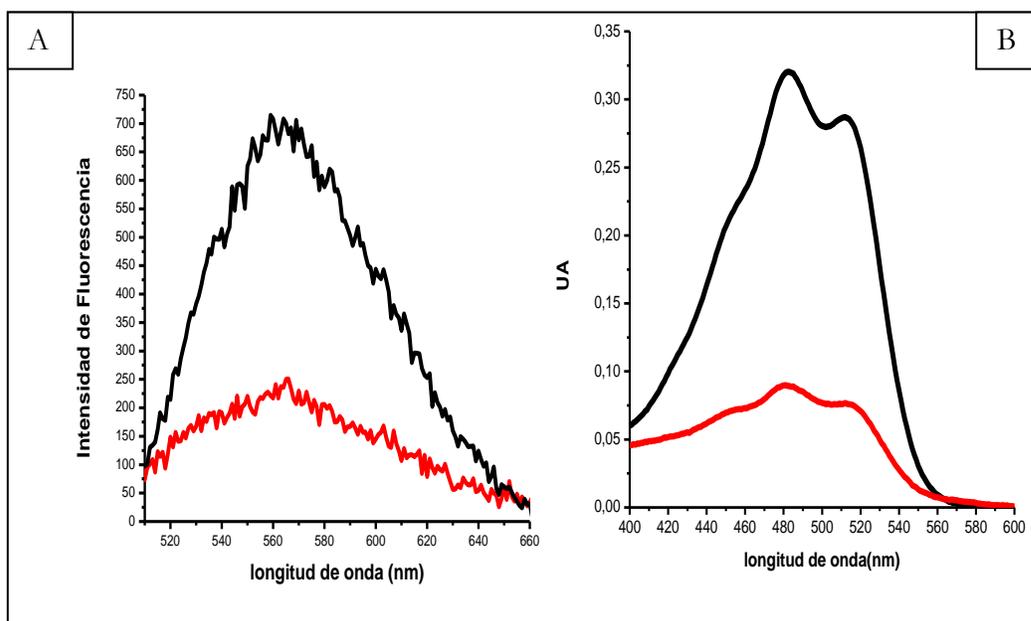


FIGURA 2:A) Espectro de fluorescencia obtenido a partir de extractos de células HeLa incubadas con β -caroteno (línea color rojo) y sin β -caroteno, a las que se les añadió el caroteno a una concentración final de $7\mu M$ (línea de color negro). B) Los espectros de absorción de las soluciones descritas anteriormente

Fluorescencia de β -caroteno en células

Se registraron imágenes de células HeLa incubadas con $10\ \mu\text{M}$ β -caroteno disuelto en una mezcla de THF:DMSO (1:1) (Figura 3).

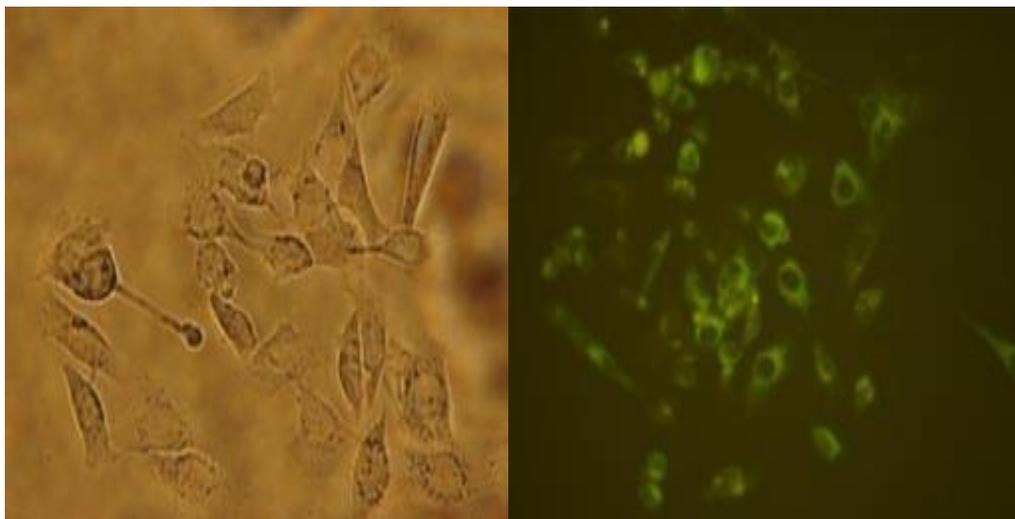


FIGURA 3: Microfotografías de campo claro (a la izquierda) y de fluorescencia (a la derecha) de células HeLa incubadas con β -caroteno a las que se les añadió el caroteno a una concentración final de $10\ \mu\text{M}$.

Debido a que el rendimiento cuántico de fluorescencia de β -caroteno es pequeño, al tomar imágenes de fluorescencia de células incubadas con β -caroteno y compararlas con células incubadas con rodamina (Rh) 123. La intensidad de lámpara, los filtros utilizados ($\lambda_{\text{exc}} = 480/30\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535/40\text{nm}$) y la ganancia del detector fueron idénticos en ambos casos. El tiempo de exposición de la imagen de β -caroteno fue 1,5 s, mientras que el tiempo de exposición para la imagen de Rh123 fue 0,5 s. Los controles de células incubadas en iguales condiciones sin la adición de ningún colorante no mostraron fluorescencia. Los datos son consistentes con una cantidad apreciable de β -caroteno incorporado. Esto se confirmó mediante la comparación de la integral de la intensidad de fluorescencia a partir de una célula HeLa (incubada con β -caroteno $5\ \mu\text{M}$) con la de una célula incubada en presencia de la Rh 123 ($0.025\ \mu\text{M}$) como estándar de fluorescencia (Figura 4).

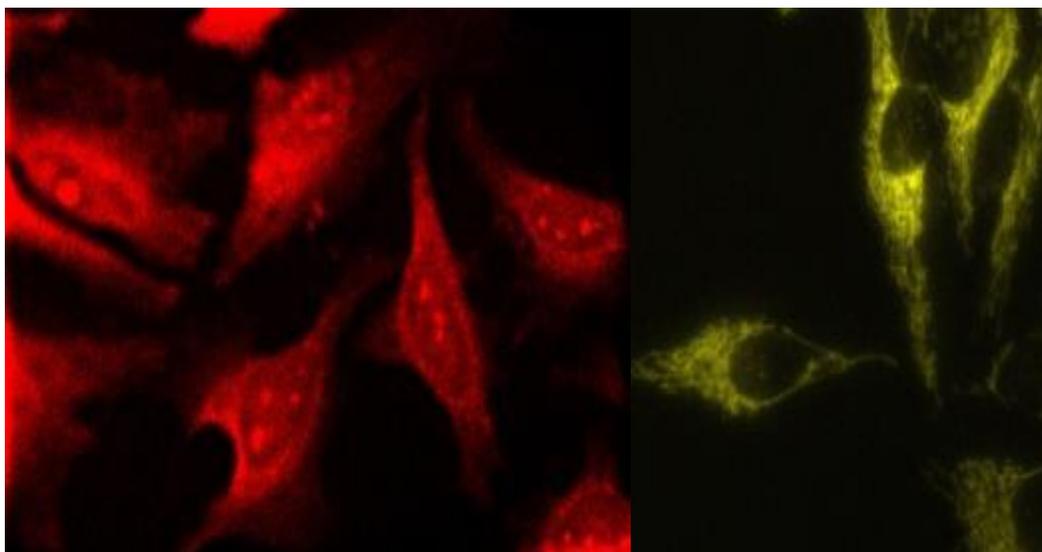


FIGURA 4: Imágenes de células HeLa basadas en la fluorescencia de β -caroteno (izquierda) y Rh123 (derecha). La intensidad de la lámpara, los filtros utilizados y la ganancia del detector fueron idénticos en ambos casos. El tiempo de exposición de la imagen de β -caroteno fue 1,5 s, mientras que el tiempo de exposición para la imagen de Rh123 fue 0,5 s.

Las intensidades de fluorescencia fueron normalizadas respecto al rendimiento cuántico de fluorescencia correspondiente (7,8). A continuación, utilizando la información de la literatura, se estableció una concentración intracelular de Rh123 de $\sim 1 \times 10^{-7} \text{M}$, (9,10) con la cual se calculó una concentración intracelular de β -caroteno de $\sim 700 \mu\text{M}$ que es consistente con los datos que arrojan el resto de los experimentos.

Además, se registró el espectro de fluorescencia de β -caroteno a partir de una sola célula HeLa (Figura 5). Los datos registrados son similares a los espectros obtenidos a partir de muestras independientes de β -caroteno en tolueno. Cuando se comparan los espectros de emisión en distintos solventes orgánicos se observa un efecto de solvente apreciable sobre el máximo de emisión; λ_{max} (tolueno) = 538 nm y λ_{max} (CS_2) = 568 nm.

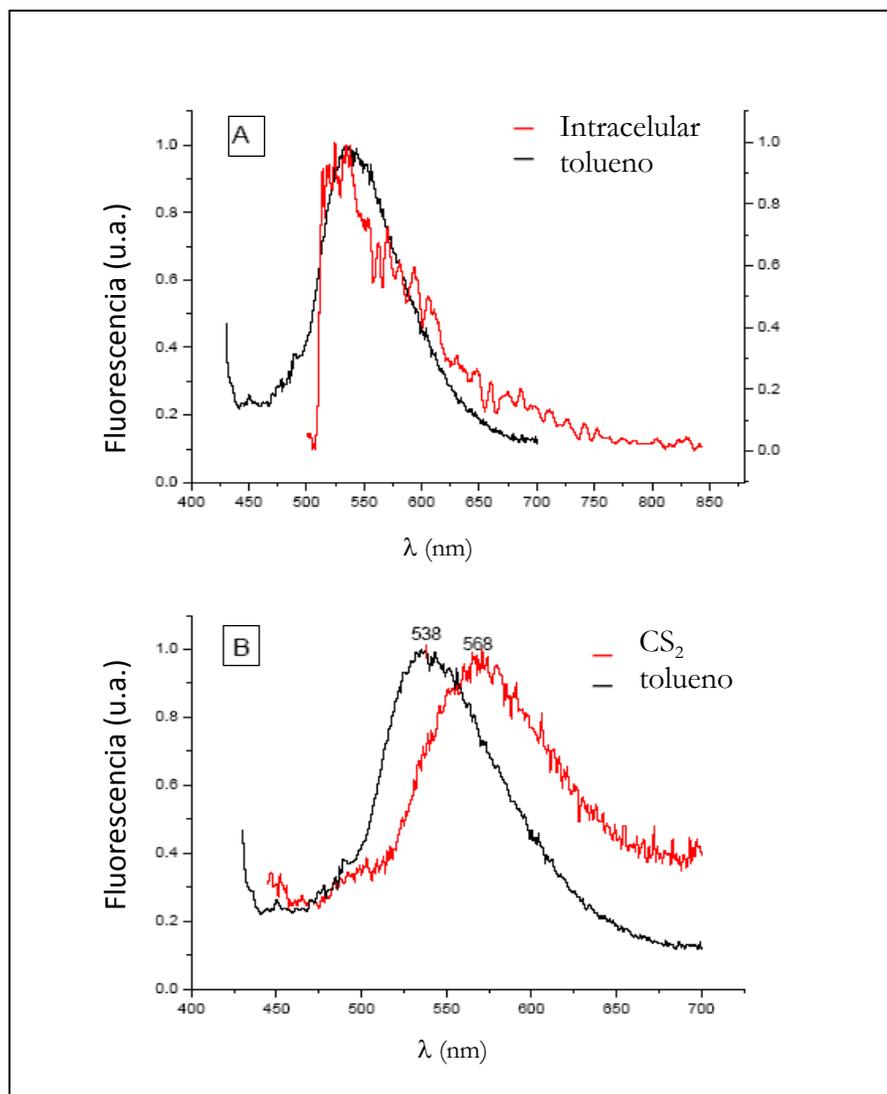


FIGURA 5: A) espectro de fluorescencia registrada a partir de una sola célula HeLa incubada con β -caroteno ($\lambda_{excitación} = 425$ nm). El espectro se registró usando la combinación de un espectrómetro y un filtro de paso largo. Este último da lugar a la aparición brusca del espectro a ~ 510 nm. También se muestra el espectro de fluorescencia de β -caroteno disuelto en tolueno. (B) los espectros de fluorescencia β -caroteno disuelto en CS₂ y en tolueno. Los datos muestran un apreciable corrimiento del espectro dependiente del solvente.

Además, la forma del espectro de fluorescencia de β -caroteno registrado para una célula individual coincide con el obtenido a partir tanto de los extractos de células (Figura 2A) y de disolventes hidrófobos (por ejemplo, en CS₂ (11)). Así, el β -caroteno intracelular no parece encontrarse agregado, o al menos, existe una apreciable concentración intracelular de β -caroteno no agregada.

Espectroscopía Raman

Para confirmar en forma inequívoca la incorporación de β -caroteno por las células, se llevó a cabo Microespectroscopía Raman. Se tomaron suspensiones de células HL-60 e, independientemente, células adherentes HeLa, ambas incubadas con $10\ \mu\text{M}$ β -caroteno; se lavaron con medio ABM, y se colocaron sobre un cubre objetos para ser visualizadas en el microscopio con una densidad celular $\sim 9 \times \text{células}/1.6 \cdot 10^3\ \mu\text{m}^2$. Las señales obtenidas muestran los picos característicos de β -caroteno a 997 , 1152 , 1270 y $1521\ \text{cm}^{-1}$ (6) (Figura 6), que no estaban presentes en los experimentos de control con células incubadas en ausencia de β -caroteno. Esta observación complementa el espectro de fluorescencia registrada a partir de una sola célula, indicando que hay una apreciable concentración intracelular de β -caroteno no agregado.

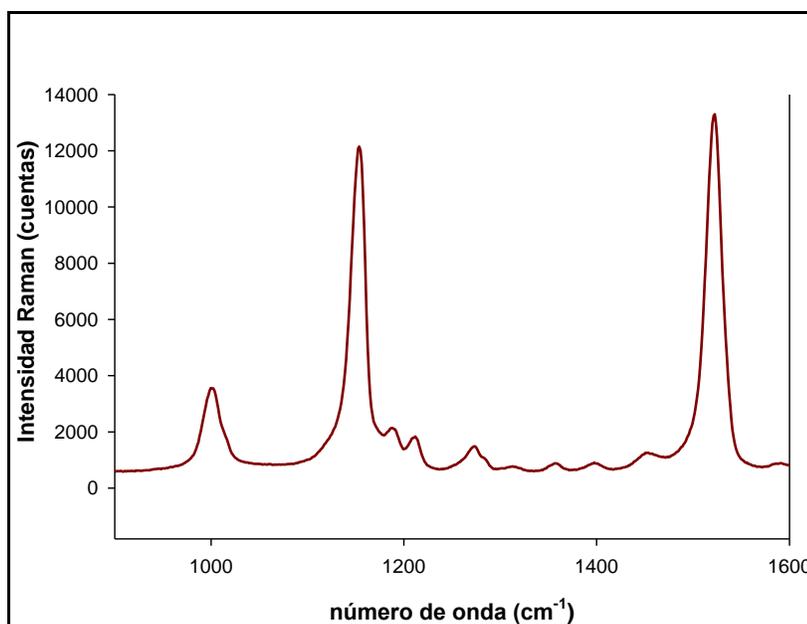


FIGURA 6: Espectro Raman obtenido directamente a partir de células HeLa que se habían incubado con β -caroteno $10\ \mu\text{M}$ durante 48 h.

Instrumentación: Un láser Melles Griot de He-Ne (05-LZ-928) con un haz de $632,8\ \text{nm}$ se enfocó sobre el puerto posterior de un microscopio invertido Nikon TE 2000-S y fue dirigido a la muestra a través de un objetivo $40\times$ de larga distancia-que trabaja a través de un espejo dicroico ($640\ \text{nm}$, de paso largo) con un filtro de excitación 633nm (FWHM $2\ \text{nm}$) y un filtro de emisión de paso a $640\ \text{nm}$. Los espectros se registraron utilizando una cámara CCD (Princeton Instruments) a través

de un objetivo de 40 aumentos con un monocromador de rejilla (Princeton Instrumentos Acton POR 2300i; 1,200 g / mm BLZ rejilla) acoplado al puerto de microscopio sideS4. El Hardware y la adquisición de espectros se controlaron con el programa WinSpec/32 (Roper Científico, ver. 2.5.8.1). El tiempo de acumulación de datos fue de 20 s. Las células se depositaron sobre un sustrato de CaF_2 para evitar las señales de fondo provenientes del vidrio.

Métodos alternativos utilizados para la incorporación del β -caroteno en células HeLa:

Se emplearon dos métodos alternativos de incorporación de β -caroteno en células HeLa. Uno de estos métodos consistió en la internalización de β -caroteno mediante la formación de un complejo entre la β -metilciclodextrina y el caroteno en suspensión acuosa. Este método dio como resultado una fluorescencia mejorada respecto de la obtenida por el método del solvente orgánico descrito previamente, como se ve en la Figura 7A. Así mismo, se tomaron los espectros de emisión y excitación (Figura 7B) para el complejo, con el fin de utilizar los filtros adecuados en la adquisición de las correspondientes imágenes de fluorescencia. Sin embargo, como el rendimiento cuántico de fluorescencia del β -caroteno es bajo (del orden de (6×10^{-5}) (8), las intensidades de fluorescencia obtenidas se mantuvieron bajas. Esta es una desventaja para poder evaluar la localización intracelular del carotenoide mediante imágenes de fluorescencia.

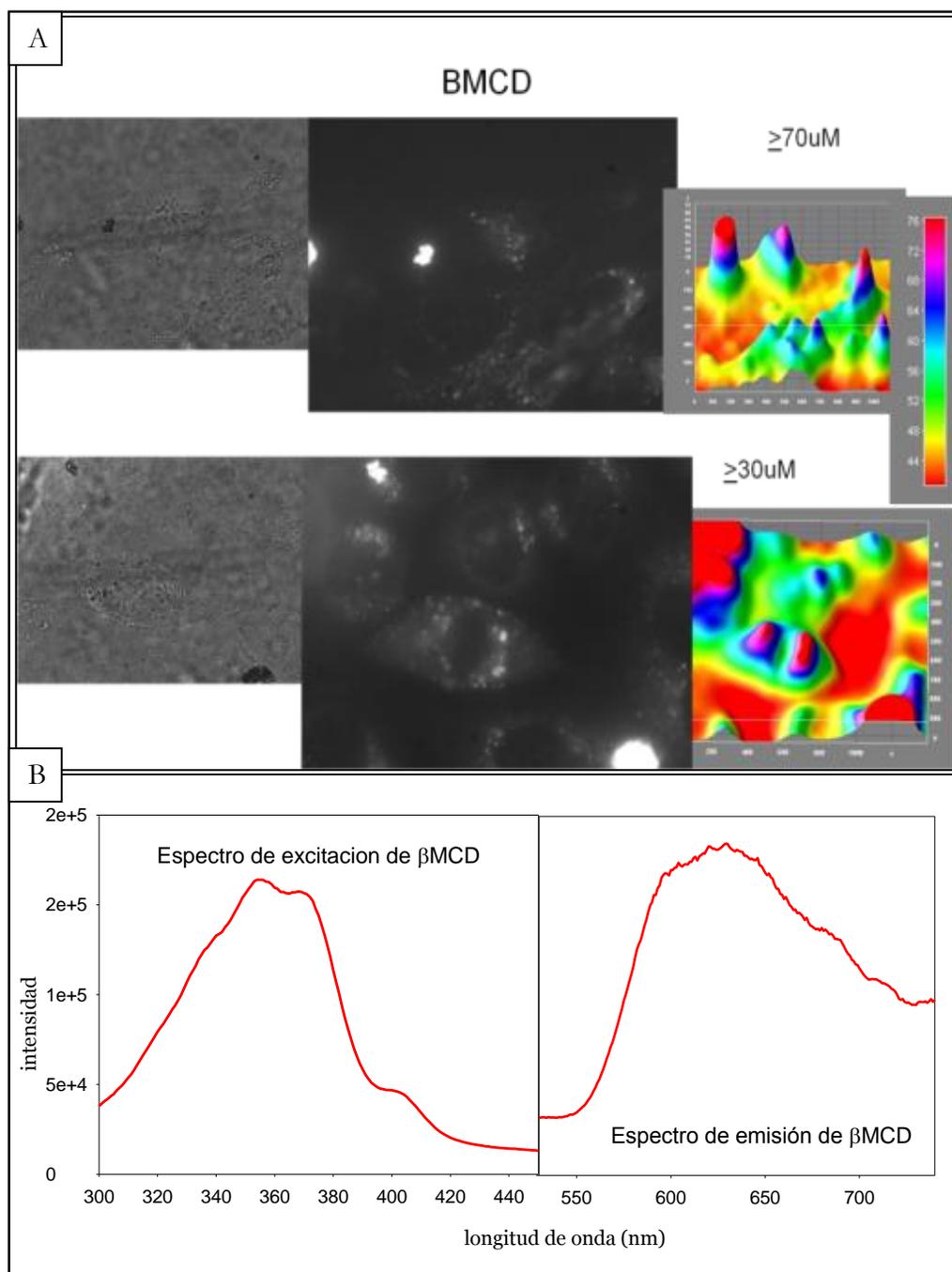
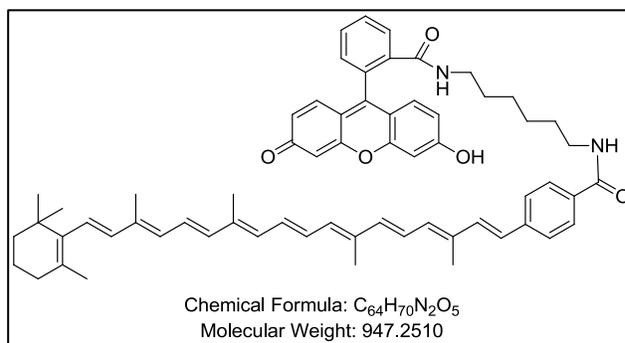


FIGURA 7: A): Microfotografías de células HeLa incubadas con con β -caroteno $\geq 70 \mu\text{M}$ (superior) y $\geq 70 \mu\text{M}$ (inferior) complejo con β -metilciclodextrina durante 48 h. B): Espectros de emisión y excitación del complejo β -metilciclodextrina en agua.

Con el fin de desarrollar un segundo método sensible para la localización del carotenoide por fluorescencia, se sintetizó además un nuevo compuesto fluorescente (CF) (ver Esquema 1), con un valor superior ϕ_f , que contiene un derivado de la

fluoresceína unida covalentemente a β -caroteno (ver síntesis y caracterización fotofísica en Apéndice).



ESQUEMA 1: Fórmula molecular de CF.

Las imágenes de fluorescencia logradas luego de la incorporación de CF en las mismas condiciones experimentales que para β caroteno, se muestran en la Figura 8. Como puede verse en la figura, la fluorescencia de CF proviene mayormente del citoplasma y en menor cantidad del núcleo, probablemente debido a la naturaleza polar de la parte de la molécula que contiene fluoresceína.

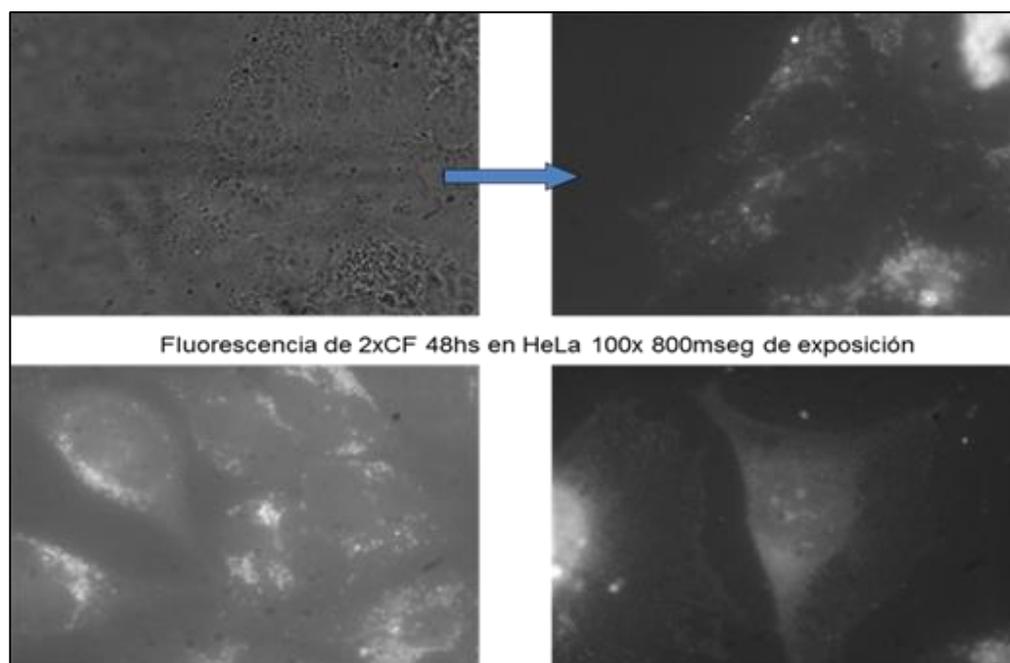


FIGURA 8: Microfotografías de células HeLa incubadas con con CF 10 μ M.

Además, se construyó una curva de incorporación vs. [CF] en el medio de cultivo, para células HeLa en suspensión, mediante valoración de la fluorescencia en cubeta producida por CF y normalizada por el número de células antes de la medida. Los

resultados muestran una incorporación lineal con la dosis del carotenoide en el medio, dentro de un rango de concentraciones subtóxicas. Esto se muestra en el gráfico de la Figura 9.

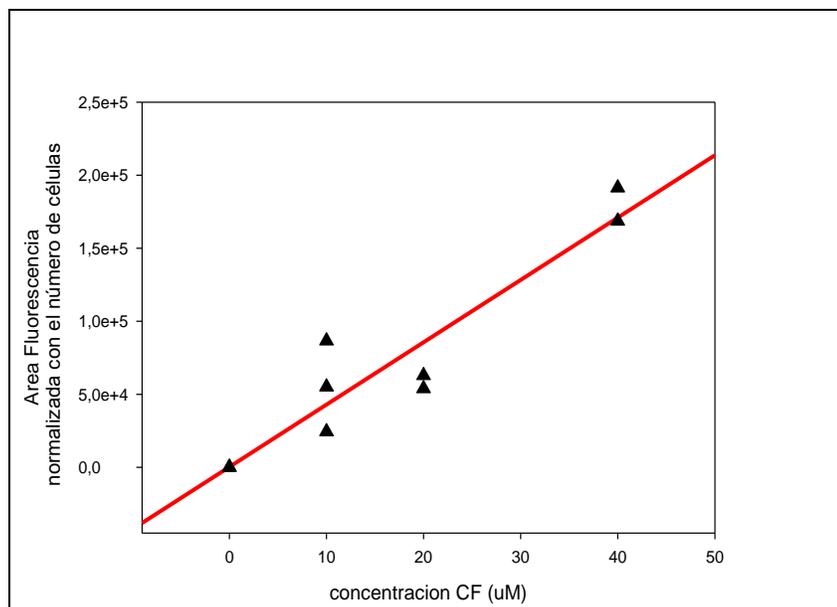


FIGURA 9: Correlación entre la concentración de CF en el medio de cultivo y la intensidad de fluorescencia en suspensiones de células HeLa.

Conclusiones

Por medio de cromatografía HPLC, pudo verificarse la incorporación de β -caroteno y estimar la concentración intracelular del mismo.

Los resultados obtenidos por espectroscopía UV- visible y de fluorescencia sobre extractos de células son similares en cuanto a moles de β -caroteno por célula y se recuperan los espectros obtenidos para el caroteno en solución, lo que indica que la especie molecular (monómero) es coincidente con la presente en soluciones diluidas.

Cuando se utiliza la espectroscopía Raman los picos son los esperados en estas muestras (aglomerados de células), aunque no se descarta que la señal provenga de la superficie celular.

A través del uso de un espectro-fluorómetro de fibra óptica se obtuvieron los espectros de emisión para el carotenoide directamente sobre la célula, y esto permitió confirmar la integridad intracelular de la molécula.

Al utilizar métodos alternativos para la incorporación de β -caroteno en las células, a través de la formación de complejos con ciclodextrinas o su derivatización con un compuesto de alto rendimiento cuántico de fluorescencia como la fluoresceína, vuelve a corroborarse su incorporación.

Resumiendo, la cantidad de β -caroteno incorporada en una célula se correlaciona con la concentración del carotenoide en el medio de incubación, lo cual es consistente con la información publicada (11). Por lo tanto, aunque el β -caroteno intracelular se distribuya de manera no homogénea, la conclusión que se desprende de nuestros datos es que la concentración intracelular eficaz de β -caroteno supera el umbral mínimo de $\sim 10 \mu\text{M}$ necesario para observar el efecto de desactivación para el oxígeno singlete.

Referencias

- (1) Gallagher R, Collins S, Trujillo J. *Blood*. 1979, 54, 713-33.
- (2) Silva, E. F. F.; Pedersen, B. W.; Breitenbach, T.; Toftegaard, R.; Kuimova, M. K.; Arnaut, L. G.; Ogilby, P. R. J. *Phys. Chem. B*. 2012, 116, 445–461.
- (3) Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. J. *Phys. Chem.* 1995, 24, 663–1021.
- (4) Kuimova, M. K.; Yahioglu, G.; Ogilby, P. R. J. *Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 332–340.
- (5) Scita, G.; Aponte, G. W.; Wolf, G. J. *Nutr. Biochem.* 1992, 3, 118–123.
- (6) Briviba, K.; Bornemann, R.; Lemmer, U. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50, 991–995.
- (7) Kubin, R. F.; Fletcher, A. N. J. *Lumines.* 1982, 27, 455-462.
- (8) Gillbro, T.; Cogdell, R. J. *Chem. Phys. Lett.* 1989, 158, 312-316.
- (9) Forster, S.; Thumser, A. E.; Hood, S. R.; Plant, N. *PLoS One* 2012, 7, 332-353.
- (10) Lizard, G.; Chignol, M.-C.; Chardonnet, Y.; Schmitt, D. *Cell Biol. Toxicol.* 1994, 10, 399-406.
- (11) Scita, G.; Aponte, G. W.; Wolf, G. J. *Nutr. Biochem.* 1992, 3, 118-123

Experimentos de fosforescencia de oxígeno singlete resueltos en el tiempo en células

La naturaleza obra sin maestros.

Hipócrates

El método más directo y preciso para evaluar el efecto de un desactivador de oxígeno singlete es monitorear la forma en que cambia la cinética de desactivación del oxígeno singlete $O_2(a^1\Delta_g) \rightarrow O_2(X^3\Sigma_g^-)$ en un experimento resuelto en el tiempo de fosforescencia fotosensibilizada. (1,2,3) Aunque estos ensayos se realizan rutinariamente en estudios en celdas, recientemente se ha demostrado que también se pueden realizar experimentos basados en una microscopía de características únicas, a nivel de una célula mamífera individual. (2, 4,5). Varios estudios con sondas moleculares para la detección de oxígeno singlete en células, indican que estas no son apropiadas debido a que actúan también como sensibilizadores y su fotodegradación es difícil de cuantificar (6).

El seguimiento de la cinética de decaimiento del oxígeno singlete en experimentos de fosforescencia fotosensibilizada de las células no es una tarea trivial ya que, en parte, se ve obstaculizada por el hecho de que el oxígeno singlete es citotóxico (2,7). Por lo tanto, los cambios en la morfología celular y la localización del sensibilizador que ocurren en el transcurso de tiempo en que se registran los datos cinéticos, pueden provocar cambios en la señal de fosforescencia del oxígeno singlete correspondiente (2, 7,8). Sin embargo, bajo condiciones controladas y con el uso de controles adecuados en los experimentos, pueden realizarse mediciones para evaluar el efecto de la incorporación de β -caroteno, en forma lo suficientemente precisa.

Aunque el uso de suspensiones de células para los experimentos de fosforescencia de oxígeno singlete resuelto en el tiempo tiene ciertas limitaciones, (7) de éstos puede extraerse información útil que complementa los resultados que surgen de experimentos de células individuales. Una cuestión clave en la utilización de suspensiones de células es que los datos pueden ser influenciados por el oxígeno

singlete producido en el medio extracelular (es decir, por el sensibilizador que difunde fuera de la célula y que es excitado por el haz del láser de irradiación que se propaga a través de la suspensión) (7). En contraste con esto, la irradiación del sensibilizador en experimentos de células individuales se consigue utilizando un láser enfocado. Por otra parte, debido a la luz dispersada, se excitan moléculas de sensibilizadores localizados en toda la célula. La excitación está, sin embargo confinada realmente a la propia célula y los datos de fosforescencia del oxígeno singlete reflejan los fenómenos intracelulares que se suscitan (9).

Materiales y Métodos:

El sistema óptico utilizado para estos estudios se compone básicamente de cinco partes: (I) un sistema láser de femtosegundos, (II) una configuración de acoplamiento cerrado utilizado para los experimentos en celdas, (III) un detector fotomultiplicador de tubo enfriado PMT de IR cercano, (IV) un microscopio de oxígeno singlete y (V) un microscopio para los experimentos de viabilidad celular. Una ilustración esquemática simplificada del laboratorio COMI en el que se hicieron los experimentos se muestra en la Figura 1.

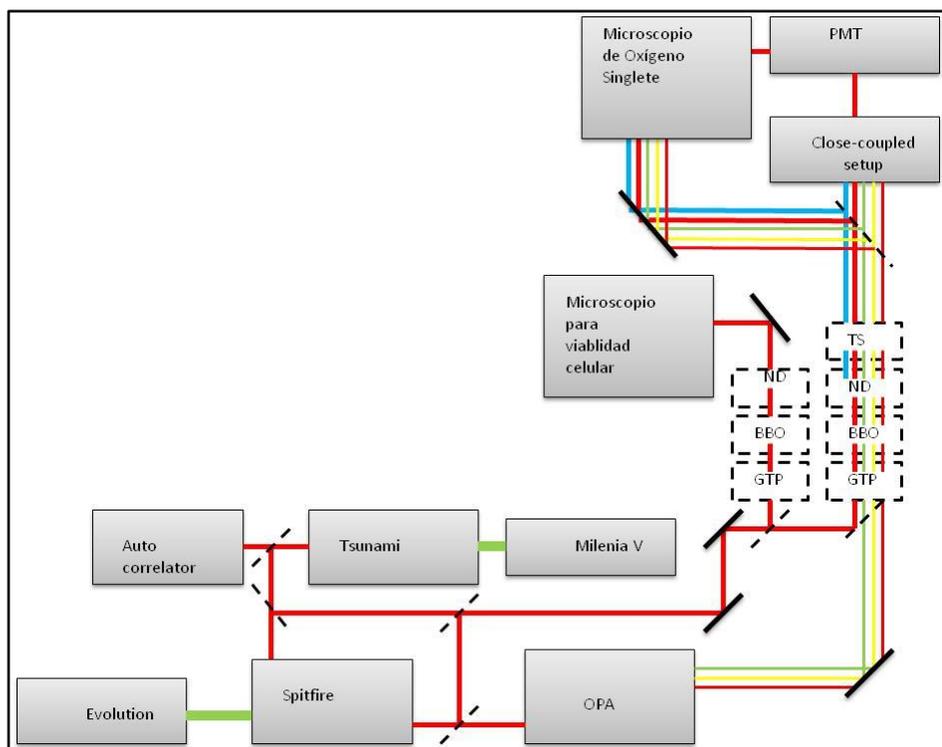


FIGURA 1: Ilustración esquemática simplificada del sistema óptico de los laboratorios COMI con la marcha de los rayos láser asociada. ND (filtro de densidad neutra), BBO (cristal β -borato de bario), GTP (polarizador Glan-Taylor), TS (platina móvil).

El sistema de femtosegundo

Todos los láseres fueron fabricados por Spectra Physics, y se mencionan con sus nombres comerciales. Los pulsos de femtosegundo se generan en un oscilador Ti: Sapphire bombeado cw-modo-cerrado (Tsunami 3941 bombeado por un láser Millennia V Nd: YVO4). El oscilador Ti: Sapphire funciona a 80 MHz y proporciona pulsos de femtosegundos sintonizables (~ 100 femtosegundos de ancho completo en la mitad del máximo, FWHM) en el rango de ~ 730 -900 nm. La energía del pulso se amplifica en aproximadamente un factor de 105 en un amplificador regenerativo bombeado a 1 kHz (Spitfire bombeado por un láser Evolution de Nd: YLF). El Spitfire opera con una frecuencia de repetición variable, $f = 1000/n\text{Hz}$ ($n = 1, 2, 3 \dots$), esto permite obtener pulsos sintonizables de ~ 760 -850 nm (~ 100 a 150 femtosegundos con un ancho de banda espectral de $\sim 10 - 15$ nm FWHM) (10,11). Cabe señalar que la frecuencia de repetición 1 kHz del sistema de láser de femtosegundo amplificada es ideal para experimentos resueltos en el tiempo de fosforescencia de oxígeno singlete, debido a que el tiempo de vida del oxígeno singlete en la mayoría de disolventes está en el rango de μs . La salida del Spitfire puede ser dirigida a un amplificador paramétrico óptico (OPA-800CF). Cuando se bombea el OPA, éste puede suministrar pulsos de femtosegundos sintonizables en el rango de 300 a 3.000 nm, lo que mejora significativamente el rango espectral disponible para los experimentos.

Los perfiles temporales y espaciales del haz del láser fueron caracterizados respectivamente mediante el uso de un autocorrelador y por exploración de una hoja de afeitar (12). La autocorrelación es un método que se emplea para medir pulsos ultracortos. En esta técnica el pulso $E(t)$ y una réplica del mismo retardado un tiempo $t = \tau$ se mezclan en un elemento no lineal (13).

La potencia de salida del Spitfire o del OPA pudo ajustarse usando un polarizador Glan-Thompson (GTP). A continuación, la luz pasa a través de un cristal BBO en la que dobla su frecuencia a través de la generación del segundo armónico para producir la longitud de onda de excitación deseada para los experimentos de un solo fotón. Los filtros de paso de banda se utilizan para eliminar el exceso de luz cercana al infrarrojo. La potencia de la luz se mide con un medidor de potencia (sensor de energía coherente, modelo N ° P519Q) y puede reducirse con el uso de filtros de densidad neutra ND (es decir, ND2 reduce la potencia de ~ 100 veces a 420 nm) antes de que entre ya sea a (I) la configuración óptica para suspensiones de células y experimentos en cubetas o (II) el microscopio para estudios de detección de oxígeno inglete a nivel de una sola célula.

La configuración

Para los experimentos de cubeta, las muestras se irradiaron usando un rayo láser cuyo diámetro (~ 5 mm) queda definido al atravesar una rendija estrecha (pinhole). El diámetro del haz fue prácticamente constante a lo largo de la trayectoria de su propagación a través de la muestra de camino óptico 1 cm. Se colocó un espejo

parabólico detrás de la cubeta para mejorar la eficiencia de recolección de luminiscencia. La luz emitida fue filtrada mediante filtros de interferencia (1275 nm, FWHM: 70 nm, Interferenzoptik Elektronik GmbH) y enfocada en una segunda lente en el área activa del PMT. Una descripción más detallada de la configuración puede encontrarse en Fredriksen et al. (12)

Microscopio de Oxígeno Singlete

Los microscopios invertidos utilizados (Olympus IX71) sirven para dos propósitos. En primer lugar, pueden obtenerse imágenes de las células en el modo de campo brillante usando la cámara CCD por iluminación de la muestra con una lámpara de tungsteno-proporcionada como un accesorio del microscopio. En segundo lugar, podemos enfocar, por ejemplo, el haz de un láser a 420 nm de sección transversal de aproximadamente 1,4 μm , en su cintura (zona más estrecha) (13). Cuando el haz de irradiación entra en el microscopio atraviesa primero una serie de filtros de paso de banda (Thorlabs) y espejos dicroicos (Olympus) que sirven para seleccionar la longitud de onda de excitación específica (si una lámpara de fluorescencia se utiliza en lugar del láser). De esta manera, el rayo incide sobre el espejo dicroico que lo refleja y se concentra a continuación, sobre la muestra usando un objetivo de microscopio de inmersión en agua 60x (Olympus LUMPLFL60XW/IR/0.90). Una cámara CCD (Evolution Qi controlada por el programa Image-Pro, Media Cybernetics) está acoplada al microscopio. El control de la posición de las células en relación con el punto de láser puede lograrse utilizando una platina motorizada (Etapa de PI controlado por PI C-843 de inicio rápido y el programa del software SmartMove vers. 1.1). Toda emisión de la muestra fue recogida entonces por el objetivo y se transmitió a través del espejo dicroico y pudo aislarse espectralmente según el filtro de emisión utilizado. La luz puede ser dirigida a la cámara CCD, espectrómetro de fibra óptica (USB 2000, Ocean Optics) o el PMT refrigerado, como se ilustra en la Figura 2.

La principal característica de este tipo de microscopio es que no tiene una lámpara de Xe de alta intensidad asociada con el microscopio de oxígeno singlete. Esta es una gran limitación del sistema, ya que nos impide la obtención de imágenes fluorescentes del fotosensibilizador o del uso de muchos ensayos fluorescentes para determinar la condición de la célula tratada. Sin embargo, la cámara CCD en este microscopio es muy sensible y puede, en algunos casos, tomar imágenes fluorescentes cuando se utiliza la lámpara de tungsteno-como fuente de excitación. Otra desventaja es la limitación temporal de la viabilidad de las células examinadas en el microscopio de oxígeno singlete (14). Por lo tanto, este microscopio se utiliza sólo para detectar fosforescencia a 1275nm.

Por otro lado, el microscopio que se ha utilizado en los ensayos de la viabilidad celular fue diseñado especialmente y tiene dos entradas traseras, una para una lámpara de Xe y otra para el láser (es decir, los haces respectivos entran en el microscopio a diferentes alturas). Además, el microscopio posee una incubadora adaptada. Estas características le la posibilidad de investigar diferentes aspectos de la respuesta de las células, es decir

apoptosis a la acción fotodinámica espacialmente controlada mediante ensayos de diagnóstico por imágenes (es decir, ensayos fluorescentes). Otra característica de este microscopio en comparación con el microscopio de oxígeno singlete es que el-puerto lateral no está ocupado por un PMT. En su lugar, el-puerto lateral puede utilizarse para acoplar un espectrómetro de fibra y permite el registro resuelto en el tiempo de espectros de emisión de cualquier colorante incubado en una célula en cualquier banda de irradiación.

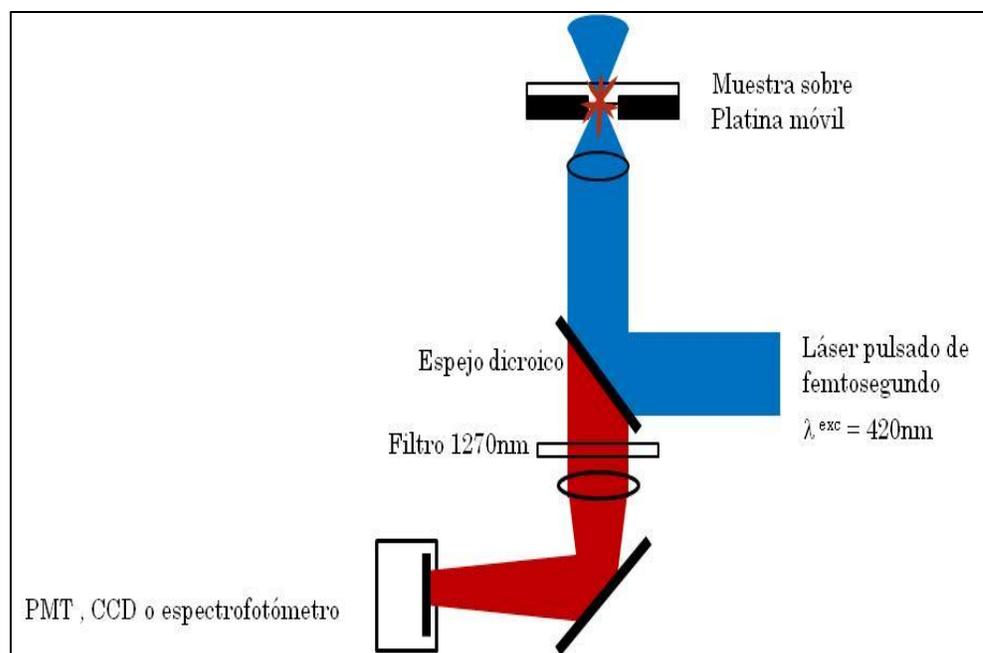


FIGURA2:Figura simplificada que ilustra la ruta de luz dentro de los microscopios utilizados. La luz del láser es reflejada por un espejo dicroico y se centra en la muestra por el objetivo del microscopio. Cualquier luz emitida por la muestra se transmite entonces por el mismo espejo dicroico y se recoge selectivamente usando un filtro de paso de banda antes de llegar a la cámara CCD, el espectrómetro de fibra óptica, o el PMT refrigerado. En el caso que no se utilice como Microscopio de oxígeno singlete, los filtros de emisión y excitación son otros. Adaptado de : J.W. Snyder et al., Acc. Chem. Res. 2004, 37, 894-901.

PMT

Uno de los detectores ópticos unidos al microscopio de oxígeno singlete es un fotomultiplicador de tubo de IR cercano (PMT, de Hamamatsu modelo R5509-42, operado a -80°C , con un tiempo de subida de 3 ns). Debido a que la respuesta espectral del PMT cubre el rango de ~ 400 hasta 1500 nm, la fosforescencia del oxígeno singlete, y la fluorescencia y fosforescencia del sensibilizador pueden controlarse fácilmente con este detector mediante el uso de diferentes filtros de interferencia. La salida del PMT es enviada a un amplificador (Stanford modelo de Investigación de

Sistemas de preamplificador 445) y luego es recibida por contador de fotones (MSA300) de Becker Hickl que opera en modo multiescala.

Detección del oxígeno singlete a nivel de una sola célula

La fosforescencia del oxígeno singlete puede detectarse a nivel de una sola célula usando el microscopio de oxígeno singlete del COMI. Estos experimentos se realizan normalmente en las células HeLa adherentes. Dado que el tiempo de vida del oxígeno singlete es dependiente del disolvente, es necesario el intercambio del H_2O intracelular por D_2O para aumentar la intensidad de fosforescencia a 1275 nm de oxígeno singlete. Esto se hace mediante la eliminación de los medios de crecimiento de las células y enjuagando 3 veces en medio ABM preparado con D_2O . Las células se exponen a continuación a una solución hipertónica en D_2O \sim 5 min para facilitar la difusión en H_2O intracelular al medio extracelular. Las células se lavan después 3 veces con ABM/ D_2O y se dejan en ABM/ D_2O , incorporando así D_2O en las células. El fotosensibilizador puede (I) ser incorporado en esta etapa y las células se colocan en la incubadora durante una cantidad de tiempo dada o (II) ya haber sido incubado en el medio de crecimiento y se lleva a cabo el choque osmótico inmediatamente antes del experimento.

Detección de oxígeno singlete en suspensiones celulares

La detección de la fosforescencia de oxígeno singlete a partir de suspensiones de células se realizó preferentemente usando las células no adherentes HL-60. Sin embargo, si se utilizan células HeLa adherentes en suspensión, éstas deben ser previamente tripsinadas. El fotosensibilizador puede ser incorporado en las células por cualquiera de las formas de incubación en (I) los medios de crecimiento normales o (II) en ABM/ D_2O .

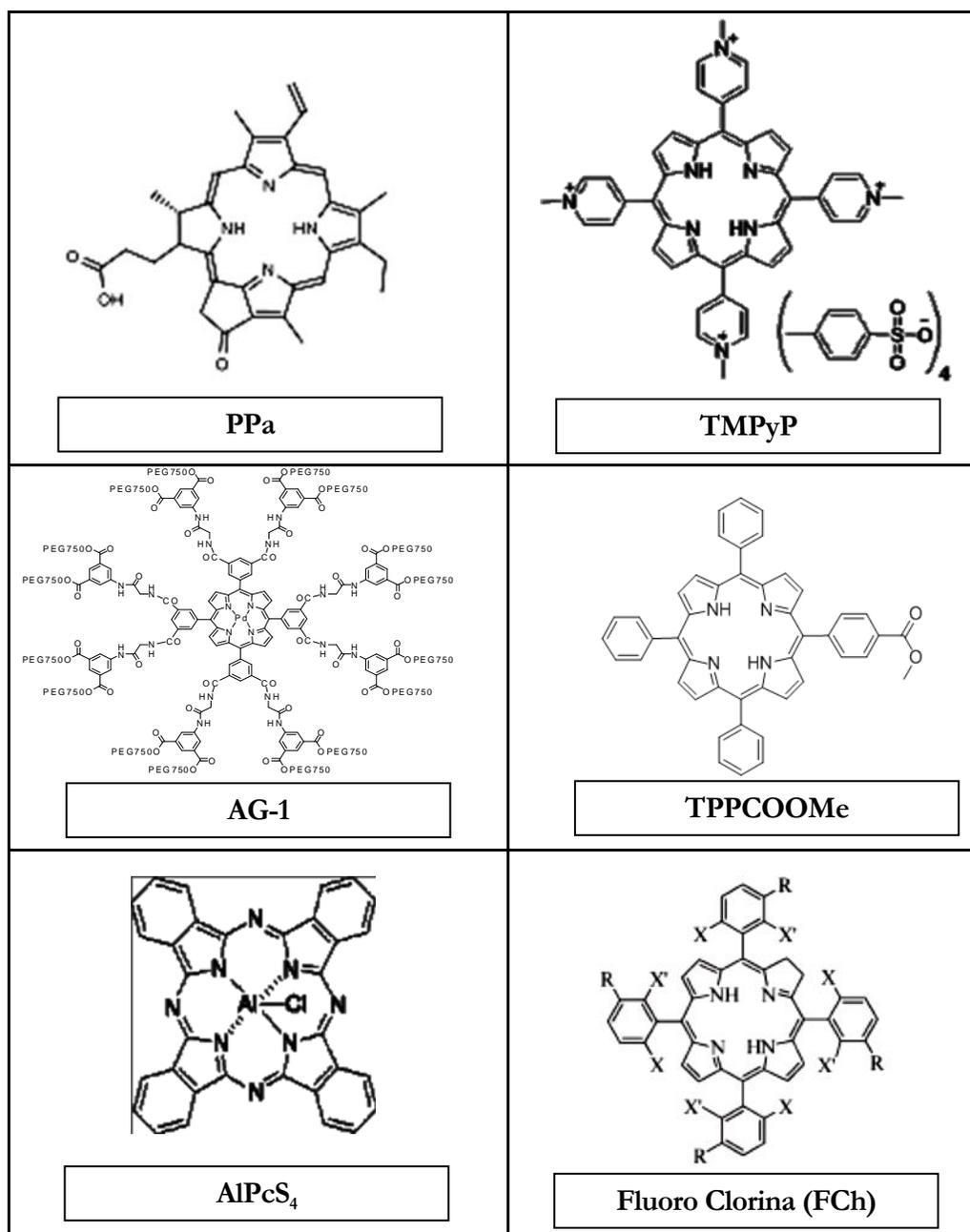
Incubación del fotosensibilizador en medio de crecimiento normal: Se añadió una concentración de trabajo determinada del fotosensibilizador al medio de crecimiento normal y las células fueron incubadas durante el tiempo deseado. Después de la incubación las células se centrifugaron (1.000 rpm, 2 min) y el medio fue removido. Para llevar a cabo el intercambio $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, las células se resuspendieron en una solución hipertónica en D_2O \sim 5 min, se centrifugaron y se lavaron dos veces en medio de tonicidad normal ABM/ D_2O y finalmente se resuspendieron en ABM/ D_2O . Para la realización de experimentos en H_2O , por supuesto, las células no fueron expuestas a una solución hipertónica. El resto del procedimiento se realizó de manera similar. Por último, la muestra de trabajo se colocó en una cubeta de cuarzo de 1 cm a una concentración de \sim 1 millón de células por mL. La cubeta se colocó a

continuación en el sistema de acoplamiento que se usa para irradiación en cubeta (Figura 1) antes del experimento.

Incubación del fotosensibilizador en medio ABM/D₂O: El choque osmótico se llevó a cabo en las células para intercambiar el H₂O intracelular con D₂O por el método ya descrito. A continuación, se añadió una concentración de trabajo deseada del fotosensibilizador a las células en ABM /D₂O y éstas se colocaron a continuación en la incubadora durante la cantidad de tiempo deseada. Después de la incubación, las células se centrifugaron (1.000 rpm, 2 min) y se lavaron dos veces en ABM/ D₂O y se resuspendieron en ABM /D₂O. Por último, la muestra de trabajo se colocó en una cubeta de cuarzo de 1 cm a una concentración de ~ 1 millón de células por mL. La cubeta luego se colocó en la configuración de acoplamiento.

Sensibilizadores empleados y condiciones de irradiación:

La estructura de los diferentes sensibilizadores empleados en esta parte del trabajo de tesis, así como las condiciones de irradiación en cada caso, se presentan a continuación en el Esquema 1 y en la Tabla 1, respectivamente.



ESQUEMA 1: Estructura de los fotosensibilizadores utilizados en el presente trabajo.

<i>Sensibilizador</i>	<i>Naturaleza</i>	<i>Concentración</i>	<i>Excitación</i>	<i>Potencia del Láser en células indiv.</i>	<i>Potencia del Láser en Suspensiones celulares</i>	<i>Tiempo de irradiación</i>
<i>AlPcS₄</i>	<i>Hidrofílico</i>	<i>20μM</i>	<i>675nm</i>	<i>1mW</i> <i>+ filtro ND2</i>	<i>1mW</i>	<i>3min</i>
<i>AG-1</i>	<i>Hidrofílico</i>	<i>10μM</i>	<i>420nm</i>	<i>1mW</i> <i>+ filtro ND2</i>	<i>1mW</i>	<i>3min</i>
<i>TMPyP</i>	<i>Hidrofílico</i>	<i>10μM</i>	<i>420nm</i>	<i>1mW</i> <i>+ filtro ND2</i>	<i>1mW</i>	<i>3min</i>
<i>PPa</i>	<i>Hidrofóbico</i>	<i>20μM</i>	<i>675nm</i>	<i>1mW</i> <i>+ filtro ND2</i>	<i>1mW</i>	<i>3min</i>
<i>FCb</i>	<i>Hidrofóbico</i>	<i>50μM</i>	<i>650nm</i>	<i>2mW</i> <i>+ filtro ND2</i>	<i>3.5mW</i>	<i>3min</i>
<i>TDFPCM (clorina)</i>	<i>Hidrofóbico</i>	<i>20μM</i>	<i>650nm</i>	<i>1mW</i> <i>+ filtro ND2</i>	<i>1mW</i>	<i>3min</i>

TABLA 1: Condiciones de irradiación empleadas en los experimentos de detección de oxígeno singlete resuelto en el tiempo para los diferentes sensibilizadores empleados.

Resultados

Los resultados de experimentos de fosforescencia resueltos en el tiempo utilizando sensibilizadores hidrofílicos e hidrofóbicos se muestran en la Tabla 2. Los experimentos en células individuales se realizaron con células adherentes HeLa, mientras que los experimentos de células en suspensión se realizaron utilizando células no diferenciadas HL-60. Los datos mostrados reflejan los promedios de experimentos independientes ($n > 5$, en cada caso). Teniendo en cuenta las observaciones anteriormente encontradas acerca de las dificultades que aparecen en el registro de estos datos cinéticos, (2, 4, 7) se listan los valores relativos para el tiempo de vida medio del oxígeno singlete, $\tau_{\Delta_{rel}}$. En particular, para evitar complicar con detalles acerca de los efectos durante el transcurso de la irradiación se optó por reducir la información pertinente para el parámetro, $\tau_{\Delta_{rel}}$ obtenido a partir de un ajuste mono-exponencial de la señal de decaimiento de la señal de fosforescencia del oxígeno singlete resuelta en el tiempo de células incubadas en D_2O . Así, los datos registrados para un sensibilizador dado irradiado a una potencia de láser incidente por un cierto tiempo se muestran en forma comparativa en la Tabla 2.

Los experimentos con β -caroteno se realizaron primero usando células incubadas con bajos niveles de β -caroteno (es decir, $< 15 \mu M$ en el medio de cultivo). Frente a la ausencia de cualquier efecto de agregación del β -caroteno observado en las trazas cinéticas bajo estas condiciones, se repitieron los experimentos utilizando células incubadas con una mayor (y potencialmente tóxica) concentración de $25 \mu M$ para β -caroteno. En estas últimas condiciones, sin embargo, siempre se registraron datos de las células cuyas imágenes de campo brillante no mostraron signos evidentes de muerte. De todas formas, los datos cinéticos que se adquieren de las células con signos evidentes de muerte no deberían afectar sensiblemente nuestras conclusiones con respecto a la capacidad de β -caroteno para desactivar o no al oxígeno singlete (5,7).

Además, se realizaron otras pruebas para apoyar nuestras conclusiones sobre el efecto de β -caroteno, las cuales incluyeron la adición de albúmina de suero bovino, BSA, y azida de sodio, NaN_3 , al medio extracelular. La BSA es una proteína que desactiva eficazmente al oxígeno singlete (13). Sin embargo, con las células y las condiciones en que se realizaron los experimentos, la BSA permanece en el medio extracelular (4, 7, 13). Por lo tanto, un cambio en el tiempo de vida del oxígeno singlete después de la adición de BSA, indica la presencia de éste en el medio extracelular. Esto último podría ocurrir como consecuencia de la difusión a través de la membrana celular del oxígeno singlete producido intracelularmente y/o del propio sensibilizador. La NaN_3 es también un inhibidor eficaz del oxígeno singlete que atraviesa fácilmente la membrana celular y desactiva al oxígeno singlete intracelular (5, 7, 13). Además, aunque la NaN_3 puede ser citotóxica durante largos períodos de exposición, durante el transcurso de los presentes experimentos no hubo evidencia de citotoxicidad.

Sensibilizador	Condiciones	$\tau_{\Delta rel} / \mu s$ (Célula suspensión)	$\tau_{\Delta rel} / \mu s$ (Célula individual)
Hidrofóbico			
PPa	Sólo sensibilizador	18.8 ± 1.2	15.2 ± 1.7
	+ BSA	19.5 ± 1.1^a	16.9 ± 2.1
	+ NaN ₃	4.0 ± 2^b	7.0 ± 0.9
	+ BSA + NaN ₃	9.1 ± 0.3	n/d
	+ β -Carotene	32 ± 4	16 ± 2
	+ β -Carotene + BSA	21 ± 2	17.2 ± 1.6
	+ β -Carotene + NaN ₃	10 ± 5	6.3 ± 0.7
FCh	Sólo sensibilizador	20 ± 1	19.1 ± 0.4
	+ BSA	19 ± 2	n/d
	+ NaN ₃	n/d	14.0 ± 0.7
	+ β -Carotene	24 ± 5	21.6 ± 0.7
	+ β -Carotene + BSA	17 ± 1	n/d
	+ β -Carotene + NaN ₃	9 ± 4	15.5 ± 0.6
	+ β -Carotene + BSA + NaN ₃	3.3 ± 0.5	n/d
Hidrofílico			
AlPcS ₄	Sólo sensibilizador	29.4 ± 2.8	33.6 ± 2.4
	+ BSA	13.3 ± 0.9	36 ± 6
	+ NaN ₃	4 ± 1^c	n/d
	+ BSA + NaN ₃	n/d	23 ± 2
	+ β -Carotene	36.8 ± 1.3	30.5 ± 1.7
	+ β -Carotene + BSA	14 ± 1	32.7 ± 2.5
	+ β -Carotene + BSA + NaN ₃	12.9 ± 0.8	26.8 ± 2.5

En todos los casos, [BSA] = 2 mM. (b) En todos los casos, [NaN₃] = 2 mM, excepto en los experimentos indicados. (c) [NaN₃] = 0,1 M. (n/d): no determinado.

TABLA 2: Valores relativos de tiempo de vida del oxígeno singlete ($\tau_{\Delta rel}$) obtenidos bajo una variedad de condiciones en experimentos realizados con células individuales (HeLa) y suspensiones de células (HL-60).

Incluso se ha propuesto que es capaz de brindar protección contra los efectos citotóxicos a corto plazo del oxígeno singlete (15). Aunque la NaN_3 es hidrofílica, sus efectos pueden, sin embargo, verse también cuando se usan sensibilizadores hidrofóbicos; ya que puede interactuar con el oxígeno singlete que difunde desde dominios hidrofóbicos hacia dominios hidrofílicos, y también es probable que penetre una pequeña distancia en la región interfacial que delimita a los dominios hidrofóbicos (5, 7).

Se utilizaron dos fotosensibilizadores hidrofóbicos diferentes: un pirofeoforbido (PPa) y una fluoroclorina (FCh) (Ver Esquema1 con todos los sensibilizadores utilizados). Se esperaba entonces, que dado que el oxígeno singlete es hidrofóbico y además se produce en los dominios lipofílicos, tuviésemos la mejor oportunidad de observar un efecto en el tiempo de vida del oxígeno singlete frente al agregado de β -caroteno, también hidrofóbico.

Los datos con NaN_3 indican que, frente a estos sensibilizadores, existe una población de oxígeno singlete que puede ser desactivada por la adición del inhibidor. Los datos obtenidos frente a BSA indican que el sensibilizador permanece dentro de la célula durante el transcurso del experimento. Esta observación es consistente con los resultados observados previamente en literatura utilizando sensibilizadores hidrofóbicos (7). Sin embargo, los resultados obtenidos con BSA y β -caroteno sugieren que el β -caroteno añadido puede promover la relocalización del sensibilizador de tal manera que puede producirse una población extracelular de oxígeno singlete mayor. Específicamente, tras la adición de β -caroteno en el estudio en suspensiones celulares, se observa un tiempo de vida de oxígeno singlete mayor, que, a su vez, es susceptible a la adición de BSA. La observación más importante, sin embargo, es la clara ausencia de un acortamiento en el tiempo de vida del oxígeno singlete después de la adición de β -caroteno. Este efecto se evidencia aún más en los experimentos de células individuales en donde la señal de fosforescencia de oxígeno singlete no está influenciada por el oxígeno singlete extracelular.

Los datos obtenidos con una ftalocianina de aluminio (AlPcS_4) como sensibilizador hidrofílico, dan resultados complementarios. Específicamente, aunque la adición de BSA y NaN_3 claramente causan una disminución en el tiempo de vida del oxígeno singlete, la presencia de β -caroteno no lo hace. El efecto de la BSA observado en el estudio en suspensiones celulares es consistente con los resultados independientes que muestran que los sensibilizadores hidrofílicos pueden difundir fácilmente fuera de una célula hacia el medio extracelular (7).

También es importante señalar que el valor registrado de $\tau_{\Delta \text{rel}}$ usando AlPcS_4 en los experimentos realizados con células individuales en D_2O ($\sim 35 \mu\text{s}$) es sensiblemente

más largo que el registrado usando los sensibilizadores lipofílicos (~ 15 a $20 \mu\text{s}$). Como ya se ha establecido en estudios anteriores, los experimentos de células individuales son menos sensibles a los efectos del oxígeno singlete extracelular. Por lo que, como se examinó en trabajos de bibliografía, (5, 7,8) los presentes datos en células individuales, de hecho reflejan las diferencias en el grado en que la irradiación de un sensibilizador dado perturba a una célula y que, en el caso de un sensibilizador hidrofílico, se están registrando datos a partir de células que están "más muertas", entendiéndose con esta expresión células con menor actividad metabólica.

En concreto, tienden a observarse tiempos de vida del oxígeno singlete más largos en células que se están muriendo o están muertas (7).

En una segunda instancia cualitativa, se hizo uso de un sensibilizador dendrímico, derivado de una porfirina de paladio, el cual no es capaz de ingresar a las células debido a su gran tamaño por la presencia de grupos monoetoxipolietilén glicol periféricos. Este es el que denominamos AG-1 (ver Esquema 1) y fue sintetizado y caracterizado por Lebedev y col. (16) y se llevó a Dinamarca por un colaborador del laboratorio COMI.

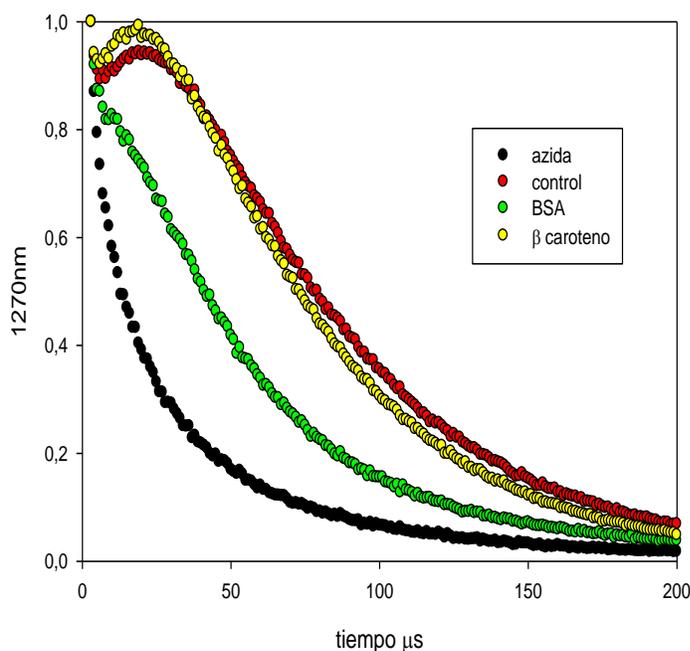
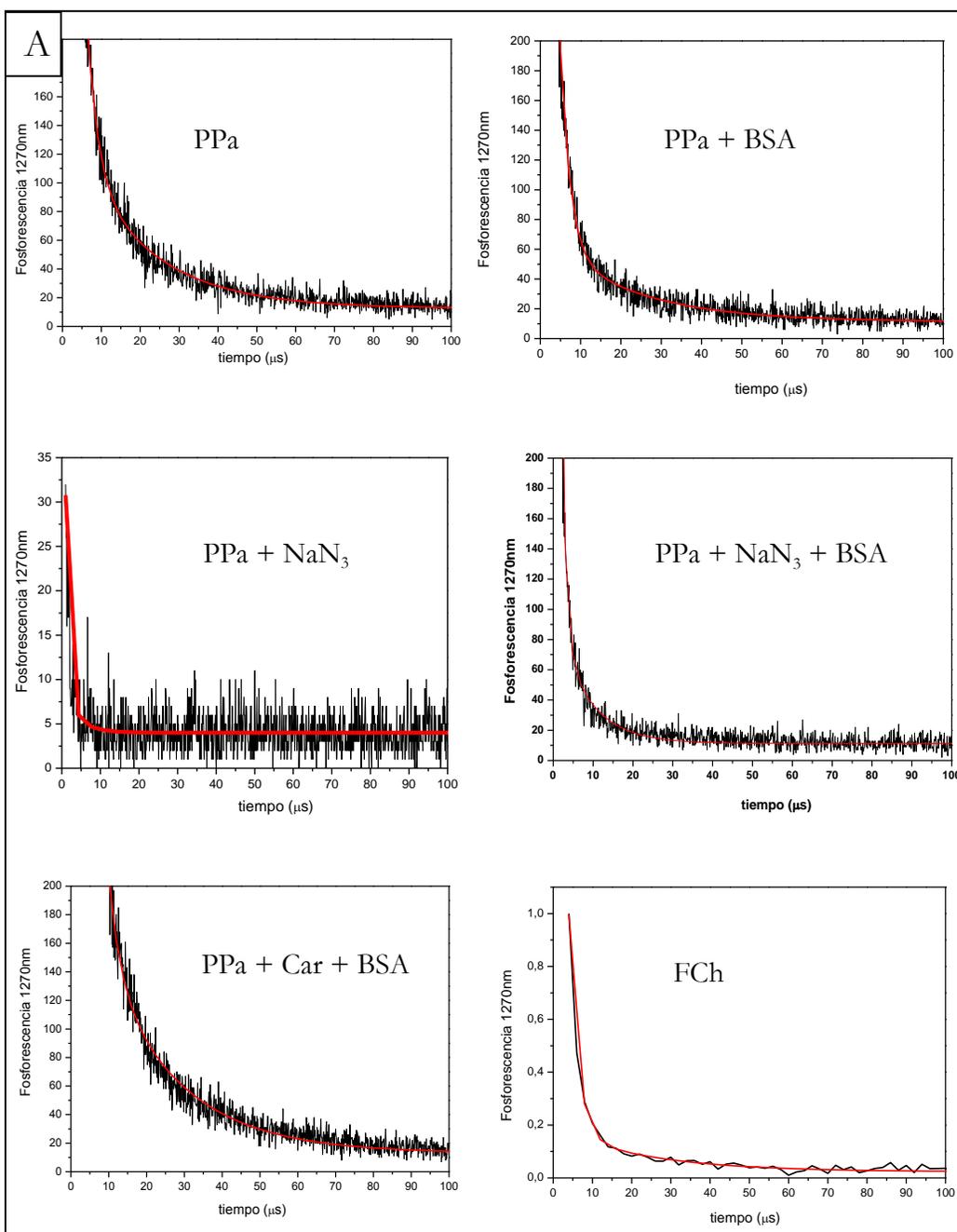


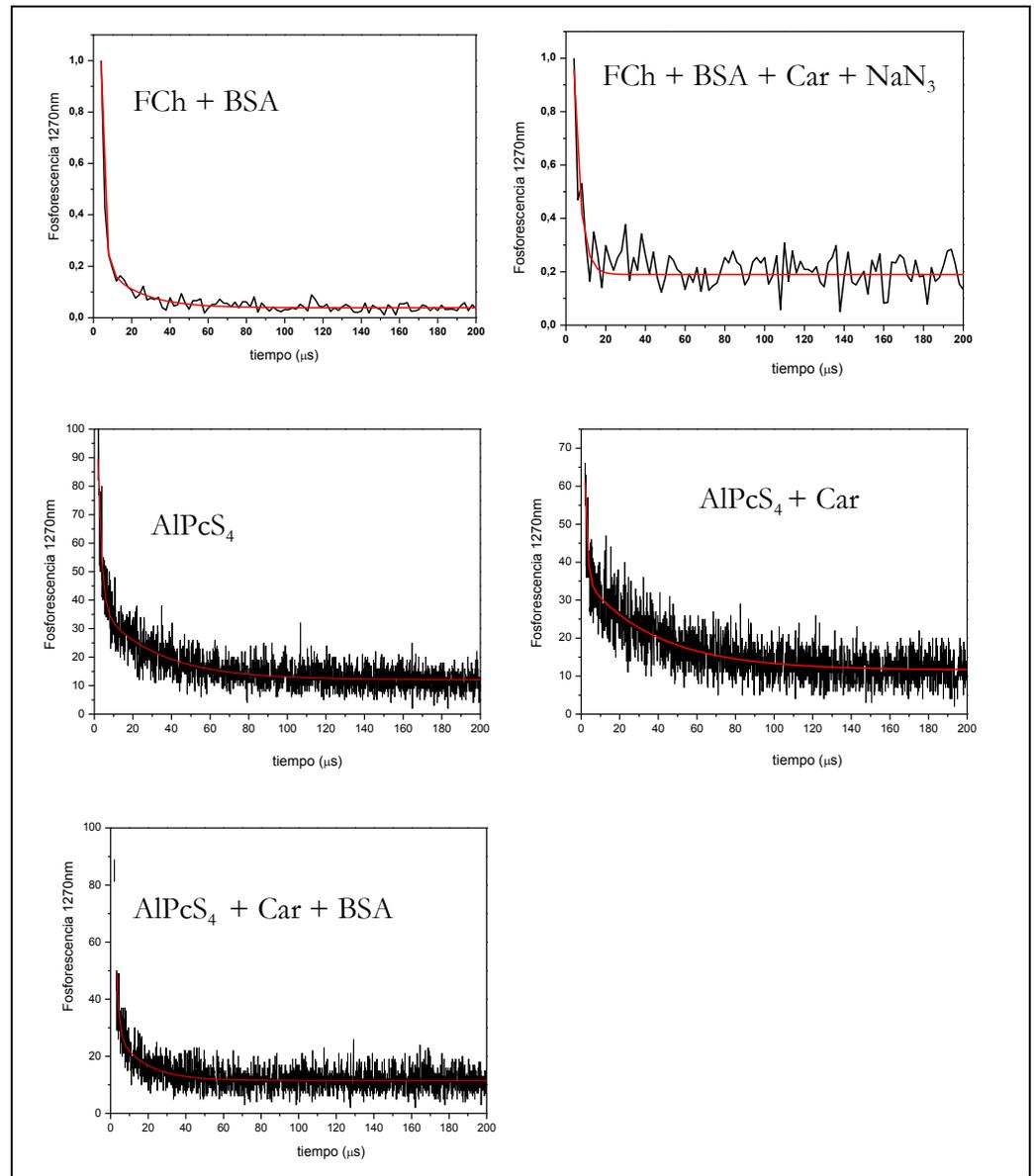
FIGURA3: Fosforescencia a 1275nm de oxígeno singlete en suspensiones de células HL-60, incubadas en presencia del sensibilizador AG-1 (●), en presencia de b-caroteno (●), BSA (●) y azida sódica (●).

Cuando AG-1 se emplea como sensibilizador extracelular, el β -caroteno no es capaz de desactivar al oxígeno singlete. Sin embargo, la azida (desactivador hidrofílico) y la BSA, que se sabe que están presentes en todo el medio que rodea a las células (4, 7, 13), sí

logran acortar los tiempos de vida de fosforescencia. Estos resultados son una evidencia más de que el β -caroteno se sitúa principalmente dentro de las células (Figura 3).

Las trazas de decaimiento de oxígeno singlete adquiridas por fosforescencia, fueron del orden de 500. Sólo algunas de ellas se ilustran en la Figura 4.





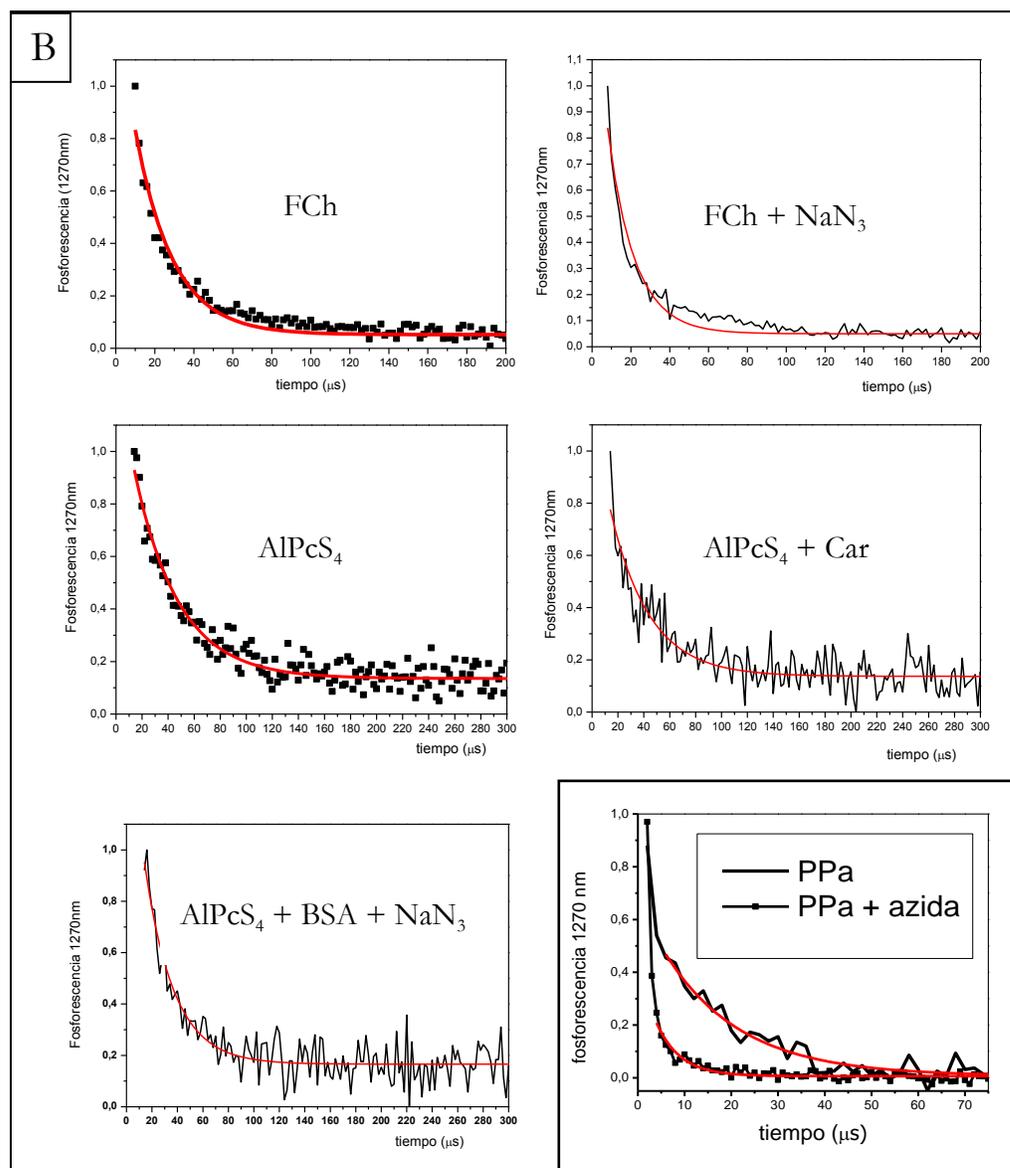


FIGURA4: Ejemplos de trazas de fosforescencia de oxígeno singlete $\text{O}_2 (^1\Delta_g) \rightarrow \text{O}_2 (g\Sigma X_3)$ con resolución temporal observadas en el microscopio de oxígeno singlete, de suspensiones de células (A) y de células individuales (B). La traza para el valor más largo de τ_{AREL} ($\sim 15 \mu\text{s}$) se obtuvo a partir de una célula individual control incubada (previo intercambio del H_2O intracelular por D_2O) con el sensibilizador PPa, sin la adición de inactivadores extrínsecos, mientras que la traza obtenida con el valor más corto de τ_{AREL} ($\sim 7 \mu\text{s}$) se obtuvo de células que se incubaron con adición de NaN_3 . Estas últimas trazas se muestran en forma superpuesta en el recuadro final de la Figura 4 B). También se muestran los ajustes exponenciales simples que producen τ_{AREL} . En todos los casos, los datos registrados en presencia de β -caroteno fueron idénticos a los obtenidos a partir de las células control.

También se hicieron ensayos de quenching de oxígeno singlete en suspensiones celulares haciendo uso del sensibilizador hidrofílico TMPyP (ampliamente usado en trabajos previos del grupo del Prof. Ogilby). Dado que la longitud de onda de irradiación fue de 420nm y se encuentra dentro del espectro de absorción de β -caroteno, es posible que la concentración efectiva de éste último se encuentre disminuida por blanqueamiento, no obstante estos experimentos sirven a modo control de los otros quenchers utilizados como azida y BSA. La Figura 5 muestra las trazas de decaimiento del oxígeno singlete a 1275nm con y sin β -caroteno 10 μ M en presencia de TMPyP como sensibilizador modelo incorporado dentro de las células.

Podemos ver que el β -caroteno no desactiva al oxígeno singlete. No obstante, azida y BSA lo hacen. Esto significa que la señal de oxígeno singlete proviene principalmente de dominios hidrófilos.

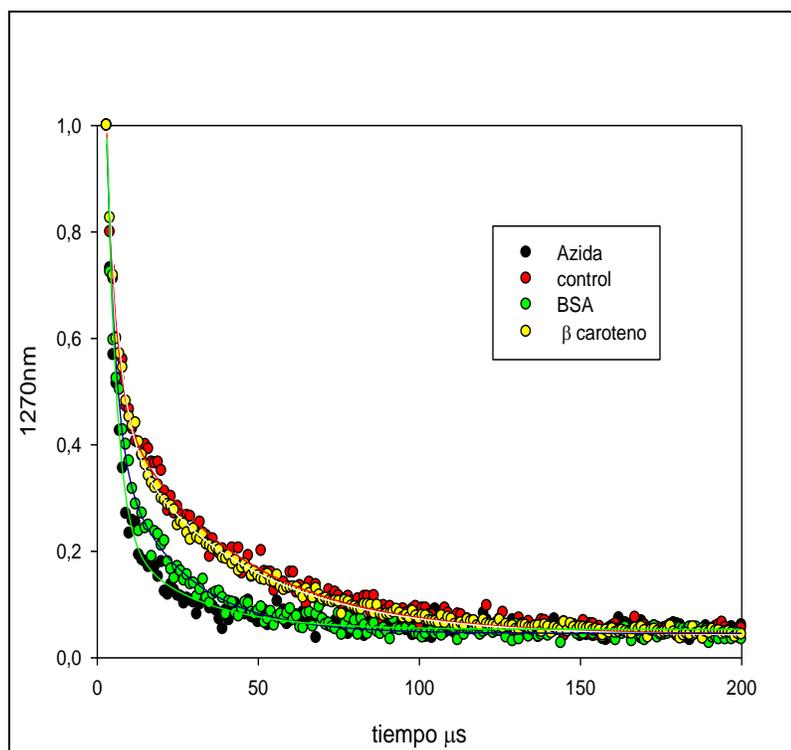


FIGURA 4: Señal de oxígeno singlete resuelto en el tiempo obtenida de suspensiones de células HeLa empleando: TMPyP en ausencia (\blacklozenge) y presencia de diferentes quenchers: β -caroteno (\blacklozenge); BSA (\blacklozenge); y NaN_3 (\blacklozenge).

Conclusiones

A pesar del uso de una variedad de sensibilizadores hidrófilos e hidrófobos, cada uno de los cuales se localiza en diferentes dominios intracelulares y permite diferentes distancias entre el sensibilizador y β -caroteno, nos encontramos con que el agregado de β -caroteno no tiene ningún efecto sobre el tiempo de vida intracelular de $O_2(a^1\Delta_g)$ tanto en células adherentes como en suspensión.

Aunque esta conclusión va en contra de las expectativas convencionales, es razonable dada la exigencia de una colisión entre $O_2(a^1\Delta_g)$ y β -caroteno en la interacción de quenching. En efecto, en los sistemas fotosintéticos naturales, la protección ejercida por carotenoides viene dada por la ubicación de éstos juiciosamente colocados inmediatamente adyacentes a las antenas que absorben la luz y que producen $O_2(a^1\Delta_g)$, por lo tanto estos cromóforos logran evitar su difusión (4,7).

Sin embargo, a pesar de que no se observa quenching de $O_2(a^1\Delta_g)$ por β -caroteno en células mamíferas, hay literatura suficiente que reporta sus efectos fotoprotectivos. Por lo que, el β -caroteno intracelular podría ejercer su acción antioxidante a través de una reacción que no involucre directamente a $O_2(a^1\Delta_g)$. Esta observación nos condujo a realizar los experimentos que se presentan en los próximos capítulos.

Referencias

- (1) Schweitzer, C.; Schmidt, R. *Chem. Rev.* 2003, 103, 1685–1757.
- (2) Ogilby, P. R. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 3181–3209.
- (3) Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 1995, 24, 663–1021.
- (4) Snyder, J. W.; Skovsen, E.; Lambert, J. D. C.; Poulsen, L.; Ogilby, P. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006, 8, 4280–4293.
- (5) Kuimova, M. K.; Yahioglu, G.; Ogilby, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 332–340.
- (6) Gollmer A., Besostri F., Breitenbach T. & Ogilby P. R. *F. Rad. Res.* 2013, 47, 718-730.
- (7) Silva, E. F. F.; Pedersen, B. W.; Breitenbach, T.; Toftegaard, R.; Kuimova, M. K.; Arnaut, L. G.; Ogilby, P. R. *J. Phys. Chem. B* 2012, 116, 445–461.
- (8) Kuimova, M. K.; Botchway, S. W.; Parker, A. W.; Balaz, M.; Collins, H. A.; Anderson, H. L.; Suhling, K.; Ogilby, P. R. *Nat. Chem.* 2009, 1, 69–73.
- (9) Pedersen, B. W.; Breitenbach, T.; Redmond, R. W.; Ogilby, P. R. *F. Rad. Res.* 2010, 44, 1383–1397.
- (10) Arnbjerg, J., M. Johnsen, P.K. Frederiksen, S.E. Braslavsky, and P.R. Ogilby, *The J. Phys. Chem. A.* 2006, 110, 7375-7385.
- (11) Skovsen, E., Snyder J.W., and Ogilby P.R. *Photochem. Photobiol.* 2006, 82, 1187-1197.
- (12) Frederiksen, P.K., McIlroy S.P., Nielsen C.B., Nikolajsen L., Skovsen E., Jørgensen M., Mikkelsen K.V., and Ogilby P.R. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 127, 255-269.
- (13) Loza-Alvarez P., University of St. Andrews, North Haugh, St. Andrews, Scotland, 2000, Chap. 3.
- (14) Skovsen, E., Snyder J.W., Lambert J.D.C., and Ogilby P.R. *J. Phys. Chem. B.* 2005, 109, 8570-8573.
- (15) Hatz, S., J.D.C. Lambert, and P.R. Ogilby, *Photochem. Photobiol. Sc.* 2007, 6, 1106-1116.

- (16) Lebedev A. Y., Cheprakov A. V., Boas D. A. In *Acs App. Mat. & Interf.* 2009, 1, 1292-1304.
- (17) McDermott, G.; Prince, S. M.; Freer, A. A.; Hawthornthwaite-Lawless, A. M.; Papiz, M. Z.; Cogdell, R. J.; Isaacs, N. W. *Nature.* 1995, 374, 517–521.

Otro Quencher: MitoQ₁₀

Existen razones de peso para pensar que nunca se hallará una explicación darwiniana de los mecanismos de la vida.

Michael Behe

Dentro de las células, las mitocondrias pueden ser una fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a su vez, blanco de daño oxidativo durante el estrés oxidativo. Cuando la producción de ROS excede la capacidad de desintoxicación y vías de reparación, se produce daño oxidativo a proteínas, ADN, y fosfolípidos, interrumpiendo la fosforilación oxidativa mitocondrial lo que lleva a daño y muerte celular (1,2).

En este contexto, estudios anteriores (3) sobre el efecto de la terapia fotodinámica (TFD) con rojo Mitotracker (MR) como un fotosensibilizador específico de mitocondrias en las células HeLa, mostraron que el MR produce tanto oxígeno singlete como anión superóxido bajo fotoactivación y causa la fotoinactivación de canales de gramicidina en un sistema modelo (bicapa lipídica plana). El antioxidante, específico de mitocondrias 10-(6'-ubiquinolil) (MitoQ₁₀, ver Esquema 1), inhibe este efecto, así como la acumulación de ROS, la que es acelerada por los inhibidores de la cadena respiratoria (piericidin, rotenona y myxothiazol). La TFD causa la necrosis y se impide por MitoQ₁₀, mientras que la apoptosis causada por H₂O₂ se ve aumentada por los inhibidores de la respiración y suprimida por MitoQ₁₀. Por lo tanto, el mecanismo de acción de MitoQ₁₀, podría implicar la desactivación de oxígeno singlete.

MitoQ₁₀ ha sido utilizado para prevenir el daño oxidativo mitocondrial y para inferir la participación de especies reactivas del oxígeno mitocondrial en las vías de señalización durante la apoptosis (4).

La actividad redox del dominio ubiquinona de la estructura de la molécula de MitoQ₁₀ le permite actuar como un portador de electrones móviles en la membrana mitocondrial interna donde se reduce a un ubiquinol por varias deshidrogenasas unidas a la membrana y luego es oxidado nuevamente a una ubiquinona por el complejo III. Por otra parte, la forma reducida ubiquinol de la coenzima Q10 (CoQ₁₀) tiene una

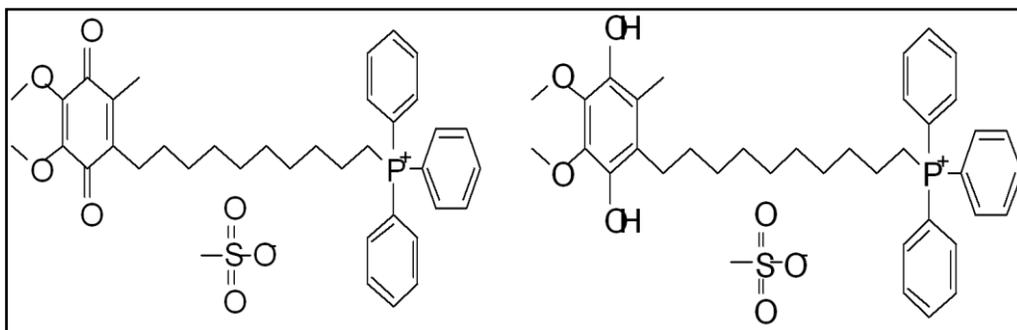
importante función de protección en la cadena antioxidante, como interruptor de la peroxidación lipídica en bicapas de fosfolípidos (5, 6).

Los cationes lipofílicos, tales como los alquiltrifenilfosfonio, debido a su carga positiva se acumulan varios cientos de veces en el interior de la membrana mitocondrial debido al potencial de membrana aumentando así la protección de la mitocondria al daño oxidativo (7, 8). El uso de cationes de trifenilfosfonio tiene las siguientes implicancias: i) La concentración estacionaria de cationes lipofílicos en el interior hidrofóbico de la membrana es despreciable. Esto está respaldado por su muy baja solubilidad en ciclohexano, un compuesto que se usa para simular la baja constante dieléctrica del centro hidrofóbico de la membrana (9); ii) el grado en que estos compuestos penetran en la membrana está determinado por la longitud de la cadena alquílica (10,11). Estas propiedades han sido utilizadas en la construcción de la molécula de MitoQ₁₀ (ver Esquema1) mediante la unión covalente de una ubiquinona al catión trifenilfosfonio lipófilo (TPP). Se logró así la generación de una ubiquinona específica, que se acumula selectivamente en mitocondrias aisladas, y dentro de las mitocondrias de células in vivo (8, 12, 13).

Por esta razón, en este trabajo se ha elegido MitoQ₁₀ como un ejemplo de una sonda molecular complementaria de β-caroteno, en el cual se ha centrado la presente tesis.

En primer lugar, se midieron las constantes de desactivación de oxígeno singlete por MitoQ₁₀ en sus dos formas: oxidado y reducido (ver Esquema 1), debido a que en la cadena respiratoria, dado el balance redox establecido en las células, MitoQ₁₀ se encuentra mayormente incorporado en su forma reducida. En segundo término se determinó el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete de la forma oxidada de MitoQ₁₀.

Por otra parte se hicieron experimentos de irradiación bifotónica para evaluar el posible efecto fotoprotectivo de MitoQ₁₀.



ESQUEMA 1: Estructura del MitoQ₁₀ (oxidado, izquierda) y MitoQ₁₀H₂ (reducido, derecha). Biochem. J. (2008) 411 (633–645)

Materiales y métodos

Microscopía de excitación bifotónica:

El sistema láser (Mai Tai, Spectra-Physics/Newport, Santa Clara, CA) consiste en dos láseres, uno de onda continua (cw) bombeado por diodo y otro en modo de bloqueo Ti: Sapphire (láser pulsado). El láser bombeado por diodo es de doble frecuencia, de estado sólido a 532 nm (Nd: YVO4) (Millenia V, 5W; Spectra Physics / Newport) y se utiliza para bombear el láser Ti: Sapphire. El Tai Mai opera a una frecuencia de repetición de 80 MHz y proporciona pulsos de salida continuamente sintonizable con un ancho de pulso de <100 fs que pueden sintonizarse de 700 nm a 1020 nm. Un telescopio (Thorlabs) se inserta en la trayectoria del haz para expandirlo. La potencia del láser se ajusta girando una lámina de media onda (modelo WPH05M-780, Thorlabs) delante de un polarizador (Glan-Taylor, modelo GT-10, Thorlabs) y se mide con un medidor de potencia (Thermal Power Sensor, Modelo S302C, Thorlabs) (Ver Figura 1).

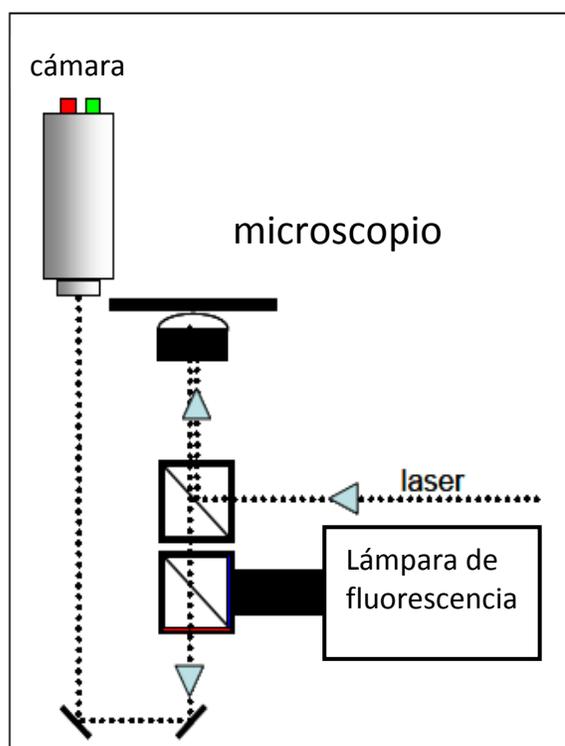


FIGURA 1: Esquema experimental del sistema óptico de irradiación bifotónica.

La salida del láser se dirige hacia un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX 71) y centrado (diámetro de ~ 1 micras, en la cintura del haz) usando un objetivo

60x de inmersión a una distancia de trabajo (~ 2 mm) (Olympus LUMPLFL60xW/IR / 0,90. Una cámara CCD (Evolución QEI controlada por software Image-Pro, Media Cybernetics) está acoplada al microscopio y se coloca en el plano de la imagen del microscopio. La posición del punto de láser puede determinarse mediante el uso de la cámara CCD. Una plataforma motorizada (Prior, modelo: CS152DP) y el controlador (Prior, ProScan II) se utilizan para mover las células en relación con el punto de láser. La lámpara de microscopio (Olympus, TH4-200) y un filtro de paso de banda a 700 nm (FWHM de 40 nm) se utilizan para la iluminación de campo brillante para evitar el daño inducido por la luz a las células. Una lámpara estacionaria de Xe (Exfo, X-cite serie 120) se utiliza para irradiar toda la célula y sus alrededores para imágenes de fluorescencia. Ver Figura 1.

Protocolo de irradiación bifotónica de las células en la plataforma del microscopio para determinar la posición del punto focal del láser en el campo de visión del microscopio:

La potencia media del láser se redujo mediante la inserción de un filtro de densidad neutra (Thorlabs) y el haz enfocado sobre la parte inferior de una placa de vidrio. La célula diana y la localización deseada en la célula para la irradiación se mueve sobre la posición de la mancha focal del láser moviendo la platina del microscopio. Se ha utilizado una potencia del haz de láser de 5 mW, y una irradiación a 800 nm. En general, debe tenerse en cuenta que la potencia media del haz de láser, medida antes de entrar en el microscopio es superior a la correspondiente en la platina del microscopio, y que $\sim 44\%$ de la potencia media que se transmite a través del objetivo llega a la muestra.

Elección y condiciones del sensibilizador:

Se buscó la utilización de un sensibilizador de localización mitocondrial ya que el quencher a probar es específico de mitocondria. Se utilizó el precursor de la protoporfirina IX (PPIX), el ácido 5-amino levulínico (ALA) el cual es transformado a sensibilizador dentro de la mitocondria. Este se incorporó en las células disolviéndolo en el medio de cultivo.

Para la preparación de la muestra (5-ALA, Fluka) se disolvió en PBS para dar una solución stock 1 M y se almacenó en un refrigerador a 4 °C hasta su uso.

Las células HeLa se incubaron con 1 mM de ALA en medio de crecimiento normal durante 4 horas en una placa de cultivo celular en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con ABM y se transfirieron a una cubeta especial de base de vidrio (LabTek, VWR) para imágenes de fluorescencia. Todos los experimentos se realizaron con ABM preparado en H₂O.

Del mismo modo, se eligieron en una segunda etapa, los sensibilizadores PPa (hidrofóbico) y TMPyP (hidrofílico), en concentraciones 20 μM y 10 μM , respectivamente. Los resultados fueron contrarrestados con los de PPIX.

Formación de imágenes de la fluorescencia de los colorantes

Para los experimentos de dosimetría, la emisión de fluorescencia debida a la excitación bifotónica la protoporfirina IX, (PPIX), en las células, se detectó usando un filtro de paso de banda a 650 nm (FWHM de 40 nm) con la cámara CCD. Para las imágenes, se utilizó una aplicación de integración dinámica del software Image Pro 6, el tiempo de adquisición fue ajustado a 30 s y el tiempo de exposición del láser fue de 30 min.

La serie de imágenes que se presentan en la Figura 4 se basan en la integración secuencial restando el fondo de un área de no-fluorescencia. La fluorescencia de PPIX en la célula entera fue fotografiada con una excitación a 425 nm (FWHM de 40 nm) y la longitud de onda de emisión de 650 nm (FWHM de 40 nm). La fluorescencia de PPa de las células se controló con una excitación a 425 nm (FWHM de 40 nm) y una emisión de 655 nm (FWHM de 40 nm), mientras que para TMPyP la excitación fue la misma que para PPa pero la emisión fue de 660 nm (FWHM de 50nm). Todos los experimentos se realizaron en atmósfera saturada en aire. Después del tratamiento fotodinámico, las células se mantuvieron en la platina del microscopio a temperatura ambiente durante el curso del experimento, durante un máximo de 30 min.

Resultados

En primer lugar se determinaron dos parámetros fotofísicos que no habían sido medidos en ningún trabajo previo: la constante de quenching de oxígeno singlete y a su vez la eficiencia cuántica de producción de éste por parte de MitoQ₁₀ en su forma oxidada (mitoquinona), ya que esta especie podría estar involucrada en los posibles mecanismos de protección durante tratamientos fotodinámicos. Previamente se había hallado que el MitoQH₂ era un buen quencher de oxígeno singlete (Trabajo de Tesis de Brian Pedersen, 2011), con una constante de quenching $k_q = 1,98 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. En el presente trabajo se encontró que la forma oxidada posee una capacidad quencher un orden de magnitud inferior ($k_q = 1,04 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y que, a su vez, es un productor no despreciable de oxígeno singlete ($\Phi_\Delta = 0.03$) (Figuras 2 y 3).

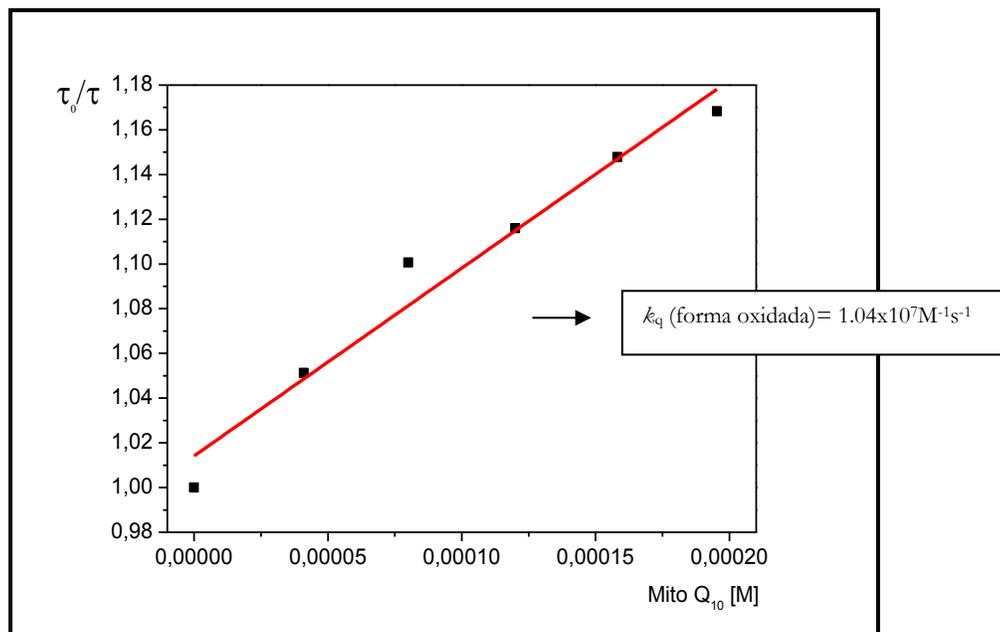


FIGURA 2: Determinación de la constante de quenching k_q para la forma oxidada de MitoQ₁₀.

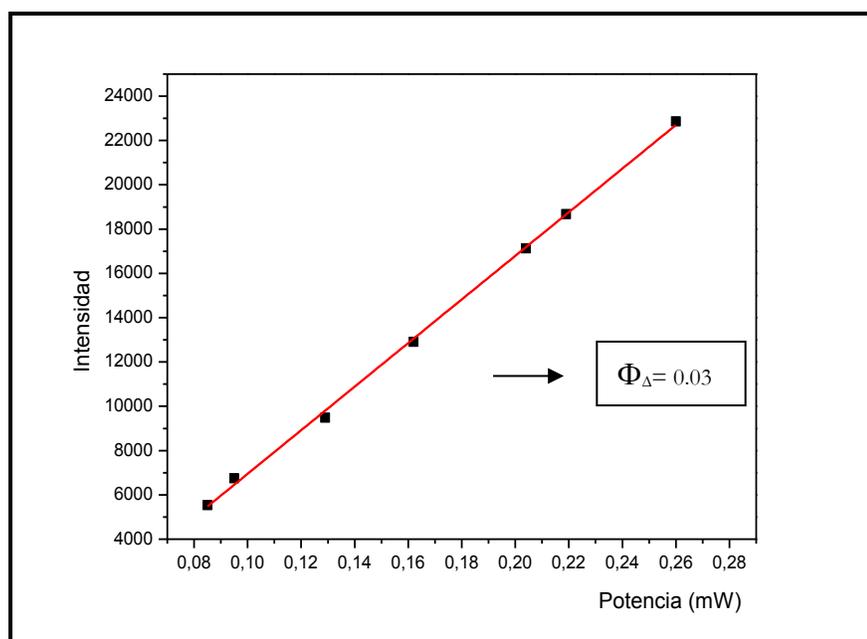


FIGURA 3: Determinación de la eficiencia cuántica de generación de oxígeno singlete de MitoQ₁₀ (quinol) en acetonitrilo. $\lambda = 400 \text{ nm}$ Abs (MitoQ₁₀) = 0.107. Referencia PN en acetonitrilo ($\Phi_{\Delta}^{400 \text{ nm}} = 0.98 \pm 0.07$).

Estos resultados implican que si hay un efecto positivo de desactivación de oxígeno singlete por MitoQ, este se deberá principalmente a su forma reducida, la mitoquinona.

Irradiación bifotónica

La Figura 4 muestra en la imagen D que el sensibilizador PPIX tiende a acumularse en el sitio de la irradiación. Este fenómeno había sido observado en trabajos previos (14). El perfil de la intensidad de fluorescencia durante los 30 min de irradiación se muestra en la Figura 4C. El daño causado por el oxígeno singlete se manifiesta por una contracción y ruptura de estructuras citoplasmáticas en el sitio de irradiación (Figura 4B), pero se hace más evidente en la Figura 5B, donde se realizó una irradiación no localizada con la lámpara de fluorescencia en todo el campo óptico. De este modo se observa la formación masiva de burbujas en todas las células afectadas, así como también la pérdida total de la integridad celular. Al comparar el brillo fluorescente se hace evidente que también aparece un blanqueamiento del colorante cuando se utiliza la lámpara en lugar de la irradiación bifotónica.

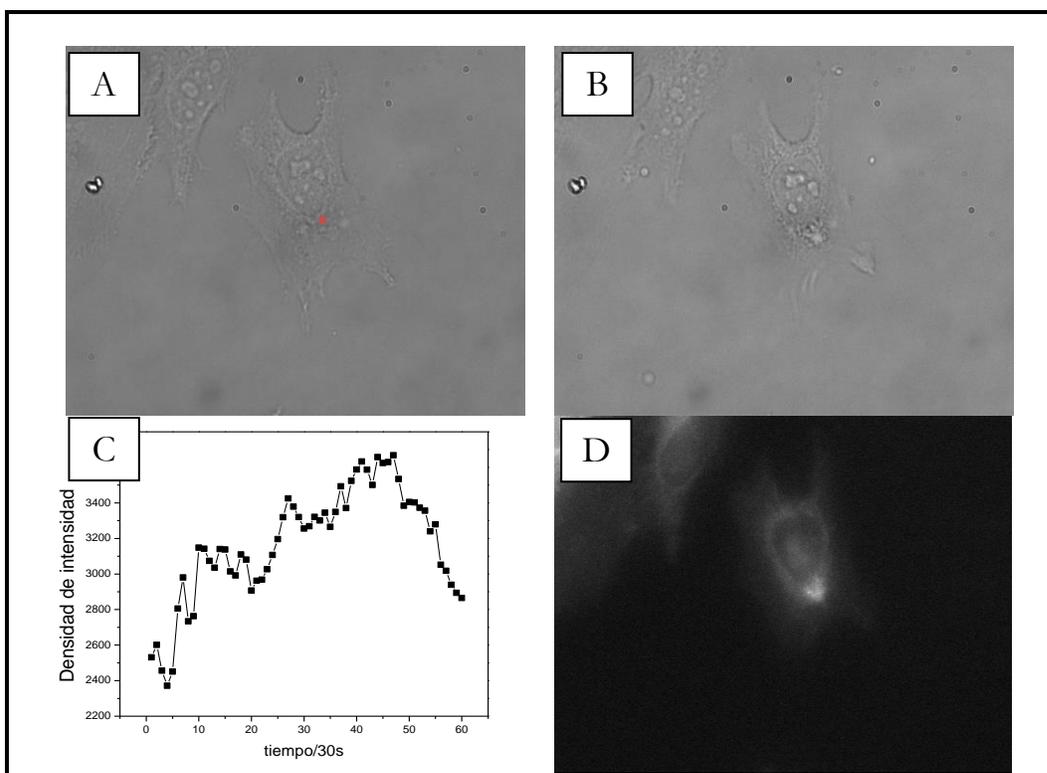


FIGURA 4: Imágenes de campo claro de células HeLa incubadas con ALA , antes (A) y después (B) de la irradiación bifotónica en el sitio indicado con un punto rojo. El gráfico del recuadro C muestra la evolución temporal de la emisión de PPIX, mientras que en el recuadro D se observa la fluorescencia luego de la irradiación.

Cuando probamos el quencher MitoQ₁₀ solo, no observamos daño citotóxico en las imágenes de campo claro, después de irradiar las células, tanto con lámpara (Figura 6)

como con irradiación bifotónica (Figura 7A y 7B). El perfil de emisión observado, debido a la fluorescencia inducida por láser durante los 30 minutos de irradiación, se mantiene en rangos de baja intensidad y sin aparente modificación (Figura 7C). Por otra parte, no se observa fluorescencia con los filtros usados en los ajustes para detectar emisión de PPIX.

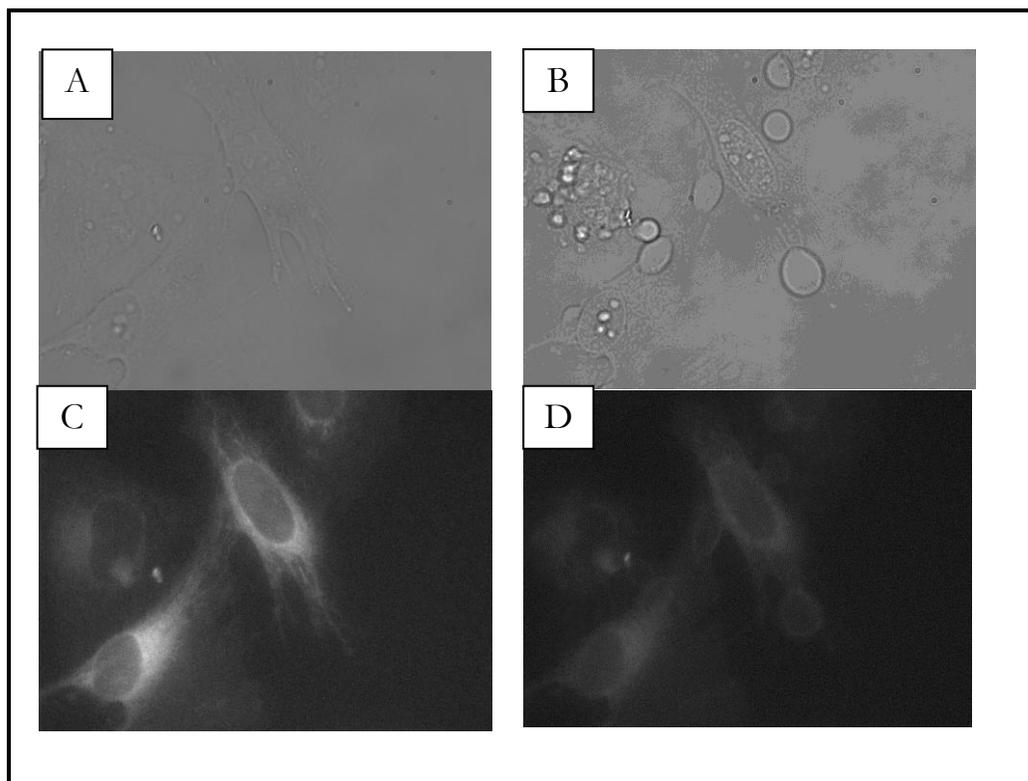


FIGURA 5: Imágenes de campo claro de células HeLa incubadas con ALA, antes (A) y después (B) de la irradiación con lámpara sin resolución espacial. Las figuras C y D corresponden respectivamente, a la emisión de PPIX en las mismas células antes y después de la irradiación.

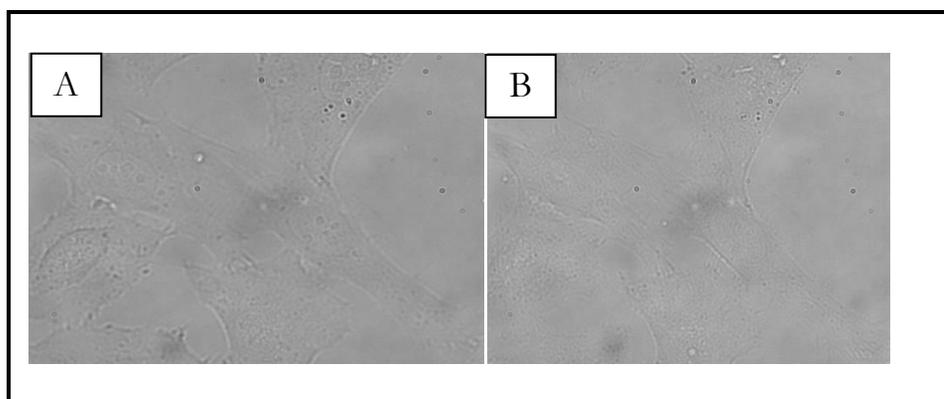


FIGURA 6: Imágenes de campo claro antes (A) y después (B) de la irradiación no localizada de Mito Q₁₀.

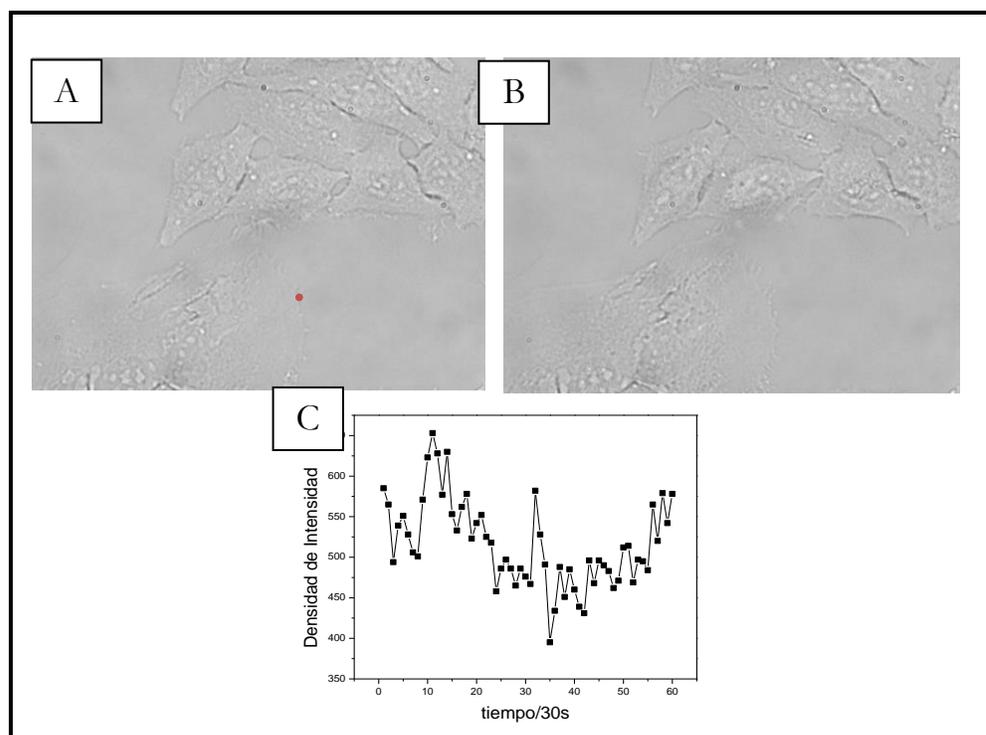


FIGURA 7: Imágenes de campo claro antes (A) y después (B) de la irradiación bifotónica de Mito Q_{10} en el sitio indicado con el punto rojo. El recuadro C muestra la evolución temporal de la fluorescencia de Mito Q_{10} inducida por el láser.

Por último, las células se incubaron con ALA (4h) y después del lavado, con Mito Q_{10} (30 min.). En este caso no hubo una fotoprotección por Mito Q_{10} frente a la irradiación tanto con lámpara como bifotónica (Figuras 8 y 9, respectivamente). El blanqueo dado para el sensibilizador fue incluso mucho mayor, hasta su desaparición, en el sitio de la irradiación bifotónica. Posiblemente el hecho de que PPIX colocaliza con Mito Q_{10} hizo expulsar hacia afuera de las mitocondrias a PPIX y/o Mito Q_{10} , o bien, éste nunca logró integrarse a la membrana mitocondrial.

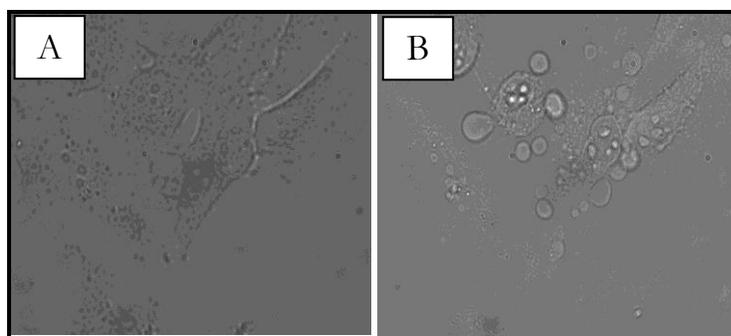


FIGURA 8: Imágenes de campo claro de células HeLa incubadas con ALA y Mito Q_{10} , antes (A) y después (B) de irradiación con lámpara.

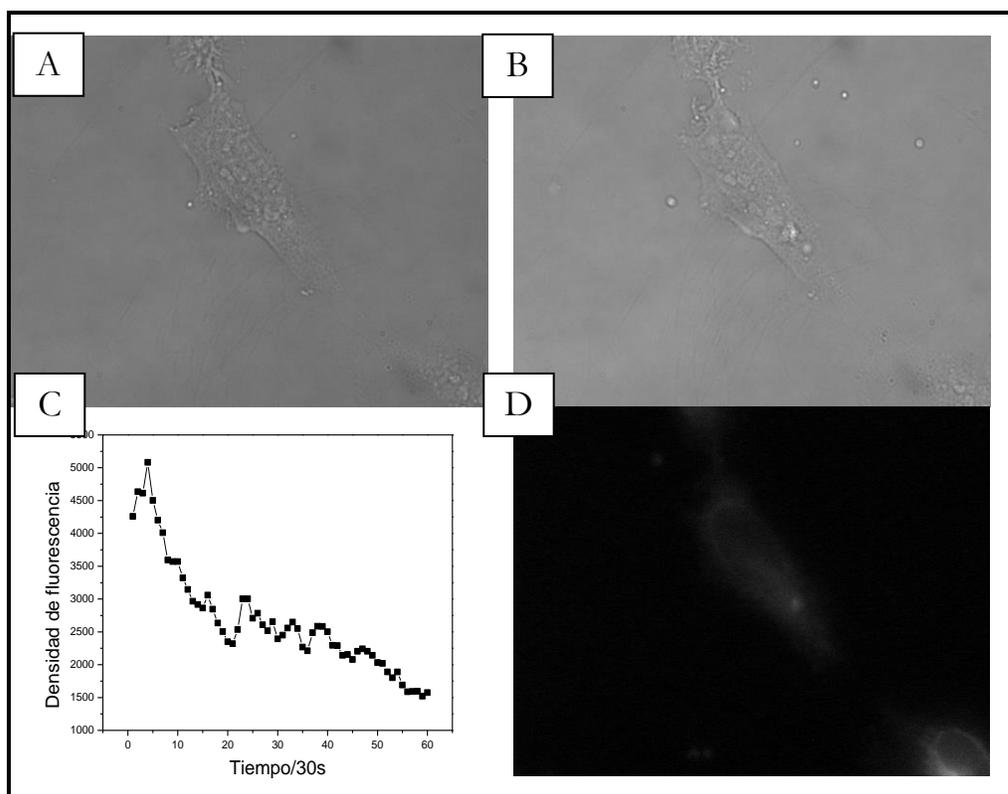


FIGURA 9: Imágenes de campo de células HeLa incubadas con ALA y Mito Q_{10} , antes (A) y después (B) de irradiación bifotónica. C: perfil de fluorescencia inducida por láser en el sitio de irradiación. D: Imagen de fluorescencia luego de la irradiación.

En la Figura 10, se muestran los resultados de un experimento similar al de la Figura 9, pero realizando la irradiación con lámpara y tomando fotografías de fluorescencia cada 30 s. Luego, se integra la intensidad de fluorescencia en áreas semejantes de 3 dominios subcelulares diferentes: zona mitocondrial (perinuclear), núcleo y citoplasma, con el objeto de analizar el blanqueo que sufre el sensibilizador. La Figura 10C muestra la variación temporal de la intensidad en las distintas zonas.

Podemos observar que aún a largos tiempos de irradiación el sensibilizador sigue acumulado en mitocondrias, como es de esperarse. La disminución de la intensidad de emisión es mayor en mitocondrias (mayor pendiente en la curva de decaimiento de intensidad de fluorescencia vs. tiempo) (Figura 10 C), a tiempos tempranos (los primeros 10 min). Esto puede ser un indicio de que Mito Q_{10} efectivamente está desplazando de su sitio a PPIX que migra a otros entornos celulares.

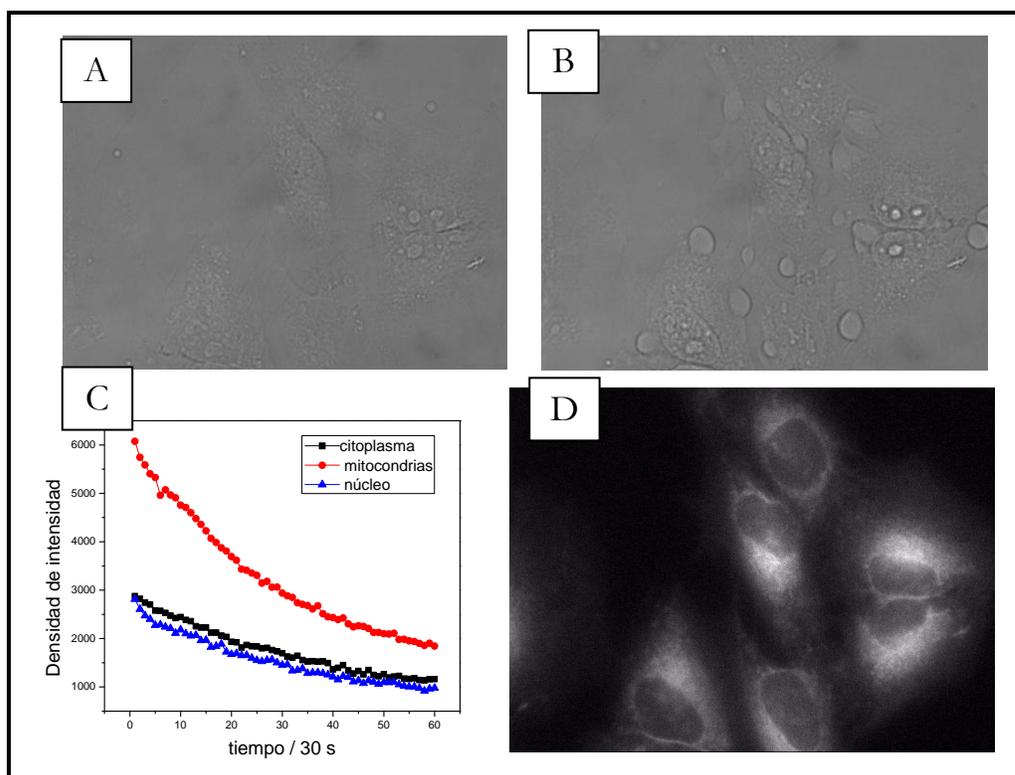


FIGURA 10: A), B) y D), se muestran imágenes de campo claro antes y después de la irradiación y de fluorescencia luego de 30 min de irradiación, respectivamente. C) Análisis de blanqueo del sensibilizador PPIX durante la irradiación con lámpara fluorescente en presencia de MitoQ₁₀, en diferentes dominios subcelulares: en rojo, zona de alta densidad de mitocondrias; negro, zona nuclear y azul, región citoplasmática. En los recuadros

Adicionalmente, se realizó una extracción de mitocondrias según protocolo del kit para aislamiento de mitocondrias: *Thermo Scientific Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells*, método que utiliza la centrifugación diferencial para separar las fracciones mitocondrial y citosólica de células incubadas durante 30 min, y 3h con MitoQ₁₀ y durante 30 min con MitoQ₁₀, posterior a la incubación con ALA habitual. Luego se registraron los espectros de absorción de estas muestras, tomando el máximo a 275 nm para el MitoQ₁₀ reducido ($\epsilon = 1,04 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (8), forma presente en la membrana mitocondrial, y normalizando el valor por número de células de cada muestra, se llegó a cuantificar la concentración de MitoQ₁₀H₂ incorporado a la membrana mitocondrial. Los espectros se muestran en la Figura 11.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de MitoQ₁₀H₂, muestran que el tiempo de incubación óptimo en nuestras condiciones experimentales, es de 30 min, mientras que en el caso de la coincubación con ALA, la porfirina PPIX está compitiendo con MitoQ₁₀H₂ por los sitios de unión en la membrana mitocondrial. Esto también se

confirma con el hecho de no observar efecto sobre las células irradiadas que contienen PPIX y MitoQ₁₀.

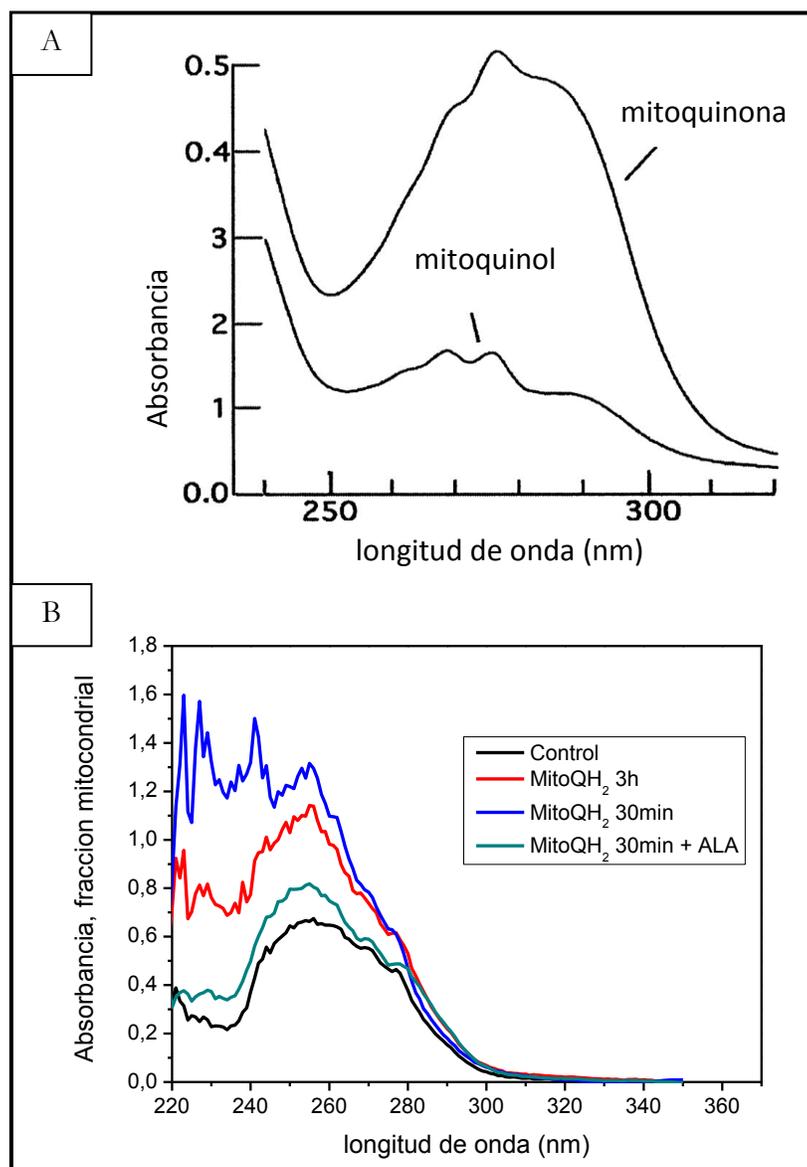


FIGURA 11:A) Espectros UV-visible de MitoQ₁₀ oxidado (mitoquinona) y MitoQ₁₀ reducido (mitoquinol). Kelso G F et al. J. Biol. Chem. 2001; 276:4588-4596. B) Espectros de absorción para extractos de mitocondrias de células HeLa incubadas con MitoQ₁₀ durante 30 min (azul), 3h (rojo), 30 min luego de la incubación con ALA (verde) y control (negro) correspondiente a las quinonas endógenas, principalmente.

En última instancia, se evaluó el uso de sensibilizadores de localización extra-mitocondrial: el PPa (hidrofóbico) y el TMPyP (hidrofílico), para ver hasta qué punto el MitoQ₁₀ sería capaz de desactivar al oxígeno singlete, una vez que éste se produce y difunde. (Figuras 12 a 15).

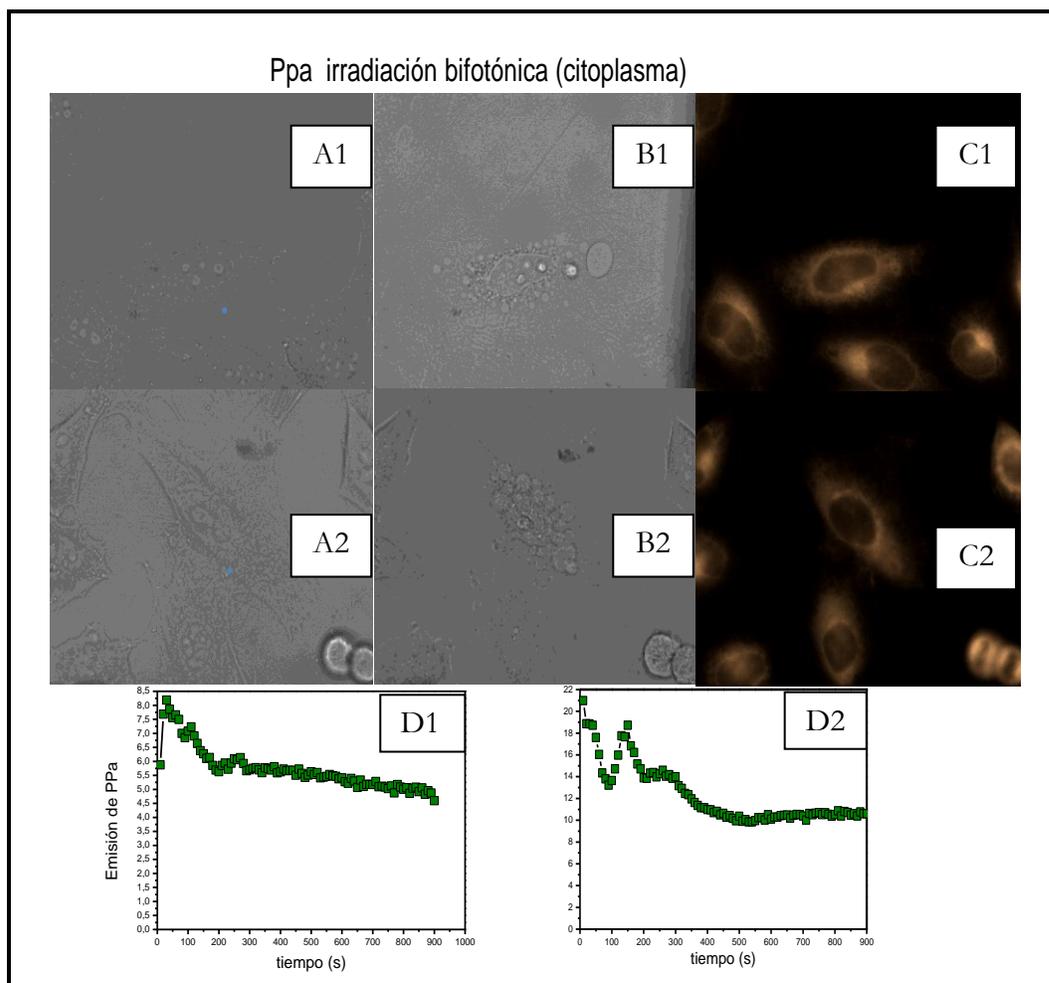


FIGURA 12: En los recuadros A), B) y C), se muestran imágenes de campo claro antes y después de la irradiación y de fluorescencia luego de 30 min de irradiación, respectivamente para dos ejemplos de células HeLa 1) y 2). Recuadros D1) y D2): perfil temporal de la emisión de PPa inducida por irradiación bifotónica (en el citoplasma, según se muestra con el punto celeste) del sensibilizador PPa durante 30 min de tratamiento en ausencia de MitoQ₁₀ para dos ejemplos de células. 1) y 2).

Del análisis de estos experimentos llegamos a la conclusión que no se ve efecto fotoprotectivo alguno, por parte de MitoQ₁₀ frente a la utilización del sensibilizador PPa. La capacidad quencher de oxígeno singlete demostrada para MitoQ₁₀ en solución no se condice con los datos experimentales observados. El oxígeno singlete producido por PPa en dominios citoplasmáticos, principalmente y

en otras estructuras membranosas internas de la célula (donde se localiza PPa), no es alcanzado por el quencher y parece iniciar la cadena fotooxidativa antes de lograr un efecto fotoprotectivo.

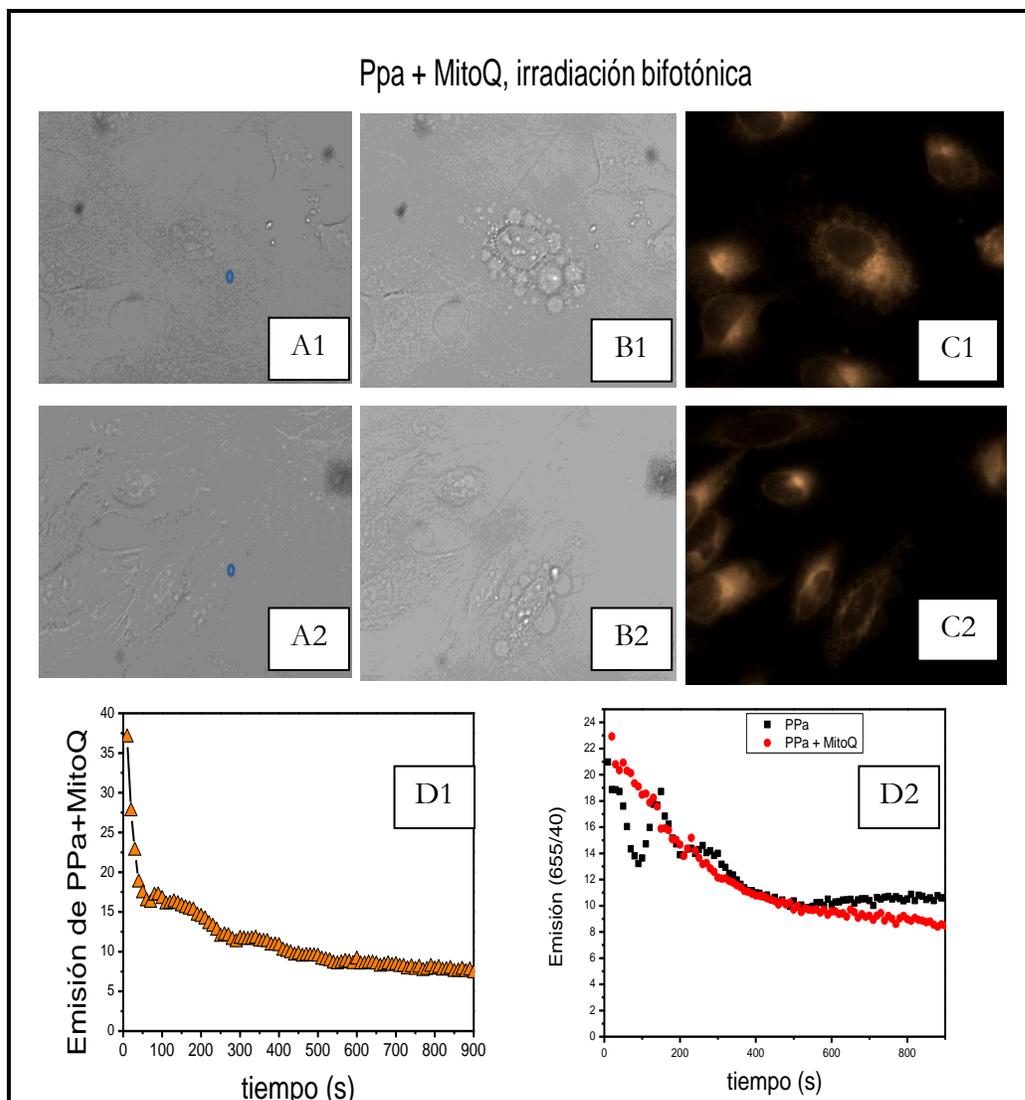


FIGURA 13: En los recuadros A), B) y C), se muestran imágenes de campo claro antes y después de la irradiación y de fluorescencia luego de 30 min de irradiación, respectivamente para dos ejemplos de células HeLa 1) y 2). Recuadros D1) y D2): perfil temporal de la emisión de PPa inducida por irradiación bifotónica (en el citoplasma, según se muestra con el punto celeste) del sensibilizador PPa durante 30 min de tratamiento en ausencia de Mito Q y la comparación en ausencia de Mito Q, respectivamente..

Cuando se utiliza TMPyP como sensibilizador hidrofílico, éste se localiza tanto en citoplasma como en núcleo pero durante la terapia fotodinámica se va concentrando principalmente en el núcleo celular. Este fenómeno ya había sido

observado en trabajos anteriores del grupo del Prof. Ogilby. En la Figura 14, en ausencia de MitoQ₁₀, se demuestra esto tanto cuando se irradia en un dominio nuclear como citoplásmico. La degradación del sensibilizador es despreciable durante el tiempo de irradiación y el daño celular se evidencia en las imágenes de campo claro por la aparición de granulación citoplasmática y nuclear refringente como en la visualización nítida de la membrana perinuclear (no observable en células sanas).

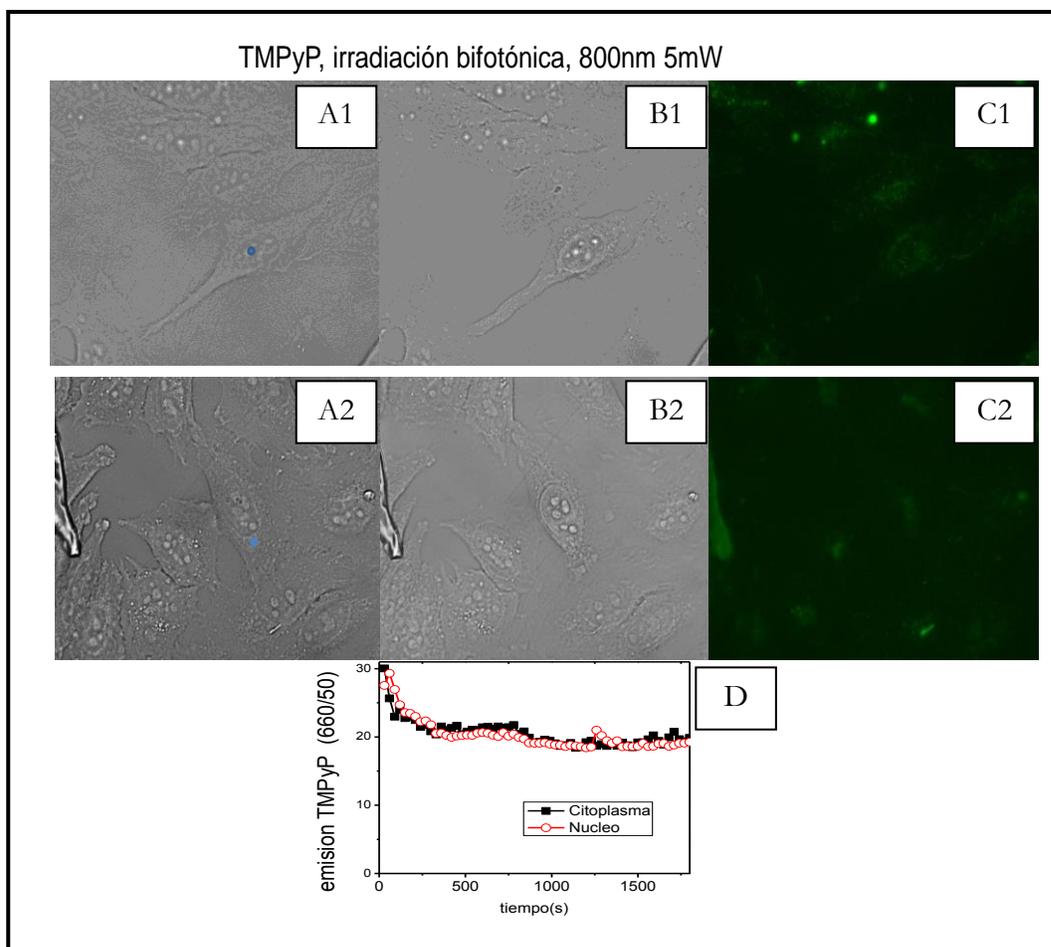


FIGURA 14: En los recuadros A), B) y C), se muestran imágenes de campo claro de células HeLa incubadas con TMPyP antes y después de la irradiación y de fluorescencia luego de 30 min de irradiación, respectivamente, para dos ejemplos de células irradiadas en el núcleo (1) y en el citoplasma (2). Recuadro D): perfil temporal de la emisión de TMPyP inducida por irradiación bifotónica (en el citoplasma, con puntos negros y en el núcleo, con puntos rojos) durante 30 min de tratamiento en ausencia de MitoQ₁₀.

Al adicionar el quencher MitoQ₁₀, vemos que la integridad celular se mantiene en mayor medida frente al tratamiento fotodinámico con un sensibilizador hidrofílico como el TMPyP (Figura 15). Por otra parte, cuando se mide la intensidad de

emisión del sensibilizador en función del tiempo de irradiación, ésta aumenta en el núcleo en el comienzo de la irradiación, posiblemente en el lapso en que el MitoQ₁₀ logra proteger a la célula de la generación de oxígeno singlete, luego decae a los mismos niveles encontrados en citoplasma, pero el daño total producido, parece ser menor.

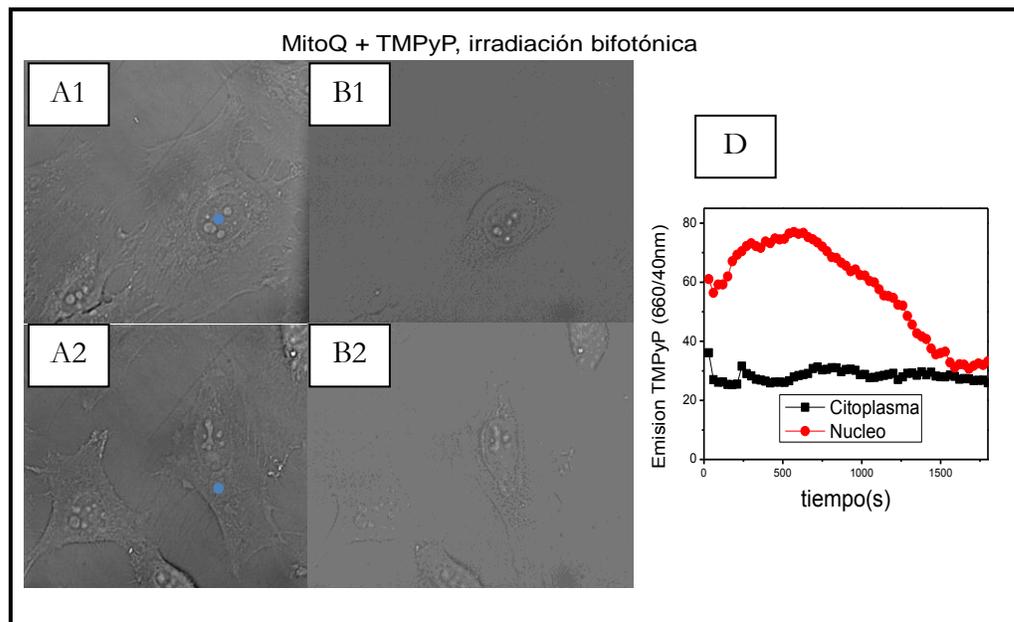


FIGURA 15: En los recuadros A) y B), se muestran imágenes de campo claro de células HeLa incubadas con TMPyP y MitoQ₁₀ antes y después de 30 min de irradiación en el sitio indicado con un punto celeste, respectivamente, para dos ejemplos de células irradiadas en el núcleo (1) y en el citoplasma (2). Recuadro D): perfil temporal de la emisión de TMPyP inducida por irradiación bifotónica (en el citoplasma, con puntos negros y en el núcleo, con puntos rojos).

Conclusiones

En el presente trabajo se encontró que la forma oxidada del MitoQ₁₀ posee una capacidad desactivadora de O₂(¹Δ_g) un orden de magnitud inferior ($k_q = 1,04 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a la reducida y que, a su vez, es un productor no despreciable de oxígeno singlete ($\Phi_\Delta = 0.03$).

Pusimos a prueba al antioxidante mitocondrial MitoQ₁₀ como modelo de quencher de oxígeno singlete por primera vez contra el daño fotodinámico de diferentes sensibilizadores co-localizados con él o no, dentro de la célula y realizando un tratamiento de irradiación bifotónica resuelta espacialmente en dominios subcelulares.

La eficacia de MitoQ₁₀ se vio contrarrestada por la hidrofobicidad competitiva tanto de PPIX como de PPa, la cual le permite su unión a la membrana mitocondrial, donde es capaz de pasar a la forma MitoQ₁₀H₂, de mayor capacidad tanto antioxidante como de quencher de oxígeno singlete.

Cuando el sensibilizador utilizado fue el TMPyP (hidrofílico), la citotoxicidad se vio disminuida, así el MitoQ₁₀H₂ anclado a la membrana mitocondrial lograría “ver” parte del oxígeno singlete que difunde hasta allí desde el lugar de su generación, explicándose de este modo su actividad antioxidante.

Referencias

- (1) Turrens, J. F. J. *Physiol.* 2003, 552, 335-344.
- (2) Duchen, M. R. *Mol. Aspects Med.* 2004, 25, 365-451.
- (3) Pletjushkina O. Y., Antonenko Y. N., Sakharov D. V., Wirtz K.W.A., Skulachev V. P. *Bioch. Biophys. Acta.* 2006, 1757, 525-534.
- (4) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007, 47, 629-656.
- (5) Frei, B., Kim, M. C., and Ames, B. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990, 87, 4879- 4883.
- (6) James, A. M., Smith, R. A., and Murphy, M. P. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004, 423, 47-56.
- (7) Murphy, M. P., and Smith, R. A. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, 41, 235-250.
- (8) Smith, R. A., Porteous, C. M., Gane, A. M., and Murphy, M. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 5407-5412.
- (9) Fleishaker J. Friedman C., H., and Pollock S. R. *Pharm. Res.* 1991, 8, 162-167.
- (10) Fickweiler S., Szeimies R.-M., Bäuml W., Steinbach P., Karrer S., Goetz A. E., Abels C., and Hofstädter F., J. *Photochem. Photobiol.* 1997, 38, 178-183.
- (11) Abels C., Karrer S., Bäuml W., Goetz A. E., Landthaler M., and Szeimies R. M. *Br J Cancer.* 1998, 77, 1021-1024.
- (12) Porteous C. M., Menon D. K., Aigbirhio F. I., Smith R. A., Murphy M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003, 100, 5407-5412.
- (13) Kelso G.F.; Porteous C.M.; Coulter C.V.; Hughes G.; Porteous W.K.; Ledgerwood E.C.; Smith R.A.; Murphy M.P. *J Biol Chem.* 2001, 276, 4588-4596.
- (14) Gollmer A., Besostri F., Breitenbach T. & Ogilby P. R., *F. Rad. Res.* 2013, 47, 718-730.



Estudios de citotoxicidad

La vida es un ruido entre dos grandes silencios.
Isabel Allende

En este capítulo se hace una reseña acerca de los diferentes ensayos que fueron llevados a cabo para evaluar los efectos citotóxicos, tanto de los distintos fotosensibilizadores usados, como del propio β -caroteno.

Siempre que se intenta hacer una evaluación de este tipo, es deseable hacer uso de más de un tipo de ensayo, ya que cada uno aporta una información diferente. En esta tesis, la viabilidad celular se evaluó mediante cuatro herramientas: (I) imágenes de campo claro de microscopio para la observación de cambios en la morfología celular (por ejemplo, la formación de vacuolas en la membrana, condensación de la cromatina, etc). Éste es un método establecido que combina la precisión con la facilidad de implementación (1-5). (II) El ensayo de MTT para actividad enzimática mitocondrial (6-8). En esta prueba, una célula activa metabólicamente reduce MTT a un derivado de color azul, formazán, cuya concentración puede cuantificarse espectrofotométricamente. (III) El ensayo de azul de tripán para la permeabilidad de la membrana (9). Este método se basa en que las células vivas (viables) no incorporan el colorante, mientras que las muertas lo hacen. La tinción facilita la visualización de la morfología celular. (IV) La tinción de Giemsa sirve para evidenciar cambios en la morfología. (9) Todos los experimentos empleados para monitorear los efectos citotóxicos se realizaron con células cultivadas e incubadas en medios preparados en H_2O .

Toxicidad inherente del β -caroteno en oscuridad:

Los carotenoides tienen muchos efectos biológicos. Ellos pueden inhibir la proliferación celular en varios tipos de células, (10,11) inhibir la transformación neoplásica (12) y mejorar las uniones intercelulares gap (uniones comunicantes funcionan como poros que permiten el transporte de iones y moléculas pequeñas entre células vecinas) (13). Ellos tienen un papel importante como precursores de la vitamina A, por ejemplo, durante el desarrollo de los vertebrados (14) y se cree que modulan el sistema inmune (15). Los múltiples efectos de los carotenoides podrían estar mediados por diversos mecanismos. Aquellos carotenoides provitamina A, como β -caroteno y β -criptoxantina, podrían ejercer sus efectos, dando lugar a la vitamina A (retinol) y el ácido retinoico (14,16). Alternativamente, muchos de los efectos protectores de los carotenoides en la salud humana se han atribuido a sus propiedades antioxidantes (17). Sin embargo, los carotenoides pueden tener propiedades anti o pro-oxidantes en sistemas biológicos, en función de: las condiciones de su incorporación, las diferentes formas en las que se evalúa la toxicidad, la línea celular estudiada, si se utilizan células diferenciadas o no diferenciadas, las condiciones de manipulación celular, si los productos de oxidación de los carotenoides podrían afectar los resultados, etc. (18-20). En algunos casos se ha observado un umbral aparente de toxicidad de β -caroteno (21, 22). Establecer estos límites en nuestro sistema de trabajo (células HeLa o HL-60, en sus respectivas condiciones de incubación), es importante a la hora de hacer un estudio sistemático y lograr dilucidar los mecanismos por los cuales los carotenoides ejercen sus efectos sobre la salud humana.

Ensayos de Azul de Tripán

Se realizó el ensayo de azul de tripán en células HeLa y HL-60 incubadas durante 48 h con diferentes concentraciones de β -caroteno en el medio de cultivo entre 5 y 40 μ M.

Se tomaron fotografías de las tinciones realizadas con Azul de Tripán directamente sobre las placas de cultivo de células HeLa incubadas con soluciones de distintas concentraciones de β -caroteno (ver Figura 1).

Como puede verse en la Figura 1, el número de células teñidas aumenta con el aumento de la concentración de β -caroteno en el medio de cultivo.

El número de células se determinó en una cámara de Neubauer. Los resultados se muestran en la Figura 2.

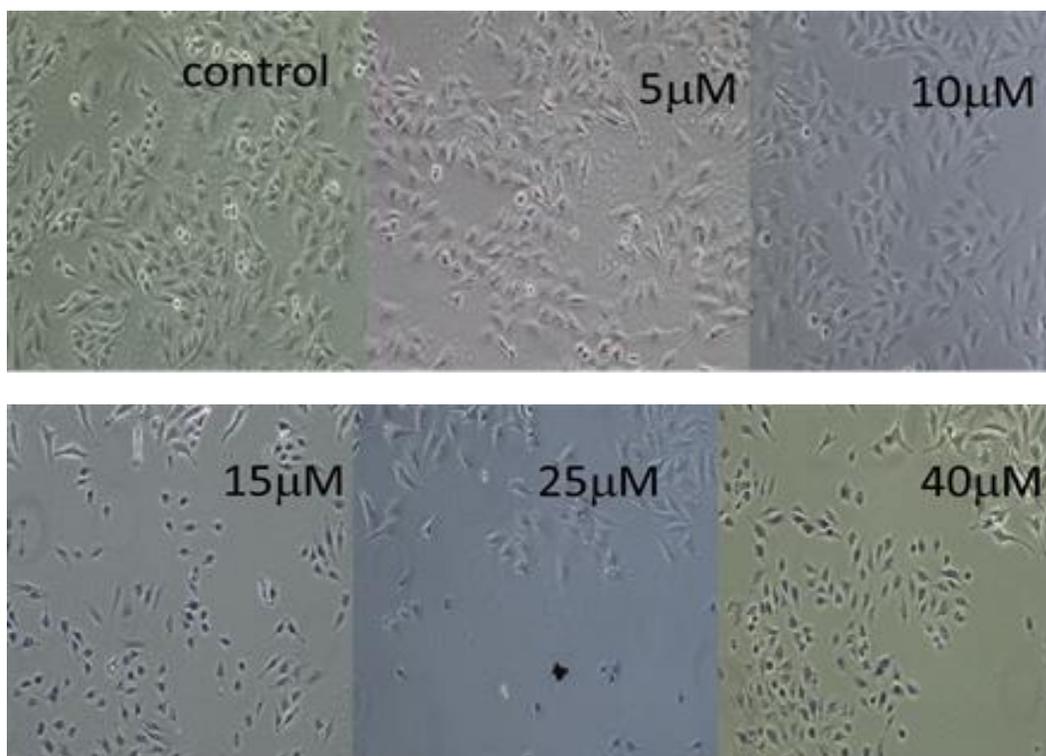


FIGURA 1: Fotografías de las tinciones realizadas con Azul de Tripán directamente sobre las placas de cultivo de células HeLa.

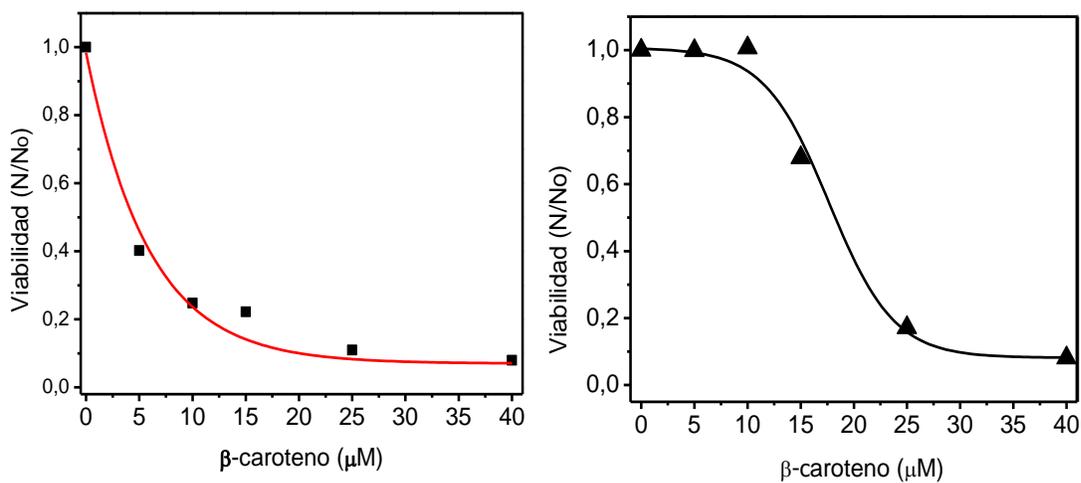


FIGURA 2: Ensayo de Azul de Tripán para células no diferenciadas HL-60 (izquierda) y células HeLa (derecha) que fueron incubadas durante 48 h con diferentes concentraciones de β -caroteno en el medio. El eje y muestra la fracción de células respecto del total que da respuesta negativa al azul tripán. Las curvas son simplemente guías visuales.

Como puede verse en la Figura 2 se determinó que la incubación de las células HeLa durante 48 h con los medios de cultivos que contienen β -caroteno $< \sim 15 \mu\text{M}$ no tiene un efecto adverso, mientras que la incubación durante 48 h con los medios de cultivo que contienen β -caroteno $> 15 \mu\text{M}$ sí lo tiene. Este umbral de toxicidad en la oscuridad para β -caroteno, es consistente con los trabajos encontrados en literatura realizados con el mismo tipo de células (22). El corolario importante de esta observación es que realmente estamos incorporando una cantidad suficiente de β -caroteno en nuestras células, lo que confirma nuestras evaluaciones previas (ver Capítulo 1).

La Figura 2 muestra, en cambio, un menor umbral de toxicidad del β -caroteno a las células HL-60 ($\sim 5 \mu\text{M}$). Esta observación se correlaciona con el mayor tiempo de vida de oxígeno singlete detectado en suspensiones de HL-60 en comparación con células HeLa individuales.

Ensayos de MTT

Por otra parte se hizo uso del ensayo de MTT para complementar el análisis hecho con Azul de Tripán. Los resultados se muestran en la Figura 3.

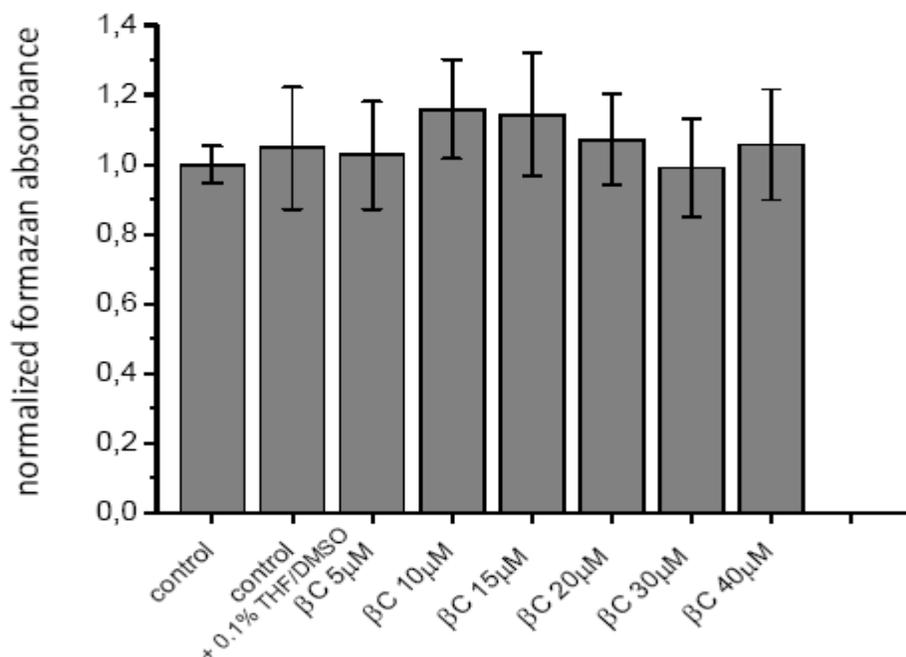


FIGURA 3: Histograma que muestra los resultados del ensayo de MTT en células HeLa. Los valores de absorbancia del formazán se normalizaron con los valores obtenidos a partir de células a las que no habían sido añadido β -caroteno (ensayo control). Las barras de error se refieren a una desviación estándar. El número de muestras examinadas para cada barra fue de al menos 8.

Curiosamente, lo más importante concerniente al estudio que se presenta más adelante en este capítulo acerca de los efectos de β -caroteno sobre la irradiación fotosensibilizada, el ensayo de MTT no dio pruebas claras de que, bajo nuestras condiciones experimentales, β -caroteno tenga un efecto adverso per se en células HeLa incubadas en medios con menos de $\sim 40 \mu\text{M}$ de β -caroteno.

Ensayos con la Técnica de Giemsa

La técnica de Giemsa también se utilizó para evaluar la toxicidad inherente del β -caroteno a las células HeLa. Las células adherentes, se fijaron primero con Carnoy, luego se aplicó la técnica de Giemsa clásica para teñir las células y tomar imágenes (Figura 4).

La solución de Giemsa contiene eosina, azul de metileno y una serie de productos de la oxidación de este último tales como el azur A, el azur B, el violeta de metilo y el azul de metilo. Todos estos colorantes se encuentran en estado no ionizado mientras se mantienen en solución de alcohol metílico, pero al añadir agua se ionizan y se unen selectivamente a los constituyentes celulares precipitando como sales insolubles. Los componentes celulares de naturaleza aniónica (ácida) se unen selectivamente a los tintes catiónicos tiñéndose en variados tonos de azul. Estos componentes son llamados basófilos: (ADN, mitocondrias, ribosomas y citoplasma de células ricas en ARN). Los componentes celulares de naturaleza catiónica (básicos) se unen selectivamente al tinte ácido eosina, tiñéndose en variados tonos de naranja y rojo. A estos elementos se los denomina acidófilos o eosinófilos. Este es el caso de la hemoglobina, y de las proteínas contenidas en las granulaciones de los granulocitos eosinófilos. Los componentes celulares que tienen afinidad por ambos tipos de colorantes se denominan neutrófilos y se tiñen en variados tonos de violeta.

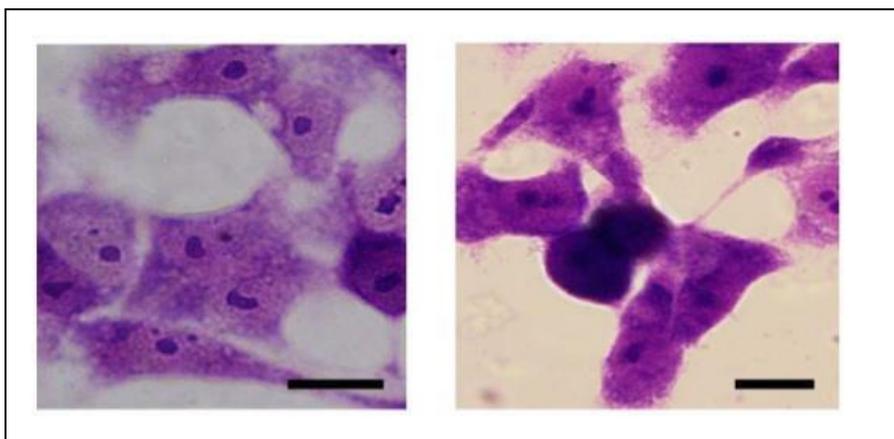


FIGURA 4: Imágenes microscópicas obtenidas de células HeLa teñidas con Giemsa sin (izquierda) y con (derecha) $20 \mu\text{M}$ β -caroteno en los medios de cultivo. Barra de escala = 20 micrómetros.

Los cambios en la morfología de las células, tales como condensación de la cromatina y la contracción citoplasmática, fueron más notables para las células que habían sido previamente incubadas con β -caroteno en altas concentraciones.

Toxicidad durante Irradiación Fotosensibilizada:

Se llevaron a cabo un conjunto de experimentos similares a los realizados para evaluar la toxicidad inherente del β -caroteno, utilizando la técnica de Giemsa o imágenes de campo brillante con células incubadas en presencia de los sensibilizadores hidrofóbicos PPa y TPPCOOMe o la TMPyP y la ftalocianina AlPcS₄ como sensibilizadores hidrofílicos con y sin β -caroteno a varias concentraciones con el fin de añadir más ejemplos sobre el tema.

Sin β -caroteno:

Ensayo de Azul de Tripán

Mientras que el porcentaje de supervivencia de las células HeLa se redujo a 50% 2h después de la irradiación con TPPCOOMe (Figura 5), se observó una disminución mucho más rápida de su viabilidad cuando se utilizó TMPyP como sensibilizador (datos no mostrados). Este resultado puede explicarse a partir de su naturaleza hidrófila.

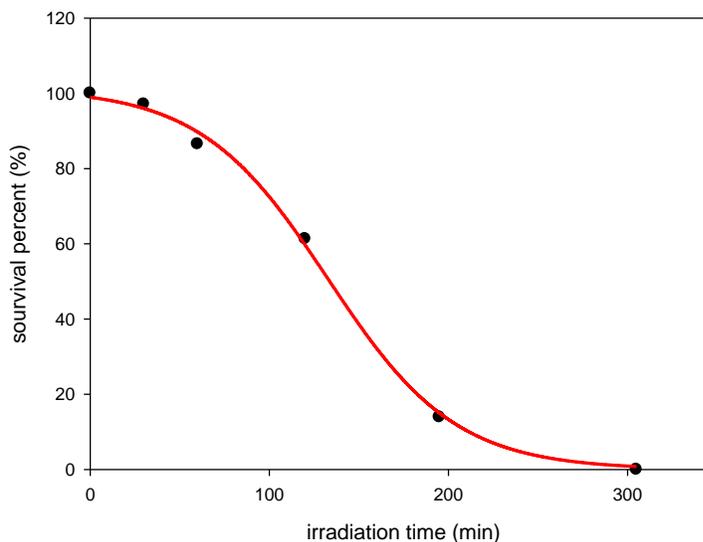


FIGURA 5: Curva de porcentaje de células sobrevivientes irradiadas con luz blanca e incubadas con TPPCOOMe 10 μ M.

Tinción de Giemsa

La Figura 6 muestra imágenes obtenidas después de la irradiación fotosensibilizada de células teñidas con la técnica de Giemsa clásica. Los cambios en la morfología celular, tales como burbujas, cuerpos apoptóticos, condensación de la cromatina y la contracción citoplasmática son típicos de los procesos inducidos por el oxígeno molecular singlete (23).

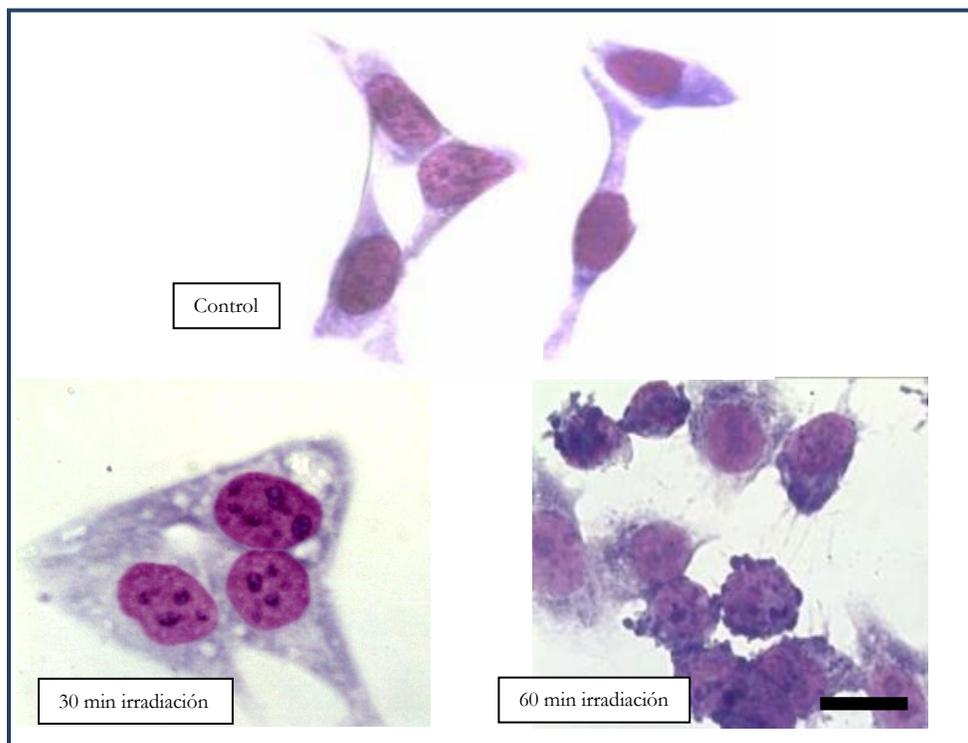


FIGURA 6: Imágenes microscópicas (100X) obtenidas para las células HeLa que contienen el fotosensibilizador TPPCOOMe hidrófobo antes y después de la irradiación. Las células se tiñeron de acuerdo con la técnica de Giemsa. Barra de escala: 20 μ M.

La mayoría de las células muestran daño de la membrana plasmática, característico de la lesión celular irreversible y cariorrexis del núcleo tras la irradiación de las células que contienen cualquiera de los tres fotosensibilizadores (sólo se muestra en la Figura 5 para TPPCOOMe). Estas son características del proceso de necrosis celular. Si bien se sabe que la activación de proteínas debido a la irradiación conduce al proceso de apoptosis, la localización inicial del fotosensibilizador en la membrana plasmática y el tiempo de interacción en nuestros experimentos sugieren un proceso de muerte celular con características similares a la necrosis. Esto se debe probablemente a los radicales libres generados durante la TFD, que conduce a la oxidación de los residuos de aminoácidos de las cadenas laterales que promueven la formación de redes de proteínas (por puentes disulfuro) y la oxidación de la estructura de la proteína que se traduce en

su fragmentación (Bertlett y Stadtman, 1997). La modificación oxidativa del entorno intracelular estimula la degradación de enzimas críticas por el complejo multicatalítico de proteosoma (Mitch y Goldberg, 1996), destruyendo la célula por completo. La ubicación subcelular de un fotosensibilizador tiene una fuerte influencia sobre cómo y en qué medida las células experimentan apoptosis en respuesta a la fotoactivación. Por otra parte se observan claramente signos morfológicos de la apoptosis luego de la irradiación de las células que contienen cualquiera de los tres fotosensibilizadores.

Con β -caroteno:

Ensayo de MTT

Para la evaluación de citotoxicidad fotoinducida en células adherentes HeLa, se llevó a cabo, además, el ensayo de MTT. El reactivo amarillo MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol) se reduce a formazán púrpura en las mitocondrias de las células vivas. La absorbancia de esta solución de color se cuantificó midiendo a 550 nm mediante un espectrofotómetro UV-visible. Esta reducción se lleva a cabo sólo cuando la enzima reductasa mitocondrial está activa, y por lo tanto la conversión puede estar directamente relacionada con el grado de citotoxicidad en las células. Para este análisis, 2.7×10^3 células / pocillo fueron cultivadas en 96 placas de múltiples pocillos y se cultivaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y medio de cultivo completo durante 24 h. A continuación, este medio se reemplazó con medio que contenía TMPyP o TPPCOOMe tanto en presencia como en ausencia de β -caroteno. El tiempo total de incubación con β -caroteno fue de 48 h. Las muestras se irradiaron durante 1 h (con una lámpara fluorescente estándar), a continuación, se lavaron con solución salina buffer fosfato (PBS) y se añadió medio fresco con el reactivo MTT (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) a una concentración final de 1mg/mL. Después de 3 h de incubación, las células se lavaron de nuevo con PBS. Las células se lisaron y los cristales de formazán se disolvieron mediante la adición de 100 μ L sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Merck, Química Argentina SAIC, Argentina) a cada pocillo. Las placas se agitaron durante 10 min y se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un lector de placa de ELISA automático Solver (7530 Lector de Microplacas Cambridge Technology, Inc, St. Watertown, MA, EE.UU.). Se utilizó solución de etanol (5%) como control positivo. Cada experimento se repitió tres veces de forma independiente.

Los datos se representan en la Figura 7, donde se utilizó un derivado éster de tetrafenilporfina (TPPCOOMe, Figura 7A) como sensibilizador del oxígeno singlete hidrofóbico y el TMPyP (Figura 7B) como sensibilizador hidrofílico.

El primer punto a destacar es que la solución de THF / DMSO utilizada para facilitar la incorporación de β -caroteno no tiene un efecto adverso; dentro de nuestros errores, ya que el nivel de formazán es el mismo que el de la población de control.

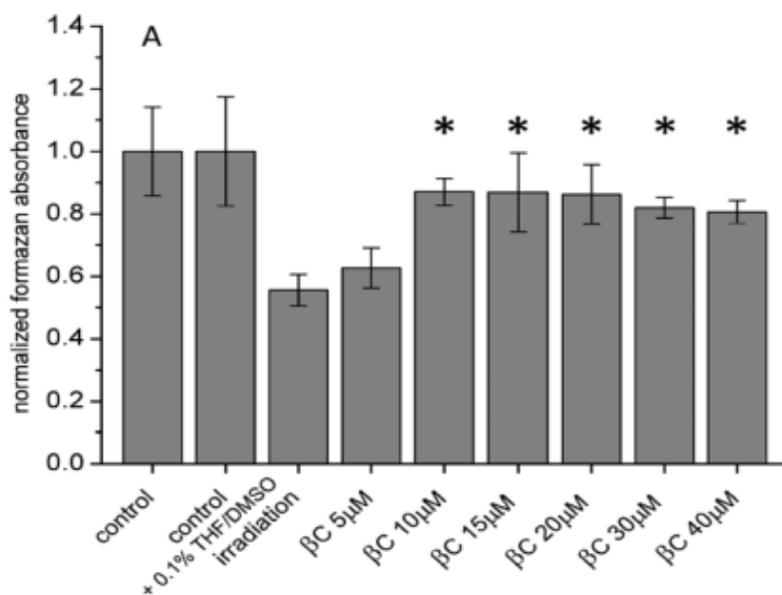
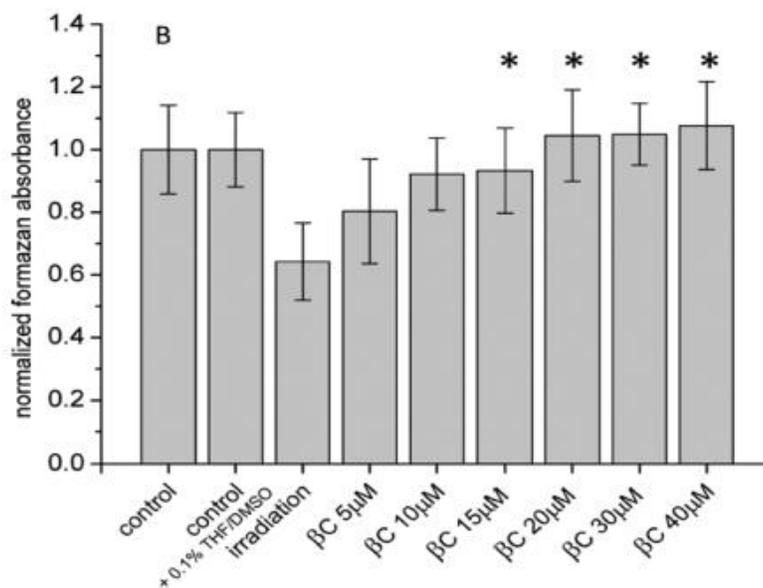
Sensibilizadores hidrofóbicos:TPPCOoMe**Sensibilizadores hidrofílicos:TMPyP**

FIGURA 7: Histogramas que muestran los resultados del ensayo de MTT en células HeLa. Los valores de absorbancia de formazán se normalizaron contra valores promedio obtenidos a partir de células sin agregado de sensibilizador o β -caroteno. Los datos mostrados se obtuvieron de experimentos en los cuales se irradió: (A) el sensibilizador hidrófobo TPPCOoMe y (B) el sensibilizador hidrófilico TMPyP. Las barras de error se refieren a un desvío estándar, en cada caso, el número de muestras examinadas fueron al menos 8 y hasta 16. El asterisco indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre este número particular y el número obtenido a partir de la muestra irradiada sin β -caroteno y con sólo 5 μ M de β -caroteno en el medio (ANOVA de una vía con prueba post hoc Tukey, $p < 0,05$).

Tras la irradiación de la TPPCOOMe intracelular (Figura 7A), la capacidad de las células para reducir el MTT a formazán se ve afectada, como es de esperarse, debido al cambio en la actividad enzimática inducida por oxígeno singlete. Cuando se realiza el mismo ensayo con cantidades crecientes de β -caroteno añadido, los resultados mostrados en forma gráfica, parecen ilustrar dos fenómenos separados. A medida que la concentración de β -caroteno en el medio de incubación aumenta hasta $10 \mu\text{M}$, los datos indican que β -caroteno puede de hecho impartir un efecto protector significativo. Los datos también indican que el aumento de la concentración de β -caroteno en el medio por encima de $\sim 10 \mu\text{M}$ no tiene ningún efecto adicional en la capacidad de las células para reducir el MTT a formazán (es decir, el máximo efecto protector parece haber sido alcanzado). También se llevaron a cabo experimentos utilizando TPPCOOMe y PPa, donde se utilizaron las imágenes de campo claro para evaluar la respuesta de las células (Figuras 8 y 9), las observaciones de estas últimas son consistentes con lo que se muestra en la Figura 7.

En la Figura 7B, el sensibilizador de oxígeno singlete elegido fue una porfirina catiónica, TMPyP. Los datos muestran que el β -caroteno en realidad tiene un efecto de protección contra los efectos citotóxicos del oxígeno singlete. Por otra parte, se realizaron experimentos en los que se irradió otro sensibilizador hidrofílico (AlPcS_4) y se utilizaron imágenes de campo claro para evaluar la respuesta celular, cuyos resultados son coherentes con lo que se muestra en la Figura 7B. Específicamente, y como se ilustra en la Figura 10, en la ausencia de β -caroteno, la irradiación de AlPcS_4 se traduce claramente en características morfológicas asociadas con la muerte celular. Sin embargo, la presencia de β -caroteno imparte un efecto protector bajo las mismas condiciones.

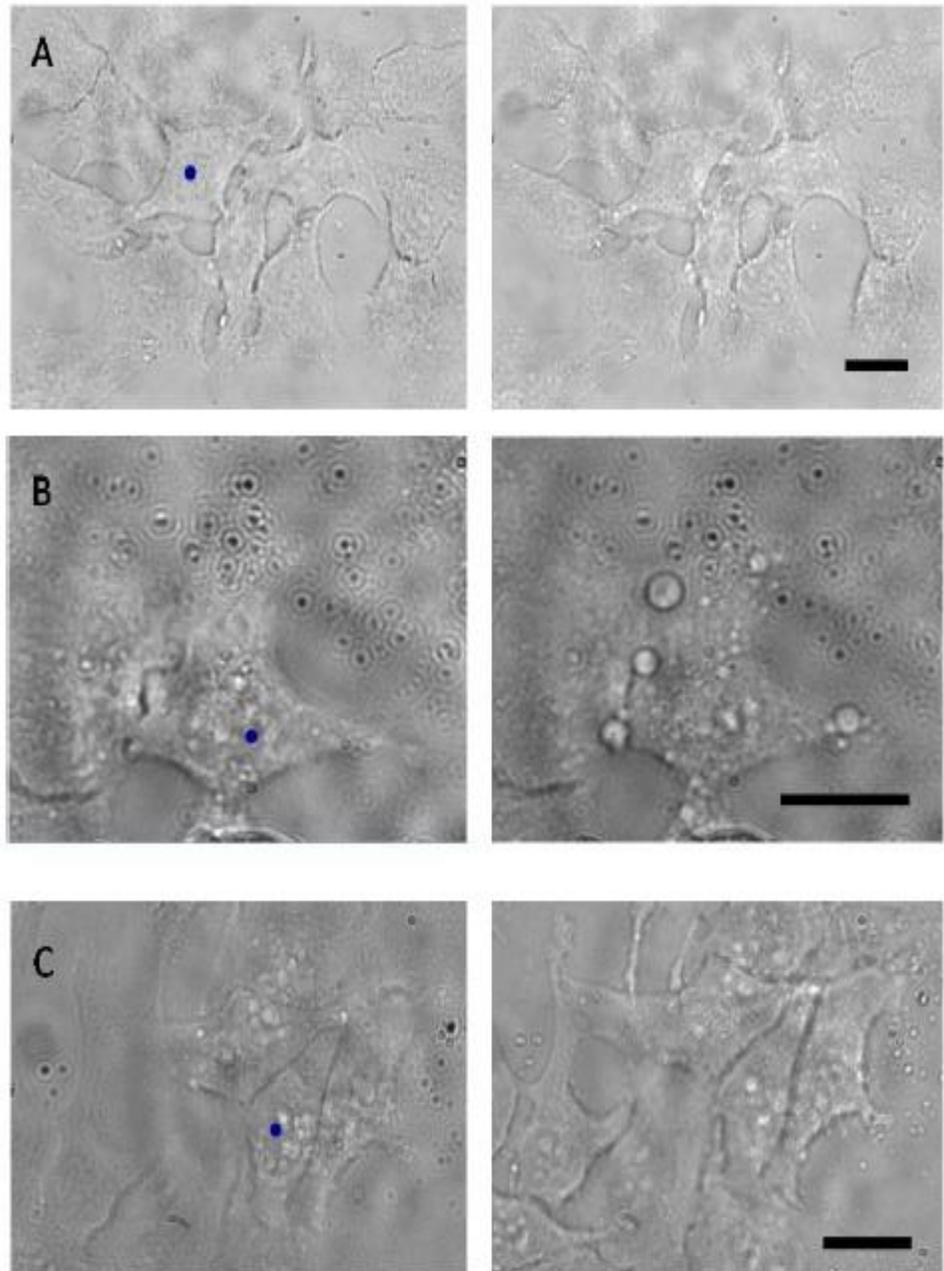


FIGURA 8: Imágenes de campo claro de células HeLa antes (columna izquierda) y después de la irradiación (columna derecha).A: las células control sin sensibilizador, B: TPPCOOMe como sensibilizador sin β -caroteno, C: TPPCOOMe como el sensibilizador que muestra el efecto protector de $5 \mu\text{M}$ de β -caroteno en el medio. El punto azul muestra la posición aproximada de la irradiación láser enfocada. Barra de escala = 20 micras.

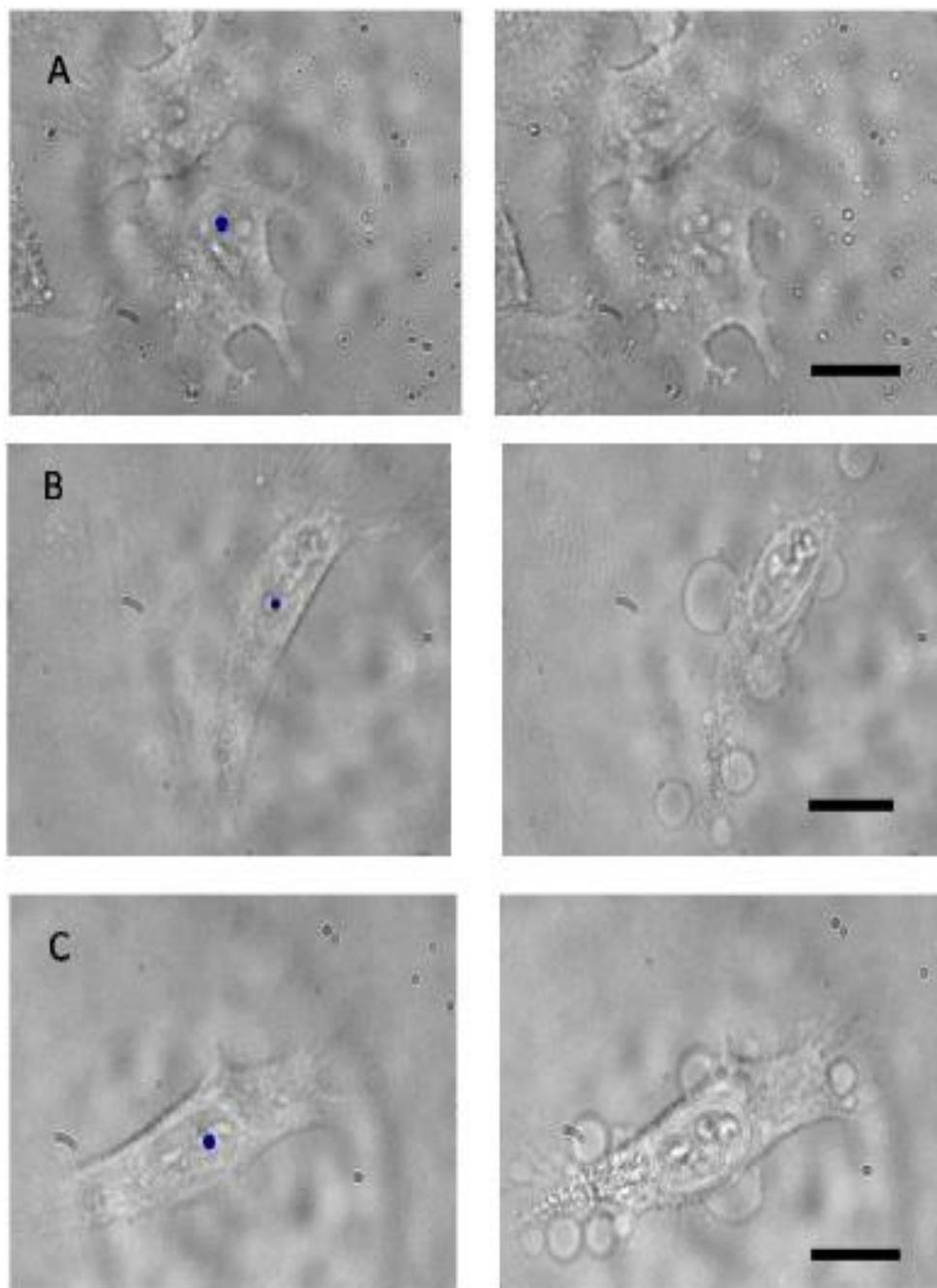


FIGURA 9: imágenes de campo claro de células HeLa antes (columna izquierda) y después de la irradiación (columna derecha). A: efecto fotoprotectivo de β -caroteno $10 \mu\text{M}$ en el medio cuando se utiliza TPPCOOMe como el sensibilizador. B: PPa como sensibilizador sin adición de β -caroteno. C: PPa como sensibilizador con $5 \mu\text{M}$ de β -caroteno en la medio, que no muestra efecto protectoro alguno. El punto azul muestra la posición aproximada de láser de irradiación enfocado. Barra de escala = 20 micrones.

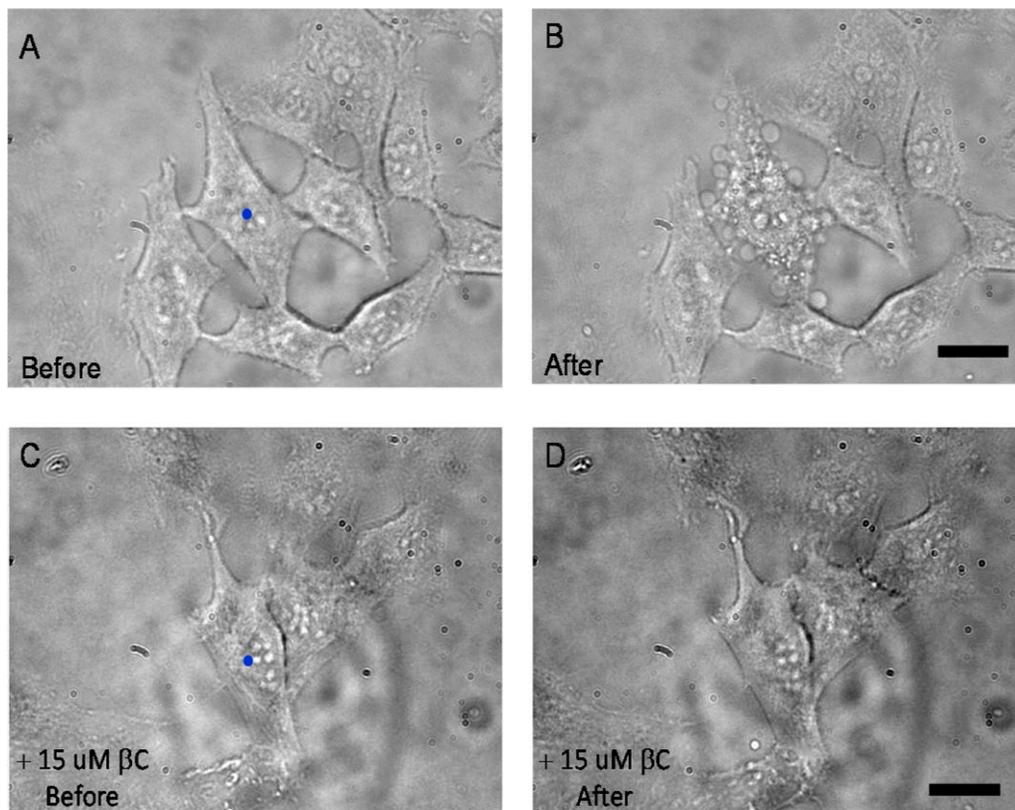


FIGURA 10. Imágenes de campo claro de células HeLa que contienen la ALPcS₄ como sensibilizador hidrofílico. (A) Antes de la irradiación de ALPcS₄. (B) Después de la irradiación de ALPcS₄, mostrando vacuolas características de la muerte celular. (C) Antes de la irradiación de ALPcS₄ en una célula que se había incubado además, con 15 μM de β-caroteno. (D) Después de la irradiación de ALPcS₄, que muestra el efecto protector de la β-caroteno. Barra de escala = 20 micrones. Los puntos azules indican la posición aproximada en que se enfocó el láser de irradiación.

Discusión y conclusiones

Se ha observado tanto un efecto fotoprotector como un efecto citotóxico de β -caroteno para las concentraciones de alrededor de 15 μM en experimentos independientes. Por lo tanto, un equilibrio entre su acción antioxidante y de la actividad citotóxica puede ser la clave para dilucidar la acción de los carotenoides.

Nuestra conclusión de que β -caroteno tiene efectos inhibidores del crecimiento en las células tumorales HeLa y HL-60 en concentraciones del medio extracelular del orden micromolar es particularmente relevante, ya que esta concentración está dentro de la gama de las concentraciones alcanzadas in vivo en sueros de pacientes sometidos a la suplementación dietaria con diversas dosis del carotenoide. Una concentración en estado estacionario de suero promedio de β -caroteno de hasta 7,7 μM se encuentra en los seres humanos que ingieren 51-102 mg / día y hasta 13,2 μM a mayores dosis. (24)

Las células HL-60 fueron más susceptibles al β -caroteno, lo que demuestra la influencia de la naturaleza de las células a la hora de evaluar la citotoxicidad.

Aunque no se observaron pérdidas en la actividad enzimática mitocondrial en los ensayos de MTT en concentraciones superiores de β -caroteno (30-40 μM), el β -caroteno mostró un efecto fotoprotectivo por debajo de esas concentraciones sólo para algunos de los sensibilizadores empleados.

La modulación de estado redox intracelular es importante en la regulación de procesos celulares y el control del crecimiento celular (25). Se ha propuesto que el β -caroteno puede actuar como un agente redox intracelular y así, proporcionar protección contra los radicales libres en algunas circunstancias y promover la formación de radicales libres en otras (26-28) Es decir, su rol principal no necesariamente sea el de quencher de oxígeno singlete. Esto nos conduce al último capítulo de esta tesis.

Referencias

- (1) Silva, E. F. F.; Pedersen, B. W.; Breitenbach, T.; Toftegaard, R.; Kuimova, M. K.; Arnaut, L. G.; Ogilby, P. R. J. Phys. Chem. B 2012, 116, 445–461.
- (2) Pedersen, B. W.; Breitenbach, T.; Redmond, R. W.; Ogilby, P. R. F. Rad. Res. 2010, 44, 1383–1397.
- (3) Pedersen, B. W.; Sinks, L. E.; Breitenbach, T.; Schack, N. B.; Vinogradov, S. A.; Ogilby, P. R. Photochem. Photobiol. 2011, 87, 1077-1091.
- (4) Breitenbach, T.; Kuimova, M. K.; Gbur, P.; Hatz, S.; Schack, N. B.; Pedersen, B. W.; Lambert, J. D. C.; Poulsen, L.; Ogilby, P. R. Photochem. Photobiol. Sci. 2009, 8, 442-452.
- (5) Rello, S.; Stockert, J. C.; Moreno, V.; Gamíz, A.; Pacheco, M.; Juarranz, A.; Cañete, M.; Villanueva, A. Apoptosis 2005, 10, 201–208
- (6) Hatz, S.; Lambert, J. D. C.; Ogilby, P. R. Photochem. Photobiol. Sci. 2007, 6, 1106-1116.
- (7) Nikkhah, G.; Tonn, J. C.; Hoffmann, O.; Kraemer, H.-P.; Darling, J. L.; Schönmayr, R.; Schachenmayr, W. J. Neuro-Oncol. 1992, 13, 1-11.
- (8) Liu, Y.; Peterson, D. A.; Kimura, H.; Schubert, D. J. Neurochem. 1997, 69, 581-593.
- (9) Freshney, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques; Alan R. Liss, Inc.: New York, 1987.
- (10) Sharoni, Y. and Levy, J. In: Kumpulainen, J.T. and Salonen, J.T. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 1996, 378–385.
- (11) Carpenter, K.L.H., Hardwick, S.J., Albarani, V. and Mitchinson, M.J. FEBS Lett. 1999, 447, 17-20.
- (12) Bertram, J.S., Pung, A., Churley, M., Kappock, IV, T.J., Wilkins, L.R. and Cooney, R.V. Carcinogenesis. 1991, 12, 671-678.
- (13) Bertram, J.S. Nutr. Rev. 1999, 57, 182-191.
- (14) Means, A.L. and Gudas, L.J. Annu. Rev. Biochem. 1995, 64, 201-233.
- (15) Bendich, A. J. Nutr. 1989, 119, 112-115.
- (16) Rogers, M.B. Curr. Top. Dev. Biol. 1997, 35, 1-46.

- (17) Palace, V.P., Khaper, N., Qin, G. and Singal, P.K., *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 746-761.
- (18) Palozza, P. *Nutr. Rev.* 1998, 56, 257-265.
- (19) Edge, R., McGarvey, D.J. and Truscott, T.G. *J. Photochem. Photobiol.* 1997, 41B, 189-200.
- (20) Young, A.J. and Lowe, G.M. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001, 385, 20-27.
- (21) Palozza, P.; Serini, S.; Di Nicuolo, F.; Piccioni, E.; Calviello, G. *Mol. Aspects Med.* 2003, 24, 353-362.
- (22) Palozza, P.; Serini, S.; Torsello, A.; Boninsegna, A.; Covacci, V.; Maggiano, N.; Ranelletti, F. O.; Wolf, F. I.; Calviello, G. *Int. J. Cancer* 2002, 97, 593-600.
- (23) A. Gollmer , F. Besostri , T. Breitenbach & P. R. Ogilby . *Free Rad. Res.* 2013, 47, 718-730
- (24) Prince MR, Frisoli JK. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57, 175-181.
- (25) Jacobson MD., *TIBS* 1996, 21, 83–86.
- (26) Burton GW, Ingold KU. *Science.* 1984; 224:, 569-573.
- (27) .Palozza P., *Nutr Rev* 1998, 56, 257–265.
- (28) Schwartz JL., *J Nutr.* 1996; 126, 1221-1227.

Reactividad de β -caroteno con otras ROS

Algo hay tan evidente como la muerte y es la vida.

Charles Chaplin.

Los carotenoides, y en particular β -caroteno, son importantes antioxidantes naturales. El oxígeno singlete, el menor estado excitado del oxígeno molecular, es un intermediario implicado a menudo en reacciones de oxidación naturales.

El hecho de que β -caroteno sea un eficiente desactivador de oxígeno singlete en solución, induce a explicar las propiedades biológicas antioxidantes del β -caroteno. En capítulos anteriores de esta tesis hemos demostrado que el oxígeno singlete intracelular, producido en un proceso fotosensibilizado, de hecho no es eficientemente desactivado por β -caroteno. También se ha demostrado en esta tesis su inhibición de la citotoxicidad en células HeLa irradiadas en presencia de fotosensibilizadores.

Dado que estas observaciones requieren una re-evaluación del papel del β -caroteno como antioxidante en los sistemas de mamíferos y ponen en relieve la importancia de los mecanismos por los cuales β -caroteno inhibe reacciones de radicales, se ha abordado la parte final del presente trabajo, para evaluar qué especies reactivas de oxígeno (ROS) se ponen en juego al realizar una terapia fotodinámica en células HeLa y, a su vez, cuáles de ellas son desactivadas por β -caroteno. Se han elegido tres sondas diferentes para llevar a cabo este estudio: Thiol Tracker[®] (sonda de tiol representativa del glutatión reducido intracelular y por lo tanto del estado redox como respuesta al estrés oxidativo), dihydroethidium (DHE) para la detección de superóxido intracelular y 2',7'-Diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) para la detección de peróxidos. La fotosensibilización se realizó con una resolución subcelular por excitación bifotónica de ALA y PPa.

Todos los organismos aeróbicos dependen de oxígeno molecular para la supervivencia. Durante el metabolismo aeróbico energético, los electrones son transportados a través

de una serie de transportadores de electrones en la mitocondria para generar una fuerza electromotriz que se aprovecha para sintetizar ATP; el aceptor final de electrones, el oxígeno molecular, se reduce para formar agua (1). Sin embargo, lo que puede aparecer como un método rentable de síntesis de ATP está plagado de problemas ya que una buena proporción de moléculas de oxígeno escapan a la reducción completa, y quedan reducidas parcialmente para formar una serie de metabolitos altamente reactivos del oxígeno. Colectivamente se refiere a estas especies como especies reactivas de oxígeno (ROS). Si bien existen numerosas fuentes endógenas y exógenas de ROS, más del 90% de ROS se producen en la mitocondria (2)

La toma directa de imágenes de ROS en muestras biológicas ha demostrado ser extremadamente compleja. Las ROS son por naturaleza especies muy reactivas y son por lo tanto extremadamente inestables, por lo que, hasta ahora se ha hecho imposible tomar una imagen directa de éstas. Por lo tanto la detección de los niveles de ROS se ha basado en gran medida en la detección de los productos finales - ya sea por quimioluminiscencia o por fluorescencia que aparece cuando compuestos específicos reaccionan con ROS (3, 4).

Una de las técnicas para la detección intracelular de ROS, en particular el peróxido de hidrógeno, depende de la oxidación del sustrato no fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a un producto fluorescente verde (5, 6). Como las membranas celulares son permeables a las formas esterificadas de DCFH, las DCFH-DA, éstas pueden entrar libremente en las células, donde como resultado de la desacetilación llevada a cabo por las esterasas intracelulares, quedan atrapadas dentro de la célula en la forma del producto fluorescente verde. Dependiendo de la naturaleza de la muestra utilizada, la velocidad de oxidación puede ser monitoreada por un fluorímetro, microscopía de fluorescencia o por citometría de flujo. Sin embargo, al igual que para otras sondas para la detección de ROS, se han planteado una serie de inquietudes en relación con esta técnica. Por ejemplo, se ha informado que incluso después de la hidrólisis por esterasas intracelulares, el producto oxidado es capaz de escapar hacia el entorno extracelular en algunos tipos de células (7). Además, el colorante puede ser oxidado por una gran cantidad de ROS, tales como el óxido nítrico, aniones peroxinitrito, e incluso hidroperóxidos orgánicos (8, 9, 10). Cabe destacar que, incluso en los casos en que DCFH es oxidado por el peróxido de hidrógeno, la reacción se acelera de manera significativa por la presencia de peroxidasa (10). En otro informe, se demostró que la oxidación de DCFH también dependía de la concentración de glutatión (11). Por lo tanto, se ha sugerido que en lugar de servir como una prueba específica de aumento de la producción de ROS, DCFH es quizás un indicador del grado de estrés oxidativo en general.

La sonda dihydroethidium (DHE), en virtud de su capacidad de difundir libremente a través de las membranas celulares, se utiliza ampliamente para seguimiento de la producción de superóxido (12, 13, 14). Desde hace tiempo se ha postulado que la sonda DHE tras la reacción con los aniones superóxido forma un producto fluorescente rojo el cual se intercala con el ADN (15, 16). Sin embargo, estudios más recientes han sugerido que el producto es en realidad 2-hydroxyethidium (17). DHE es quizás el colorante más específico y menos problemático, ya que detecta esencialmente

radicales superóxido, se mantiene así en la estructura de las células, e incluso puede tolerar una fijación suave. (18, 19).

El glutatión reducido (GSH) juega un papel crítico en el mantenimiento de un estado de equilibrio redox intracelular. La gran mayoría de los tioles libres intracelulares está presente como GSH que es accesible a las sondas fluorescentes que reaccionan con tioles. A pesar de que esta técnica no es específica para la detección de GSH, debido a la abundancia de GSH en células de mamífero, el uso de colorantes reactivos con tiol como indicadores de GSH proporciona la base de un ensayo robusto para la detección de GSH. En particular, el Thiol Tracker (una marca comercial registrada de Invitrogen) es un colorante violeta ideal para obtener imágenes celulares debido a las siguientes propiedades: 1) es altamente reactivo con tioles intracelulares reducidos; 2) es compatible con configuraciones estándar de microscopía de fluorescencia, y 3) tiñe rápidamente las células vivas, produciendo imágenes brillantes, siendo la señal fotoestable en las células sanas fácilmente distinguibles de células con déficit de GSH. (20)

Condiciones experimentales

Se realizaron dos tipos de experimentos. En células adherentes HeLa se utilizó la técnica de irradiación bifotónica combinada con la microscopía de fluorescencia y en células en suspensión HL-60 se realizaron medidas de fluorescencia estacionaria en cubetas. El sensibilizador elegido fue el PPa y las condiciones de incubación fueron las mismas que en capítulos previos. En la Tabla 1 se resumen las condiciones experimentales empleadas en la irradiación bifotónica.

Experimentos bifotónicos

<i>Sonda</i>	<i>Incubación</i>	<i>Imágenes de fluorescencia</i>	<i>Irradiación bifotónica del sensibilizador PPa (20 μM)</i>
DCFH-DA	6.7 μM (solución stock 6.7mM en DMSO) 30 min Medio de cultivo ABM	$\lambda_{exc} = 500/10 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 535/40 \text{ nm}$ DM= C64665 Ganancia: 03 Tiempo de acumulación: 500 ms Bining: 2	Láser λ_{exc} : 800nm, 5mW $\lambda_{em} = 655/40 \text{ nm}$ Sin espejo dicroico Ganancia: 01 Tiempo de acumulación: 2000ms Bining: 1 Se tomaron 90 imágenes del punto de láser cada 10 seg = 15 min.
DHE	3.2 μM (solución stock 3mM en DMSO) 20 min Medio de cultivo EMEM	$\lambda_{exc} = 535/40 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 620/10 \text{ nm}$ DM= C64665 Ganancia: 01 Tiempo de acumulación: 700 ms Bining: 2	
Thiol Tracker	20 μM (solución stock 10mM en DMSO) 30 min Medio de cultivo ABM	$\lambda_{exc} = 400/40 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 535/40 \text{ nm}$ DM= C65488 Ganancia: 01 Tiempo de acumulación: 150 ms Bining: 1	

TABLA 1: Condiciones de incubación, imágenes de fluorescencia e irradiación bifotónica empleadas para células HeLa.

La evolución de la fluorescencia del sensibilizador en la zona de irradiación del láser (resolución subcelular), se muestra como ejemplo en la Figura 1. La irradiación de PPa a 800 nm utilizando un rayo láser lo suficientemente intenso resultará en la absorción de la luz en un proceso de dos fotones únicamente cuando el flujo de fotones incidente sea lo suficientemente grande, lo que significa dentro o muy cerca de la zona enfocada por el láser. El perfil de intensidad de la imagen de fluorescencia PPa muestra una mancha fluorescente localizada de PPa. La absorción de la luz dispersada claramente no juega un papel importante como lo haría en un proceso de un solo fotón, donde no existe un umbral de intensidad de absorción. La Figura 1 muestra, además, que existe una resolución espacial de excitación y esto puede lograrse sólo con el uso de un láser

enfocado en condiciones de excitación de dos fotones. Los experimentos realizados con ABM como medio de cultivo sin la incorporación del sensibilizador, mostraron una fluorescencia insignificante ya que, la sección eficaz de absorción de dos fotones de los fluoróforos endógenos, es insignificante en comparación con la de PPa (21).

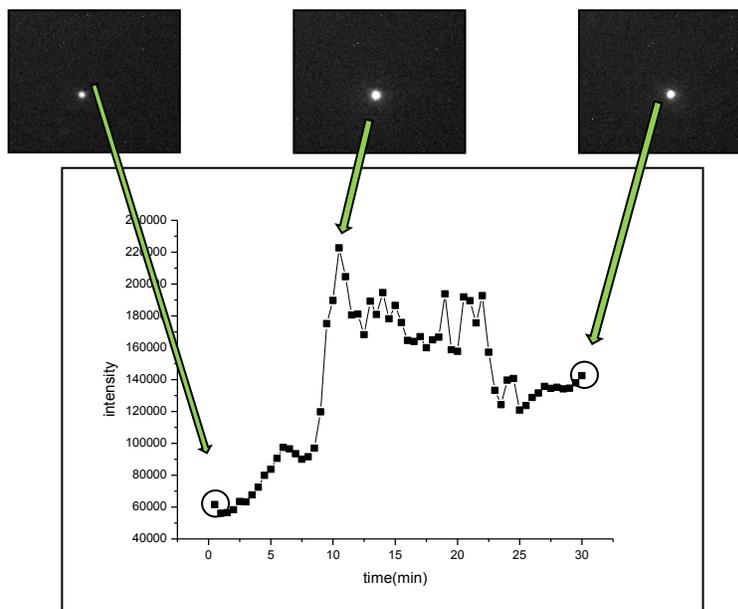


FIGURA 1: Ejemplo de la evolución de la fluorescencia de PPa durante el 30min de irradiación bifotónica con una longitud de excitación de 800 nm (potencia del láser de 5 mW). La intensidad de la fluorescencia de la primera y la última imagen se utiliza para entender el desarrollo de la fluorescencia de PPa en el tiempo.

Ensayos con DCFH-DA

En células HeLa:

Los experimentos llevados a cabo con células HeLa, incubadas en las condiciones ya descritas, se basaron en la detección de emisión de la sonda fluorescente (DCF) durante la irradiación bifotónica en el lugar exacto de la irradiación.

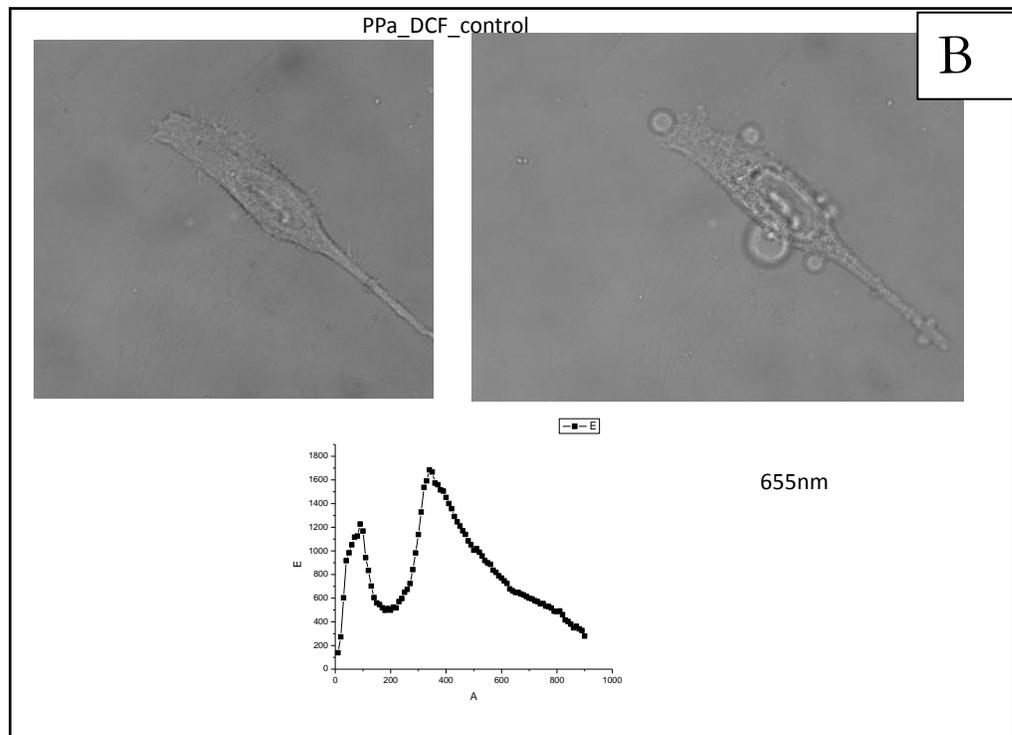
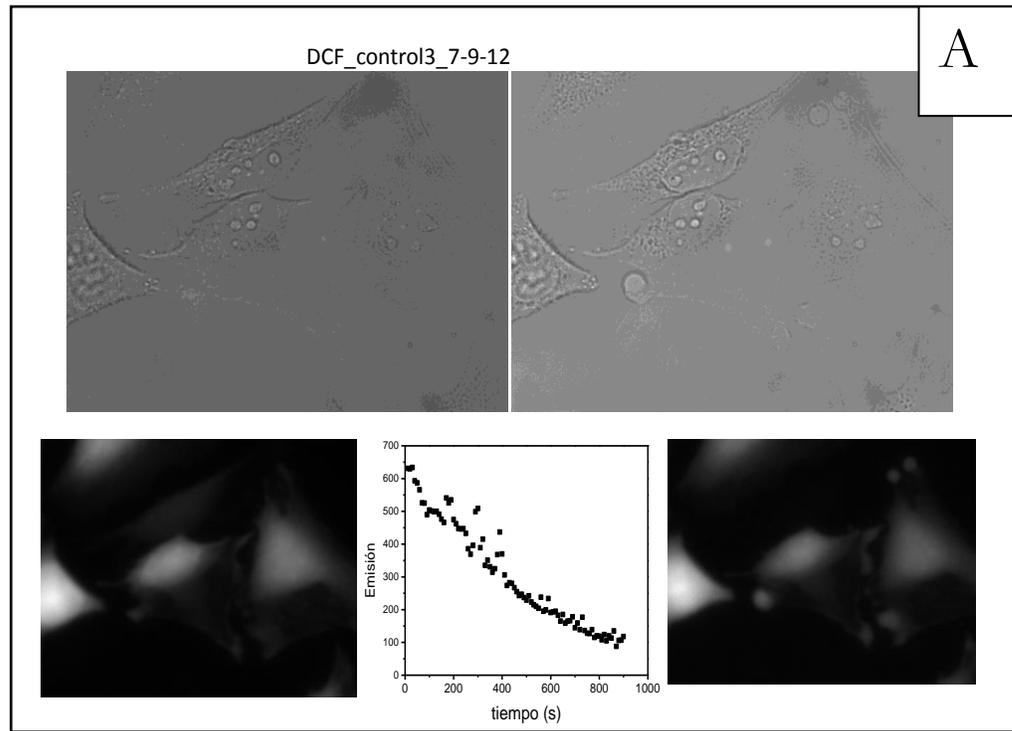
En la Figura 2 se muestran las imágenes de campo claro antes y después de la irradiación, así como también las imágenes de fluorescencia luego de 30 min de irradiación. Hay varios datos importantes que se desprenden de su análisis. En primer lugar la sonda DCF posee una sección eficaz de absorbancia bifotónica que nos permite seguir su emisión con el tiempo, al mismo tiempo que sufre una degradación importante por la irradiación directa del láser (Figura 2A) pero no denota efectos citotóxicos evidentes en las imágenes de campo claro. Por otra parte, en presencia del

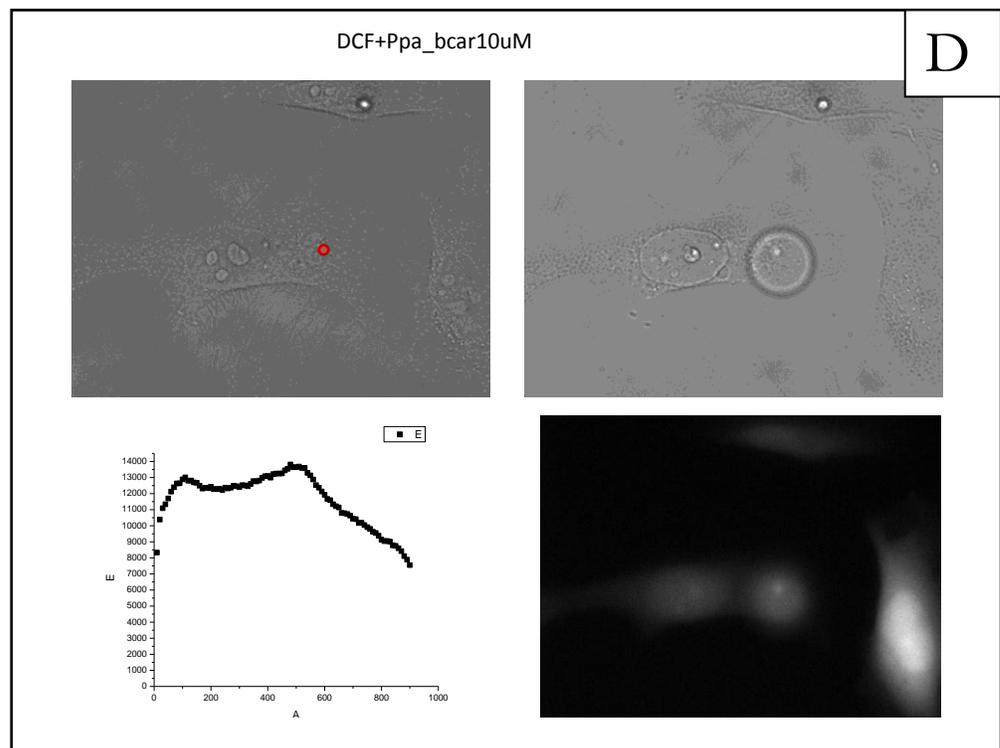
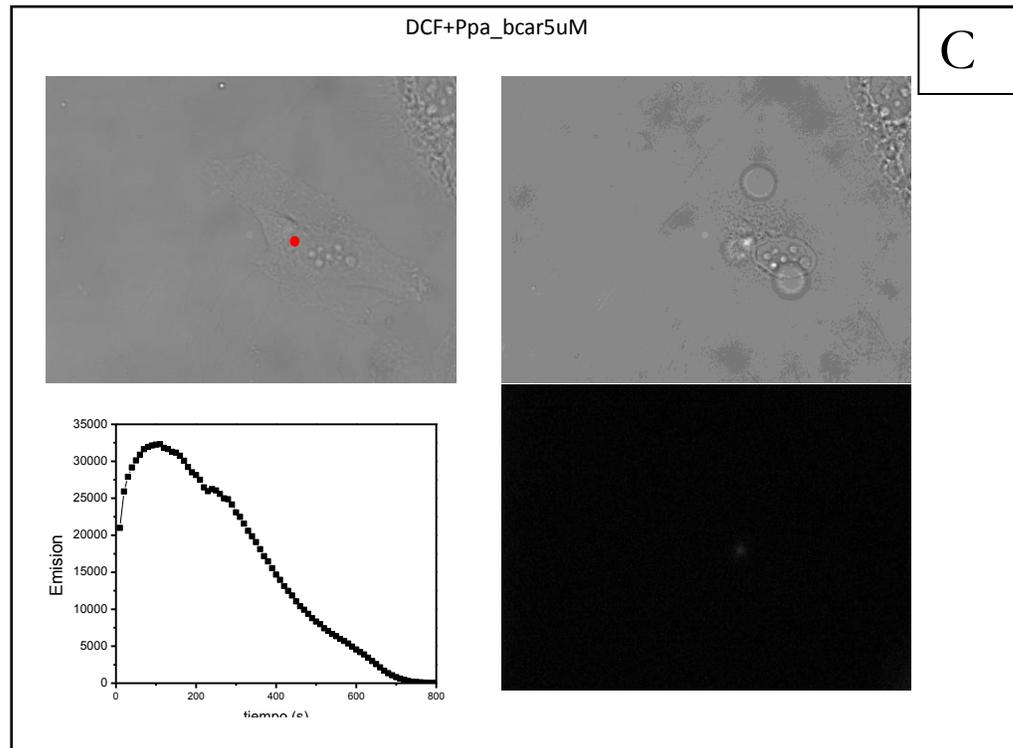
sensibilizador PPa, su intensidad de emisión aumenta a tiempos cortos (menor a 200s), por la generación principalmente de peróxidos y luego disminuye por la competencia entre su degradación y la generación de la forma excitada. Probablemente la degradación, incluso, se vea aumentada por la acción sinérgica de la luz y las ROS presentes en el medio.

Cuando se agrega al medio el carotenoide, para poder comparar en forma relativa los efectos producidos por el agregado de diferentes concentraciones del mismo, se enfoca entonces el análisis sólo a los primeros tiempos de irradiación, donde se ve un aumento de la emisión de la sonda. Por otra parte, a largos tiempos de irradiación la chance de ver algún efecto fotoprotectivo de β -caroteno, sería mucho menor.

En las imágenes de las Figuras 2B, 2C, 2D, 2E y 2F, el daño celular es evidente, en mayor o menor medida, en todos los casos en los que se irradió en presencia de PPa. Sin embargo, cuando graficamos la proporción de generación de ROS (principalmente grupos peróxidos), como $(I_t - I_0)/(I_{\text{máx}} - I_0)$ (Figura 3), donde I_t es la intensidad de emisión al tiempo t , $I_{\text{máx}}$ es el máximo de emisión alcanzado e I_0 es la intensidad de emisión inicial, observamos que las velocidades de formación de ROS disminuyen con el agregado de β -caroteno, siendo la mínima encontrada para 15 μM , pero no encontrando emisión de la sonda para la adición de β -caroteno 20 μM (Figura 2F). Estos resultados son consistentes con los ensayos de toxicidad inherente de β -caroteno realizados con Tripán Blue sobre células HeLa (Capítulo 5), donde se encontró que a concentraciones mayores de 15 μM , el β -caroteno comenzaba a ejercer su acción pro-oxidante, lo que en este caso se verificaría suponiendo que la descomposición acelerada de la sonda, que ya no permite cuantificar su emisión, se debe tanto a las especies generadas por PPa, como a la actividad pro-oxidante del caroteno.

Por último concluimos que en la irradiación fotosensibilizada de PPa, se genera, no sólo oxígeno singlete, sino otras ROS, tales como peróxidos, y que la producción de éstas puede ser desacelerada a tiempos de irradiación cortos en presencia de caroteno a concentraciones subtóxicas (hasta 15 μM).





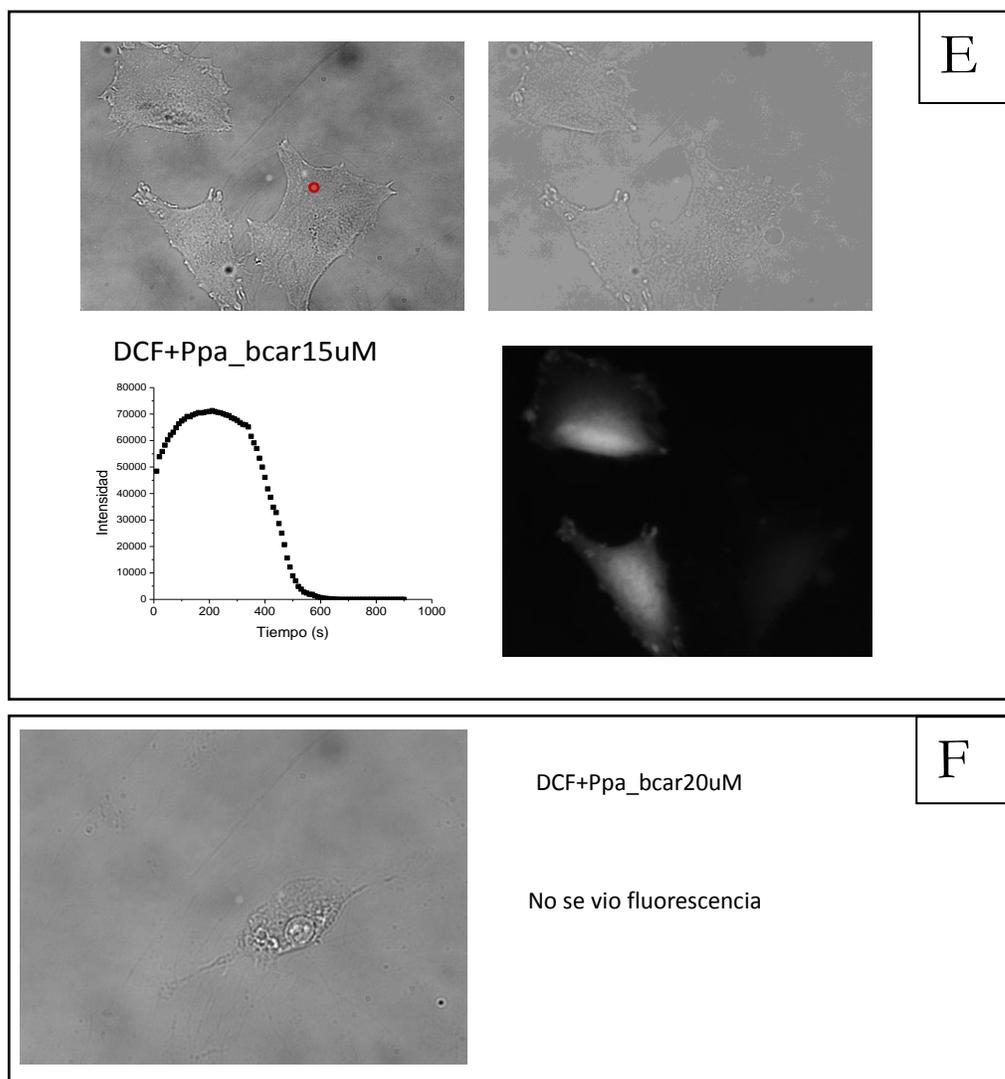


FIGURA 2: A: Se muestra en la parte superior imágenes de campo claro antes (izquierda) y después (derecha) de la irradiación, cuya localización se denota con un punto rojo en el área rica en mitocondrias de la célula. En la parte inferior vemos el monitoreo de la emisión de la sonda ($\lambda_{em} = 535$ nm) durante el tiempo de irradiación (izquierda) y una imagen de fluorescencia de la emisión de la sonda oxidada (DCF) al término de la irradiación (derecha). B, C, D, E, F y G: ídem A pero con el agregado de β -caroteno $5\mu\text{M}$, β -caroteno $5\mu\text{M}$ + PPa, β -caroteno $10\mu\text{M}$, β -caroteno $15\mu\text{M}$ + PPa, PPa y β -caroteno $20\mu\text{M}$ + PPa, respectivamente.

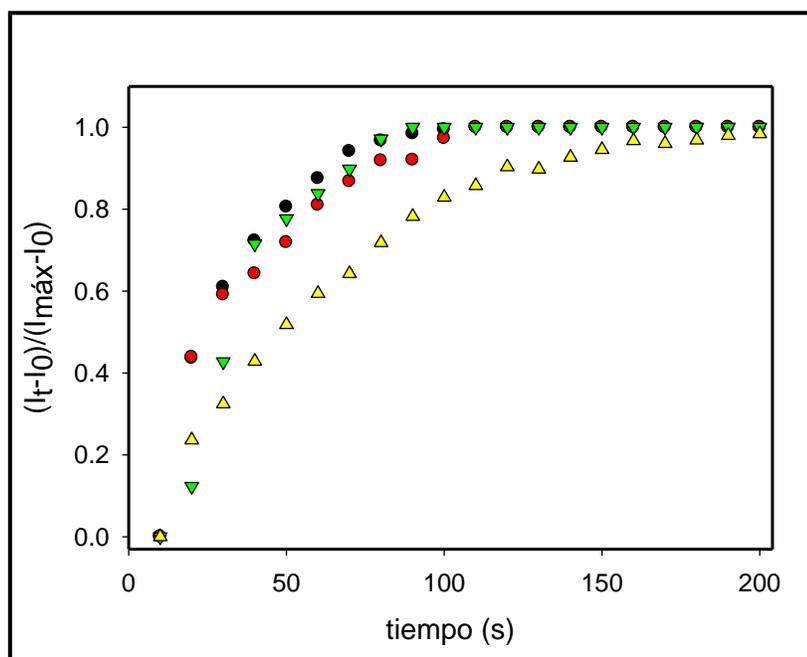


FIGURA 3: Intensidad de emisión relativa de la sonda DCF, $(I_t - I_0) / (I_{\text{máx}} - I_0)$, en función del tiempo de irradiación en presencia del fotosensibilizador PPa y 0 (∇), 5 (\bullet), 10 (\bullet) y 15 (\blacktriangle) μM de β -caroteno. I_t es la intensidad de emisión al tiempo t , $I_{\text{máx}}$ es el máximo de emisión alcanzado e I_0 es la intensidad de emisión inicial.

En células HL-60:

Posteriormente se adaptó el experimento para realizarlo sobre células en suspensión HL-60. En este caso las medidas de fluorescencia se realizaron en celdas de emisión termostabilizadas a 37°C y mantenidas con agitación durante todo el tiempo de medida (1h). La irradiación del sensibilizador se realizó en las suspensiones celulares previamente incubadas con éste en las mismas condiciones ya descritas anteriormente. Luego fueron incubadas con la sonda DCFH-DA en oscuridad y previo lavado del medio con ABM se procedió a registrar la emisión en el tiempo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.

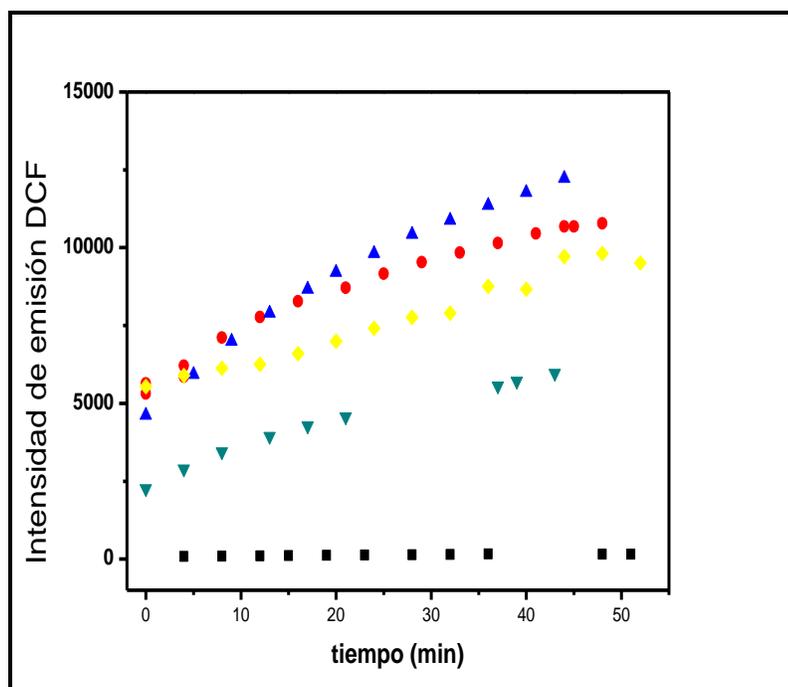


FIGURA 4: Emisión de DCF en función del tiempo de suspensiones de células HL-60 incubadas con PPa, irradiadas en ausencia de β -caroteno (●) y con el agregado de β -caroteno $5\mu\text{M}$ (▲), $10\mu\text{M}$ (▼) y $15\mu\text{M}$ (◆); y células no expuestas al sensibilizador (■).

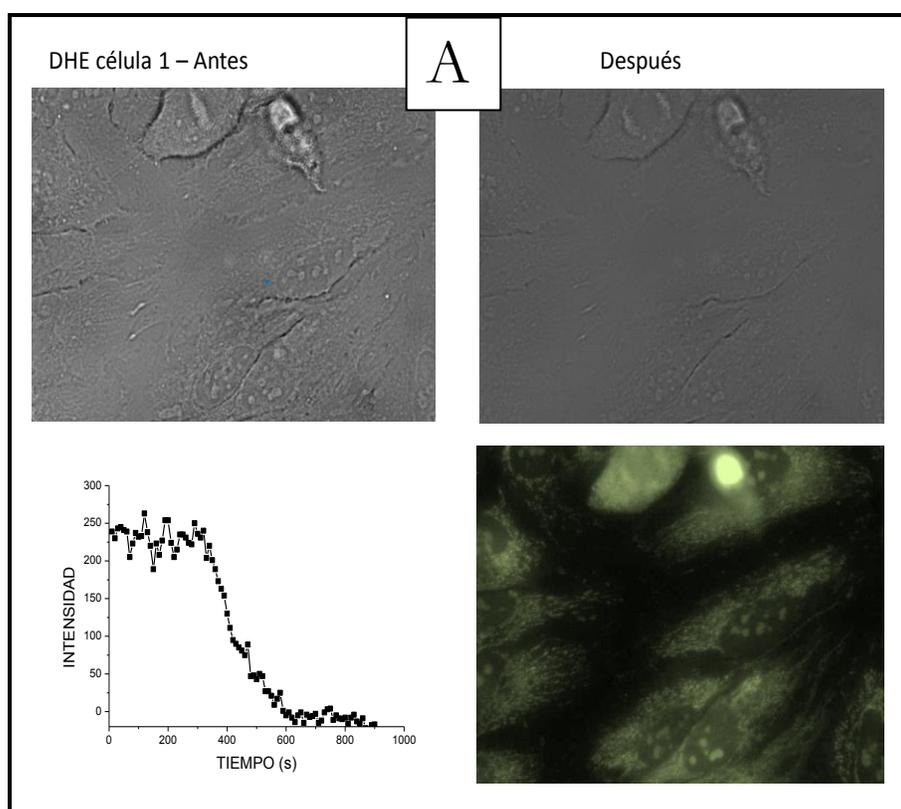
En este caso, la concentración óptima de β -caroteno para evidenciar un efecto antioxidante es $10\mu\text{M}$. Cuando se aumenta la cantidad del carotenoide los niveles iniciales de DCF son semejantes a los del control sin caroteno. Luego la velocidad de producción parece disminuir, pero el efecto protectorio no es tan evidente como para $10\mu\text{M}$. Esta observación está en línea con la mayor susceptibilidad que poseen las células HL-60 respecto de las HeLa a la actividad pro-oxidante del carotenoide, demostrado anteriormente en esta tesis y en trabajos de literatura (22).

Ensayos con DHE

Con el fin de poner en evidencia qué tipo de ROS están involucradas en el tratamiento fotodinámico con PPa (de naturaleza lipofílica al igual que β -caroteno), más allá del oxígeno singlete, se probó la sonda DHE, específica de radical anión superóxido, en células HeLa con y sin el sensibilizador.

La Figura 5A muestra en la parte superior imágenes de campo claro antes (izquierda) y después (derecha) de la irradiación, cuya localización se denota con un punto azul en el área rica en mitocondrias de la célula. En la parte inferior vemos el monitoreo de la emisión de la sonda ($\lambda_{em} = 620\text{ nm}$) durante el tiempo de irradiación (izquierda) y una imagen de fluorescencia de la emisión de la sonda al término de la irradiación (derecha).

En la Figura 5B se observan imágenes análogas a la Figura 5A, pero con el agregado de PPa. De estas figuras podemos ver que sin la presencia del sensibilizador, las imágenes de campo claro no difieren antes y después de la irradiación, es decir, no se observan signos de daño celular. Hay una degradación importante de la sonda y su imagen de fluorescencia posee una intensidad baja. Cuando se agrega el sensibilizador los cambios morfológicos son evidentes en la célula irradiada (formación de burbujas, condensación de la cromatina, apariencia granular del citoplasma y mayor definición de la membrana nuclear). En el sitio de irradiación, la sonda se banquea (disminuye su emisión con el tiempo) pero a una velocidad mucho menor que sin el sensibilizador y la intensidad de fluorescencia general en la microfotografía de las células teñidas con la sonda es mayor.



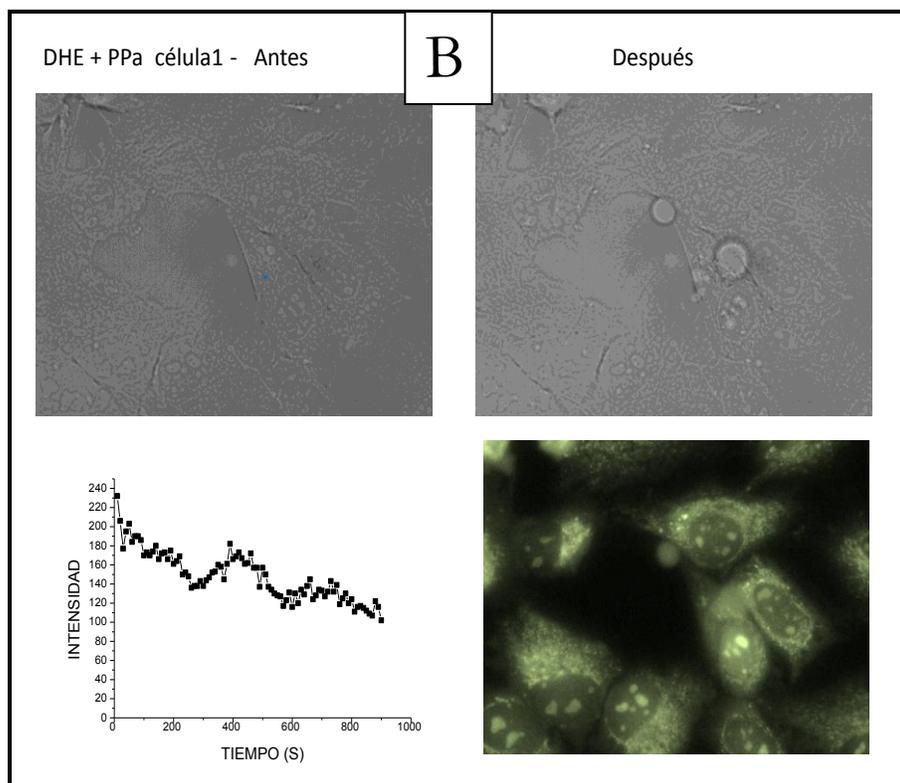


FIGURA 5: **A:** muestra en la parte superior imágenes de campo claro antes (izquierda) y después (derecha) de la irradiación, cuya localización se denota con un punto azul en el área rica en mitocondrias de la célula. En la parte inferior vemos el monitoreo de la emisión de la sonda ($\lambda_{em} = 620$ nm) durante el tiempo de irradiación (izquierda) y una imagen de fluorescencia de la emisión de la sonda al término de la irradiación (derecha). **B:** ídem A pero con el agregado de PPa $20\mu\text{M}$.

La Tabla 2, resume los resultados cuantificados por intensidad de fluorescencia de DHE en diferentes dominios subcelulares. Claramente se observa un aumento en la fluorescencia de todos los dominios subcelulares luego de la terapia fotodinámica. Esto muestra la producción de anión radical superóxido por la fotosensibilización de PPa. Los nucléolos se muestran como los más sensibles a la sonda.

El menor aumento se da justo en el sitio de irradiación (punto del láser), ya que se suma el efecto de blanqueamiento de la sonda, no así en los otros dominios celulares. A veces, es posible observar la aparición de una perturbación en la imagen de campo brillante de una célula en el sitio donde el láser fue enfocado (23). Los primeros cambios estructurales durante el tratamiento fotodinámico suelen observarse en esta ubicación debido a la resolución espacial del experimento.

<i>Muestra</i>	<i>Núcleo</i>	<i>Nucleolos</i>	<i>Citoplasma</i>	<i>Posición del laser</i>
DHE	463	1214	1056	0
DHE + PPa	1795	4035	1356	110

TABLA 2: intensidad de fluorescencia, (promedio de al menos 4 muestras) de DHE en diferentes dominios subcelulares seleccionados de áreas semejantes.

Ensayos con Thiol Tracker

Para analizar la citotoxicidad inherente del β -caroteno en oscuridad encontrada por medio de otros ensayos, analizamos el estado redox de las células expuestas a diferentes concentraciones del carotenoide con el uso de la sonda Thiol Tracker. Para ello se tomaron imágenes de fluorescencia de las células HeLa incubadas con la sonda, luego de una incubación previa con el carotenoide en las mismas condiciones que el resto de los experimentos de esta tesis.

Los resultados se listan en forma resumida en la Tabla 3. Los valores tabulados se calcularon a partir de la intensidad global de fluorescencia de cada célula normalizada por el área de las distintas células promediadas en el análisis, a este valor se le restó un factor de corrección por fluorescencia de fondo. En la Figura 6, a modo de ejemplo, encontramos que las fotos de fluorescencia son más intensas luego del agregado del caroteno. Todos estos son indicios de que el β -caroteno mejora el estado redox celular, es decir aumenta los niveles de GSH reducido intracelular pero a bajas concentraciones. En este contexto, el carácter prooxidante del carotenoide puede minimizarse y se evidencia sólo en concentraciones mayores a 20 μ M, para este tipo celular.

<i>Muestra</i>	<i>Fluorescencia normalizada</i>
Control (sólo células)	1003
Control negativo (dietil-maleato: DEM 1mM)	820
β -caroteno 5 μ M	1483
β -caroteno 10 μ M	1100
β -caroteno 15 μ M	1515
β -caroteno 20 μ M	465

TABLA 3: Fluorescencia de Thiol Tracker en HeLa con distintas concentraciones de β -caroteno.

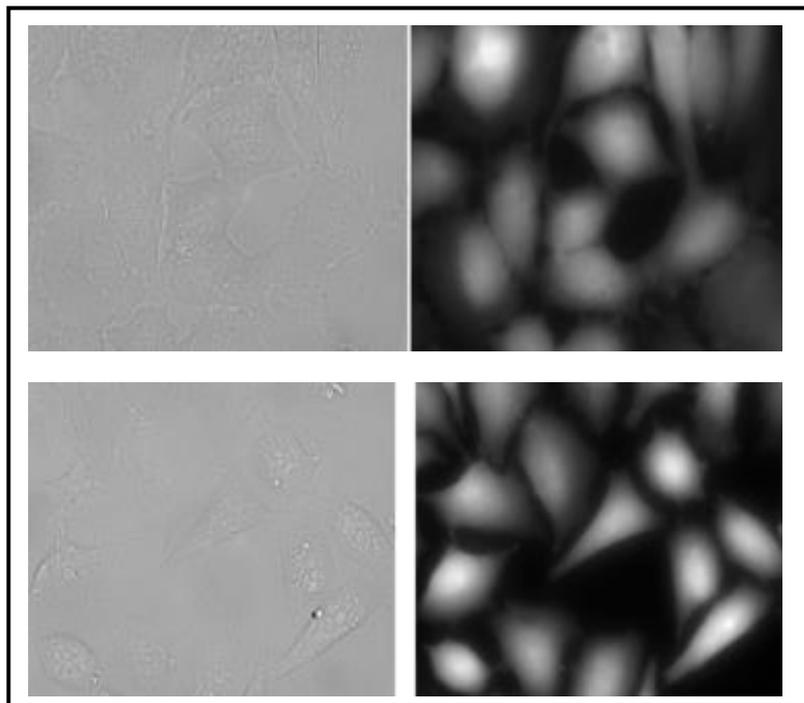


FIGURA 6: Imágenes de campo claro (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de la sonda Thiol Tracker, en células HeLa incubadas sin (arriba) y con β -caroteno 10 μM .

Conclusiones

Durante el tratamiento fotodinámico se ha observado, por medio de diferentes sondas fluorescentes, que más allá de la producción de oxígeno singlete se generan otras ROS. En particular se ha evidenciado la formación de peróxidos y anión radical superóxido. El β -caroteno podría actuar como una trampa de estas ROS, especialmente a concentraciones bajas donde predomina su actividad antioxidante y efecto fotoprotectivo. A concentraciones $\geq 20 \mu\text{M}$ se rompe el equilibrio de balance redox intracelular, tal como lo pudimos observar con la sonda Thiol Tracker.

Queda demostrado en este trabajo que β -caroteno puede actuar como un agente redox intracelular, a través de la protección contra los radicales libres en algunas circunstancias y la promoción de la formación de radicales libres en otras de acuerdo con datos reportados (22, 24, 25).

Esta modulación del estado redox intracelular es un evento importante en la regulación de procesos celulares y en el control del crecimiento de la célula, así como en la apoptosis (26).

Referencias

- (1) Hatefi, Y., *Annu Rev Biochem.* 1985, 54, 1015-1069.
- (2) Boveris, A. & Chance, B. *Biochem J.* 1973, 134, 707-716.
- (3) Freeman, B.A. & Crapo, J.D. *Lab Invest.* 1982, 47, 412-426.
- (4) Pryor, W.A. & Godber, S.S., *Free Radic Biol Med.* 1991, 10, 177-184
- (5) Mills, E.M. *J Biol Chem.* 1998, 273, 22165-22168.
- (6) Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K. & Finkel, T. *Science.* 1995, 270, 296-299.
- (7) Jakubowski, W. & Bartosz, G, *Int J Biochem Cell Biol.* 1997, 29, 1297-1301.
- (8) Gabriel C, Camins A, Sureda F X, Aquirre L, Escubedo E, Pallas M, Camarasa J. *J Pharmacol. Toxicol. Methods.* 1997; 38, 93-98.
- (9) Possel, H., Noack, H., Augustin, W., Keilhoff, G. & Wolf, G. *FEBS Lett.* 1997, 416, 175-178.
- (10) Cathcart, R., Schwierts, E. & Ames, B.N., *Anal Biochem.* 1983, 134, 111-116.
- (11) Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Mari, M., Morales, A. & Fernandez-Checa, J.C., *J Biol Chem,* 1997, 272, 11369-11377.
- (12) Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C. & Miller, R.J., *J Neurosci.* 1996, 168, 1324-1336.
- (13) Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. *J Biol Chem.* 2003, 7, 8516-8525.
- (14) Rivera, A. & Maxwell, S.A., *J Biol Chem.* 2005, 280, 29346-29354.
- (15) Rothe, G. & Valet, G., *J Leukoc Biol.* 1990, 47, 440-448.
- (16) Carter, W.O., Narayanan, P.K. & Robinson, J.P. *J Leukoc Biol.* 1994, 55, 253-258.
- (17) Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102, 5727-5732.
- (18) Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2006, 103, 15038-15043.

- (19) Bucana, C., Saiki, I. & Nayar, R. Uptake and accumulation of the vital dye hydroethidine in neoplastic cells. *J Histochem Cytochem.* 1986, 34, 1109-1115.
- (20) Mandavilli, B. S. and Janes M. S. *Current Protocols in Cytometry*, John Wiley & Sons, Inc. 2001.
- (21) King, B.A. and Oh D.H. *Photochem. Photobiol.*, 2004, 80, 1-6.
- (22) Palozza P., *Nutr Rev.* 1998; 56, 257-265.
- (23) Gollmer A., Besostri F., Breitenbach T., *Free Rad. Res.* 2013, 47, 718-730.
- (24) Burton GW, Ingold KU. *Science.* 1984; 224, 569-573.
- (25) Schwartz JL. , *J Nutr.* 1996, 126, 1221S-227S.
- (26) Jacobson MD. *TIBS* 1996, 21, 83-86.

Conclusiones Generales

A pesar de las expectativas basadas en estudios anteriores, en los experimentos de fosforescencia de oxígeno singlete resueltos en el tiempo mediante el empleo de sensibilizadores hidrófilos e hidrófobos, no se observó un efecto mediado por β -caroteno, en el curso de vida del $O_2(a^1\Delta_g)$ intracelular. Esto puede explicarse teniendo en cuenta en primer lugar, que el tiempo de vida del $O_2(a^1\Delta_g)$ en una célula incubada en D_2O es ~ 15 - $35 \mu s$, dependiendo de las condiciones de medida (1, 2). A su vez, esto implica que la distancia en la cual el $O_2(a^1\Delta_g)$ difunde desde su producción donde se encuentra el sensibilizador, está limitada a ~ 230 - 350 nm durante 3 tiempos de vida para un coeficiente de difusión de $2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (1,3). Esta distancia será sensiblemente más corta en células incubadas en H_2O en las que el tiempo de vida del $O_2(a^1\Delta_g)$ es menor $\sim 3 \mu s$. (1,2). Teniendo en cuenta las concentraciones y distribuciones del sensibilizador y el β -caroteno en la célula y dado que estas moléculas más grandes estarán relativamente inmóviles en el medio ambiente intracelular viscoso (3,4), la probabilidad de la colisión requerida entre un número suficiente de moléculas de $O_2(a^1\Delta_g)$ y β -caroteno es probable que sea pequeña.

Nuestra observación de que el β -caroteno no altera el tiempo de vida del $O_2(a^1\Delta_g)$ en células HeLa y células HL-60, denota una aparente contradicción con dos trabajos publicados en 1993-1994 (5, 6). En estos estudios, en los que se realizaron medidas de fosforescencia de $O_2(a^1\Delta_g)$ con linfocitos humanos, fueron observados cambios en el tiempo de vida del $O_2(a^1\Delta_g)$ dependientes de la concentración de β -caroteno. Sin embargo, estos primeros estudios se caracterizaron por tres condiciones: (I) se utilizó un derivado soluble en agua de β -caroteno, (II) sólo fueron utilizados sensibilizadores de $O_2(a^1\Delta_g)$ solubles en agua, y (III) los datos se registraron a partir de suspensiones celulares. Sobre la base de lo que se conoce acerca del monitoreo del $O_2(a^1\Delta_g)$ a través de datos de fosforescencia de estos sistemas, en contraste para mediciones de $O_2(a^1\Delta_g)$ a nivel unicelular (2), sin duda, es razonable sugerir que las observaciones reportadas en estos estudios anteriores reflejan el comportamiento del $O_2(a^1\Delta_g)$ extracelular. Por otra parte, en trabajos del

Prof. Ogilby se ha demostrado que el $O_2(a^1\Delta_g)$ extracelular puede ser también citotóxico (7, 8). Por lo tanto, es razonable señalar que el β -caroteno extracelular soluble en agua es capaz de impartir un efecto protector contra el $O_2(a^1\Delta_g)$ extracelular y que este efecto podría correlacionarse con la capacidad de β -caroteno para desactivar $O_2(a^1\Delta_g)$.

Existe literatura suficiente que reporta los efectos fotoprotectores del β -caroteno en células mamíferas, por lo que a la luz de nuestros resultados, su acción antioxidante no involucraría al $O_2(a^1\Delta_g)$. Adicionalmente, el efecto fotoprotectivo en concentraciones incorporadas del orden de $10 \mu\text{M}$ fue demostrado en esta tesis con distintos tipos de células atacando el problema desde distintos ángulos. Es importante destacar que los experimentos de detección de $O_2(a^1\Delta_g)$ resueltos en el tiempo, se realizaron utilizando medios de cultivos en D_2O en los cuales, debido al mayor tiempo de vida del $O_2(a^1\Delta_g)$, la célula se hace más susceptible a los agregados de β -caroteno. Sin embargo, los experimentos realizados para evaluar la fotoprotección de β -caroteno, sí se realizaron usando medios de cultivo en H_2O en los cuales el tiempo de vida del $O_2(a^1\Delta_g)$ es mucho más corto y los efectos serán posiblemente menos citotóxicos. De este modo, como observamos efectos fotoprotectores de β -caroteno, pero no vemos cambios en el tiempo de vida del oxígeno singlete, podemos inferir que el principal mecanismo de acción de β -caroteno tenga implicaciones probablemente en la captura de radicales también producidos como consecuencia de la irradiación del sensibilizador en reacciones posteriores a la generación de $O_2(a^1\Delta_g)$. De hecho, se sabe de literatura que β -caroteno muestra en solución este tipo de comportamiento químico (9, 10). Por otra parte, un precursor radical dado como consecuencia de una reacción con $O_2(a^1\Delta_g)$ (por ejemplo, un hidropéroxido, ROOH) puede difundir a través de una mayor distancia que $O_2(a^1\Delta_g)$ y por lo tanto tener una mayor probabilidad de encuentro con el β -caroteno. La participación radicalaria en el efecto fotoprotectivo del β -caroteno fue demostrada en este trabajo de tesis mediante el uso de distintas sondas (Thiol Tracker, DHE, DCFH-DA).

Se obtuvieron resultados por monitoreo del decaimiento de $O_2(a^1\Delta_g)$ en presencia de β -caroteno en liposomas que fueron interpretados en términos del modelo de pseudofase. Este tipo de estudios realizados en sistemas modelo de medios biológicos muestra que el reparto del carotenoide y el sensibilizador, así como la presencia de componentes proteicos como la BSA afectan la dinámica de desactivación de oxígenos singlete por el quencher hidrófobo. Sin embargo, no es erróneo pensar que la extrapolación de este modelo a una célula viva no es una tarea sencilla.

Por último: hay que recordar que los carotenoides pueden desactivar al precursor triplete del fotosensibilizador por transferencia de energía. Así, por ejemplo en la protección de los organismos fotosintéticos, los carotenoides pueden actuar de quenchers tanto del triplete de las clorofilas como del oxígeno singlete (9). Un

mecanismo de este tipo en células mamíferas conduciría también a un efecto fotoprotectivo que no involucra ni al oxígeno singlete ni a radicales libres.

Al abordar este tema sentimos que nos iniciábamos en un camino apasionante, concientes de que ese sería el comienzo. Hoy seguimos empeñados, sabiendo que hay mucho por dilucidar y determinar, incluyendo el conocimiento de un potencial redox de los carotenoides, los tiempos de vida y reactividad de los radicales carotenoides en entornos biológicos; los mecanismos precisos pro y antioxidantes, las interacciones con otros antioxidantes, etc. Para esto creemos que debemos abordarlo desde distintos ángulos para establecer la implicancia relativa de los integrantes del sistema y ver la posibilidad de establecer el mecanismo íntimo de acción y su interrelación.

Deseamos que esta pequeña contribución al tema sirva de estímulo propio y de otros grupos para entre todos poder encontrar alguna luz en la relación con ciertas patologías médicas (efectos benéficos o deletéreos), e incluso con el envejecimiento celular.

Referencias

- (1) Ogilby, P. R. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 3181-3209.
- (2) Silva, E. F. F.; Pedersen, B. W.; Breitenbach, T.; Toftegaard, R.; Kuimova, M. K.; Arnaut, L. G.; Ogilby, P. R. *J. Phys. Chem. B* 2012, 116, 445-461.
- (3) Hatz, S.; Poulsen, L.; Ogilby, P. R. *Photochem. Photobiol.* 2008, 84, 1284-1290.
- (4) Kuimova, M. K.; Botchway, S. W.; Parker, A. W.; Balaz, M.; Collins, H. A.; Anderson, H. L.; Suhling, K.; Ogilby, P. R. *Nat. Chem.* 2009, 1, 69-73.
- (5) Bohm, F.; Haley, J.; Truscott, T. G.; Schalch, W. J. *Photochem. Photobiol.*, B 1993, 21, 219-221.
- (6) Tinkler, J. H.; Böhm, F.; Schalch, W.; Truscott, T. G. J., *Photochem. Photobiol.*, B 1994, 26, 283-285.
- (7) Pedersen, B. W.; Sinks, L. E.; Breitenbach, T.; Schack, N. B.; Vinogradov, S. A.; Ogilby, P. R. *Photochem. Photobiol.* 2011, 87, 1077-1091.
- (8) Pimenta, F. M.; Jensen, R. L.; Holmegaard, L.; Esipova, T. V.; Westberg, M.; Breitenbach, T.; Ogilby, P. R. *J. Phys. Chem. B.* 2012, 116, 10234-10246.
- (9) Edge, R.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G. J. *Photochem. Photobiol. B.* 1997, 41, 189-200.
- (10) Farmilo, A.; Wilkinson, F. *Photochem. Photobiol.* 1973, 18, 447-450.

Apéndice

1

CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DEL BETA CAROTENO EN UNA CÉLULA

En literatura se muestran incubaciones con β -caroteno en diferentes tipos celulares (Figura 1): fibroblastos de pulmón embrionarios humanos (HILF, \blacktriangle), incubados con β -caroteno durante 8h, WI-38 (también una línea de fibroblastos de pulmón (Δ), durante 8h) y células hBRIE-380 (híbrido Berkeley Rata λ epitelial intestinal, 16h). En estos casos la concentración estimada fue de 460 pmol, 690 pmol y 1020 pmol por cada 10^6 células, respectivamente (4). Como puede verse en la Figura 1 existe una correlación entre la concentración del carotenoide en el medio de incubación y la cantidad incorporada por célula.

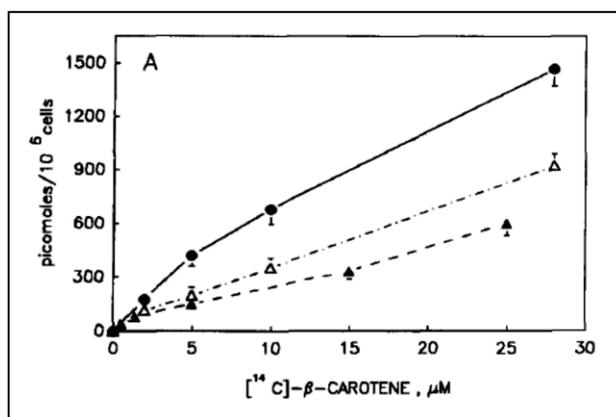


FIGURA 1: Concentración de β -caroteno incorporada a diferentes concentraciones de incubación para 3 tipos celulares diferentes. (4).

El análisis por HPLC realizado durante este trabajo de tesis, da un valor superior a la anterior estimación (4.2×10^{-8} mol en 4×10^6 células (10 nmol / 10^6 células), pero las condiciones experimentales no fueron las mismas que las empleadas para obtener los datos de la Figura 1 (la línea celular, el tiempo de incubación, etc.).

Teniendo en cuenta que el diámetro de una célula HeLa en suspensión es de 15 - 20 micras, el volumen es $\frac{4}{3} r^3 \pi \approx 1.700$ a $4.200 \mu\text{m}^3$, es decir de 1,7 a 4,2 pL. Por otra parte el tamaño y forma de las células HeLa son tal vez más comparables a los de las células epiteliales intestinales, por lo tanto podrían contener 1.100 pmoles/ 10^6

células, lo que significa 1,1 fmol en 1 célula y se traducen en 9.1 a 2.6×10^{-4} mol / L dentro de una célula.

Si miramos la composición química aproximada de una célula de *E. coli* Tabla 1 (5), ésta no varía mucho respecto de la composición de cualquier célula mamífera.

Material	%Total peso seco	Moléculas/Célula
Agua	70	1
Ácidos nucleicos		
DNA	1	1
RNA	6	
Ribosomal		3
De Transferencia		40
Mensajero		1000
Nucleótidos y metabolitos	0.8	200
Proteínas	15	2000-3000
Aminoácidos y metabolitos	0.8	100
Polisacáridos	3	200
Lípidos y metabolitos	2	50
Iones Inorgánicos (mayoría de los minerales y elementos traza)	1	20
Otros	0.4	200

TABLA 1: Composición química aproximada de una célula de *E. coli*. (5)

A partir de esta composición podemos suponer dos cosas:

- Si el 70% es agua, esto conduce a una concentración de β -caroteno en el resto de la célula: Volumen de componentes que no son agua: $\sim 0,5-1,26$ pL. Entonces, la concentración de β -caroteno irá de 2,2 mM a 0.261mM

- La porción de los ácidos nucleicos (1 + 6%) y la de nucleótidos y metabolitos (0,8%), así como los iones inorgánicos (1%) podrían ser restados, lo que resulta en 79% como peso húmedo excluido.

Incluso cuando sólo el 2% del peso húmedo total sea de lípidos, hay que tener en cuenta que, por ejemplo, la membrana mitocondrial interna se compone de 76% de proteína, otras membranas tienen sólo un contenido de proteína del 30% (2). Además, el volumen que se forma entonces por la estructura de los lípidos / proteínas es muy difícil de estimar. Se puede estimar, que las mezclas de lípidos / colesterol producen un volumen específico de 0,99 a 1,0 mL/ g de lípido (1). Pero luego, la cantidad exacta de lípidos y la fracción proteica es desconocida. Esta última sólo se puede suponer en un promedio de 50%.

Así que una fracción de ~ 4% podría ser elegido como% en peso húmedo, con una masa de una célula entre 2 y 5 ng (3), igual a 80 a 200 pg, esto da un volumen- lípido promedio de 80 a 200 fL, resultando en una concentración de 13 - 5,5 mM.

Todas estas especulaciones indicarían que nuestras suposiciones en el capítulo 2 son correctas porque todo es mayor que 1µM.

Referencias

- (1) Greenwood, A. I., Tristram-Nagle S. and Nagle J. F. Chemistry and Physics of Lipids. 2006, 143, 1-10.
- (2) Lodish, H., Berk A., Kaiser C. A, Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H. and Matsudaira P. Molec. Cell Biol. 2007, W. H. Freeman.
- (3) Park, K., Jang J., Irimia D., Sturgis J., Lee J., Robinson J. P., Toner M. and Bashir R. Lab on a Chip. 2008, 8, 1034-1041.
- (4) Scita, G., Aponte G. W. and Wolf G. J. Nut. Biochem. 1992, 3, 118-123.
- (5) Watson, J. Molecular Biology of the Gene. Pearson Education. 2004.

2

SENSIBILIZADORES HIDROFÓBICOS FLUORO-CLORINA Y TPPCOOME

5,10,15,20-tetraquis (2,6-difluoro-5-N-metilsulfamifenil)-clorina: (FCh)

Este compuesto fue recibido como una donación de Luzitin SA, Portugal. El análogo estructural más cercano de FCh cuya síntesis se ha publicado es una clorina que tiene un solo átomo de F por grupo fenilo (6). La caracterización fotofísica de este análogo estructural también ha sido publicado (7).

Metil-4-(10,15,20-trifenil-21H, 23H-porfirina-5-il)-benzoato, (TPPCOOMe)

(también conocido como 5-(4-metoxicarboxifenil)-10,15,20-trifenil-21H, 23H-porfirina)

Este compuesto se preparó siguiendo un procedimiento publicado (8, 9) excepto que la relación de los reactivos metilo 4-formilbenzoato: benzaldehído: 1H-pirrol se ajustó a 01:12:16 lo que permitió un rendimiento de producto mucho mayor de 47%.

Referencias

- (1) Pereira, M. M.; Abreu, A. R.; Goncalves, N. P. F.; Calvete, M. J. F.; Simoes, A. V. C.; Monteiro, C. J. P.; Arnaut, L. G.; Eusebio, M. E.; Canotilho, J. *Green Chem.* 2012, 14, 1666-1672.
- (2) Monteiro, C. J. P.; Pina, J.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012, 11, 1233-1238.
- (3) Matsumoto, J.; Matsumoto, T.; Senda, Y.; Shiragami, T.; Yasuda, M. J. *Photochem. Photobiol. A. Chem.* 2008, 197, 101-109.
- (4) Lindsey, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. J. *Org. Chem.* 1987, 52, 827-836.
- (5) Dixon, J. M., M. Taniguchi and J. S. Lindsey. *Photochem. Photobiol.* 2005, 81, 212-213.

3

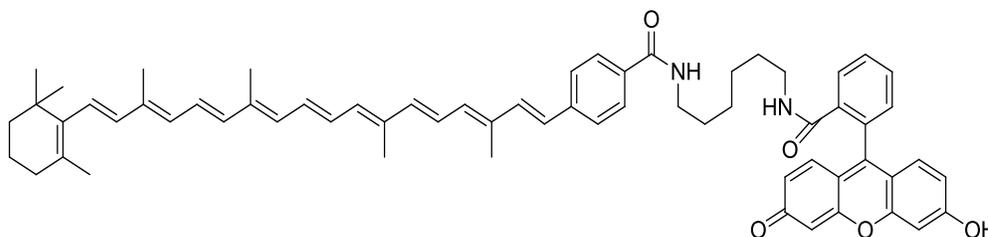
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

FOTOFÍSICA DEL ADUCTO β -CAROTENO/FLUORESCEÍNA (CF)

Con la colaboración de la Dra. F. Blaikie, se logró la síntesis y caracterización de un compuesto covalente que contiene un grupo carotenoide y otro derivado de la fluoresceína, cuyas propiedades de emisión son similares a las de la fluoresceína y que es capaz de desactivar al $O_2(a^1\Delta_g)$ molecular con una constante de quenching similar a la de los carotenoides libres. El aumento del rendimiento cuántico de emisión con respecto al del carotenoide libre permite una mejor localización en experimentos de microscopía de fluorescencia. Esto se ve claramente en las fotos mostradas en el Capítulo 2, donde se ve que la intensidad de fluorescencia de CF es mayor que la del caroteno libre y la localización de CF en la célula es más amplia, es decir por su naturaleza anfifílica no sólo lo observamos en las estructuras membranosas del citoplasma, sino también en el núcleo.

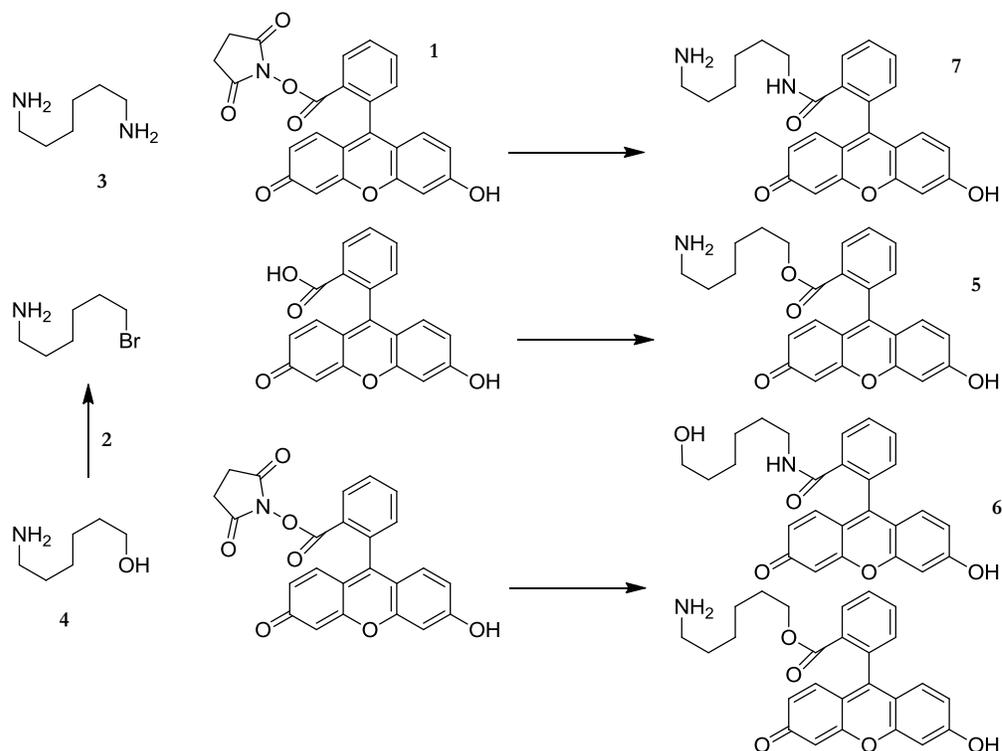
Síntesis de CF

Compuesto diana: conjugado de un carotenoide terminalmente diferenciado con un derivado de fluoresceína:



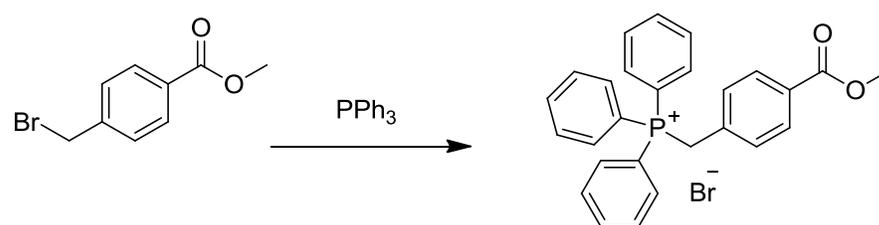
Reacciones:

1. Se busca el compuesto **7**, según siguiente esquema:



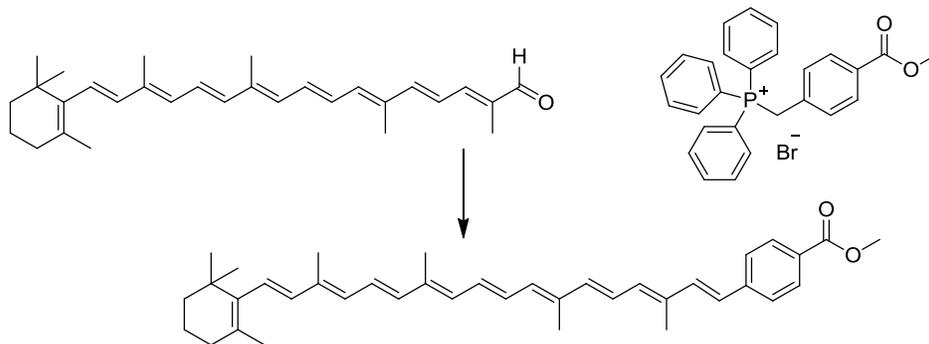
El compuesto de fluoresceína **1** ha sido reportado en procedimientos de conferencias (CAS 135795-62-9), pero no su método de síntesis o caracterización. Las condiciones fueron EDAC o DCC/AcCN/18 h / RT. NB.

Condiciones para la reacción con la diamina **3**: fue necesario restringir estequiometría para obtener sólo mono fluoresceína (producto **7**).



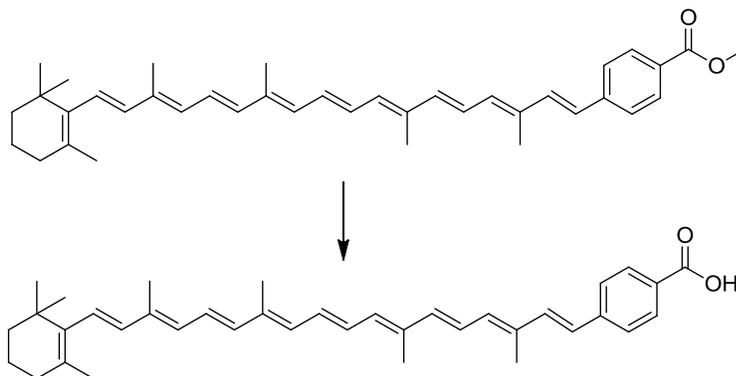
- CAS 2417-72-3, 5 g., metil (4-bromometil)benzoato.
Condiciones: trifenilfosfina, fundir, rendimiento $\geq 97\%$.

3.



Carotenal, (trans- β -Apo-8'-carotenal) CAS 1107-26-2, 1 g. Tolueno, NaH, MeOH, reactivos, reflujo, argon, 1 h, Si gel, elución con tolueno, 1era fracción, cristalizada a partir de DCM/MeOH, 94%.

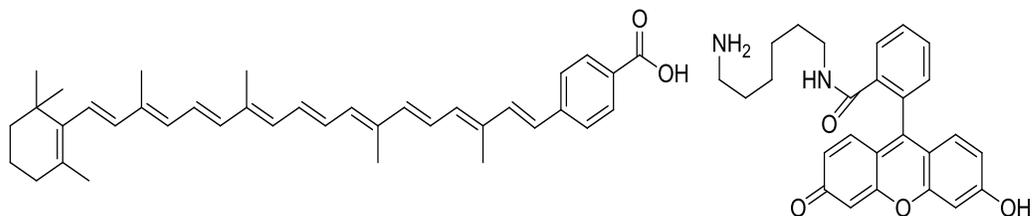
4.



THF/MeOH (3:1), KOHaq. (10%), 18 h, 91%.

5.

Conjugación de carboxi-caroteno y derivado de fluoresceina usando EDAC o DCC., previa activación del ácido carboxílico como un derivado NHS.



Caracterización fotofísica de CF en la solución

Las mediciones de fluorescencia se hicieron con un espectrofluorómetro Jobin Yvon-Spex Fluorolog (modelo FL3-11) equipado con una lámpara de estado estacionario de Xe como fuente de excitación.

Para los experimentos realizados para determinar el rendimiento cuántico de generación de $O_2(a^1\Delta_g)$ y la constante de extinción total de $O_2(a^1\Delta_g)$ por CF, k_T , la fosforescencia del $O_2(a^1\Delta_g)$ se midió a 1270 nm. El tercer armónico de un láser Nd:YAG Surelite II Continoum (7 ns FWHM y 20 mJ por impulso a 355 nm) se utilizó como la fuente de excitación. La radiación emitida se detectó en ángulo recto, usando un amplificado Judson J 116/8sp detector de germanio (diámetro 5 mm) después de pasar a través de filtros apropiados. Para medir k_T , TPP ($A^{355} = 0,5$) se utilizó como sensibilizador.

La Figura 1 muestra el espectro de absorción de CF en THF. Las matrices de excitación-emisión de CF y fluoresceína se muestran en la Figura 2. Como puede verse en la figura los pares de excitación-emisión están situados a 520 nm/550 nm y 490 nm/514nm para CF y fluoresceína, respectivamente. Se emplearon dos solventes diferentes para la obtención de las matrices debido a limitaciones de solubilidad. Sin embargo, se encontró una localización similar de los máximos y forma de las matrices, lo que confirma que la emisión observada en CF es debido a la fracción de fluoresceína.

El rendimiento cuántico de fluorescencia de CF ($\Phi_F = 0,033 \pm 0,007$) obtenido en $\lambda_{exc} = 460$ nm, es menor que el de fluoresceína en medio alcalino acuoso (0,1 M NaOH) a la misma longitud de onda de excitación ($\Phi_F = 0,92 \pm 0,01$) [7]. El valor de rendimiento cuántico de generación de $O_2(a^1\Delta_g)$ por CF medido fue $0,42 \pm 0,04$.

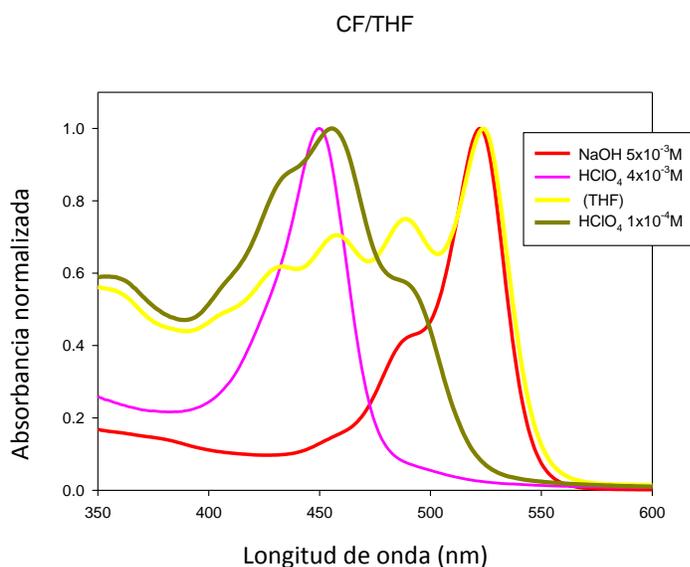


FIGURA 1: Espectro de absorción de CF en THF.

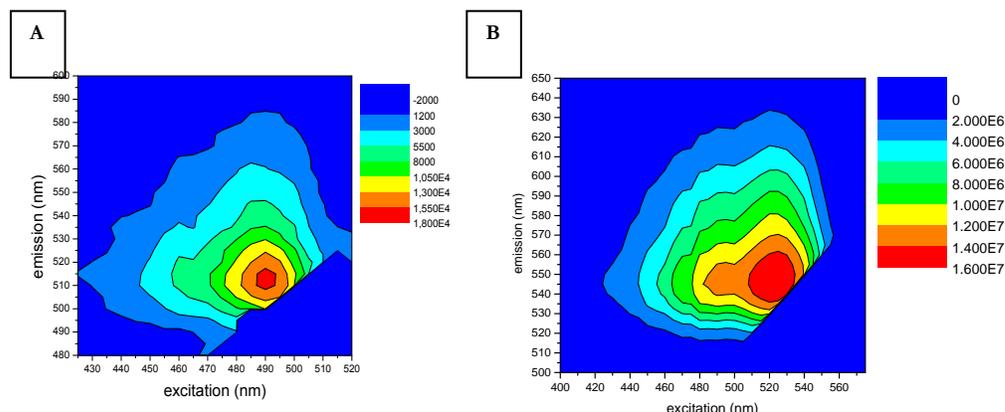


FIGURA 2: Matriz de emisión/excitación de: A: fluoresceína en agua; B: CF en THF.

La constante total de quenching de oxígeno singlete por CF (k_t) se obtuvo a partir del gráfico de Stern-Volmer que se muestra en la Figura 3. No se pudo determinar el coeficiente de absorción de CF, porque la cantidad de muestra no fue suficiente para permitir esta medida, sin embargo si realizó un cálculo aproximado de la misma tomndo el $\epsilon^{(355nm)}$ de la fluoresceína en etanol = $10138 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (10), lo cual arroja un valor de $k_t = 7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Quenching de oxígeno singete por CF

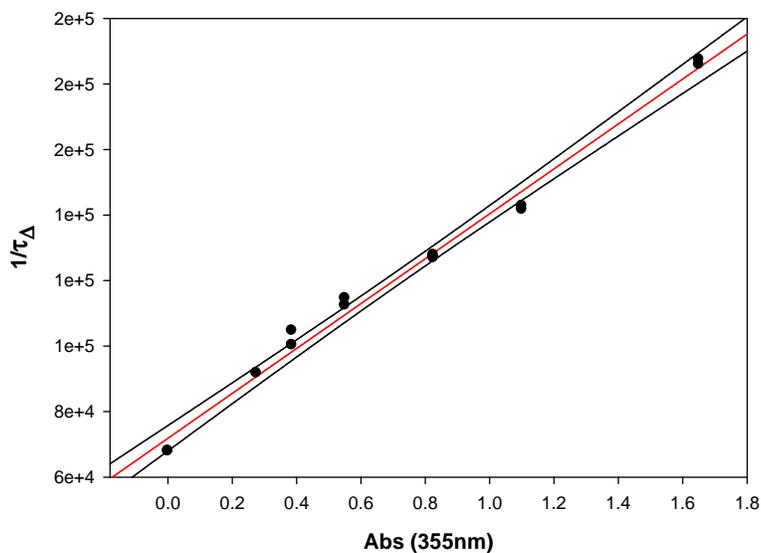


FIGURA 3: Gráfico de Stern Volmer para CF (desactivación de oxígeno singlete).