



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO QUÍMICA**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

**DÍMERO DE TIROSINA LIBRE Y EN  
ESTRUCTURAS PROTEICAS: GENERACIÓN  
FOTOSENSIBILIZADA Y CARACTERIZACIÓN  
FOTOQUÍMICA**

---

**Tesista: Lic. Lara Olivia Reid**

**Director: Dr. Andrés H. Thomas**

**Codirectora: Dra. M. Laura Dántola**

**Año: 2019**



El presente trabajo de Tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas bajo la dirección del Dr. Andrés H. Thomas y la codirección de la Dra. M. Laura Dántola. Se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata a fin de acceder al Grado Académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.



*A Daniela y Roberto,*



# AGRADECIMIENTOS

Expreso mis agradecimientos, a todas aquellas personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo, especialmente:

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por la educación pública y gratuita, donde fue posible mi formación de grado y de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado la beca que me permitió dedicarme en forma exclusiva a este trabajo de tesis y al Instituto de Investigaciones Teóricas y Aplicadas (INIFTA), mi lugar de trabajo, por haberme permitido realizar las investigaciones de la tesis doctoral en esta institución.

La Agencia Nacional de Promoción de la Ciencia y Tecnología (ANPCyT), al CONICET y a la UNLP por financiar los proyectos de investigación que dieron marco al presente trabajo de tesis.

A la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y el Instituto de Tecnología Química (ITQ), donde pude realizar una estadía por 3 meses.

A mi director Andrés, por su gran contribución a mi formación y por su interés continuo mi trabajo de tesis. Por sus consejos, ideas y las charlas científicas. Por su buena predisposición en todo momento y su apoyo en mis decisiones. Por los viajes y anécdotas.

A mi co-directora Laura, por su dedicación constante en mi formación y en el desarrollo de mi trabajo de tesis todos estos años. Por haber confiado en mí y por haberme dado todas las herramientas para poder trabajar de forma independiente en el laboratorio. Por sus palabras de aliento y apoyo en cada etapa, tanto dentro como fuera del laboratorio, y por siempre hacerme sentir como su par.

A mí querido grupo de la casita, a Carolina, Marian, Mari, Noel, Maira, Jae, Majo, José Luis y Sandra, gracias por el apoyo y por todos los buenos momentos compartidos. Gracias por todas las risas, viajes, los famosos “*after lab*” y las infinitas excusas para traer comida.

A las Mari’s, porque siempre estuvieron para contestar mis dudas, dar consejos y darme una mano cuando la necesite.

A Jae, porque trabajar con amigos hace todo más fácil. Gracias por estar en todo momento y apoyarme tanto fuera como dentro del laboratorio. Por hacerme reír siempre.

A Diana, por sus estudios previos en el estudio de dímeros de tirosina.

A la Dra. Virginie Lhiaubet-Vallet y la Dra. Marisa Marín, por su tiempo y buena predisposición durante mi estadía en Valencia. Por los buenos momentos compartidos tanto en Valencia como en Argentina.

A la Dra. Patricia Vicendo por permitirme ir a conocer las instalaciones del Laboratoire des IMRCP de la Université Paul Sabatier (Toulouse) y realizar medidas de UPLC-MS y a la Nathalie Martins-Froment por su buena disposición y colaboración con estos experimentos.

A la Dra. Rosa Erra Balsells y la Dra. Gabriela Petroselli por su colaboración en las medidas nano-ESI y de MALDI.

Al Dr. Ernesto A. Román, por su contribución en los experimentos de CD y DLS.

A la Dra. Vanesa Herlax, por su buena predisposición y el trabajo en conjunto realizado sobre  $\alpha$ -hemolisina.

A Matías Rafti, por su colaboración en la liofilización de las muestras.

A mi familia, mis nonnos, Alex y Dai, por su apoyo incondicional, cariño y palabras de aliento. En especial a mis padres, por recordarme siempre cual era mi objetivo, apoyarme y aconsejarme en cada decisión, INIFINITAMENTE GRACIAS!

A Alejo, por su compañía estos últimos años. Por aguantar mi locura durante la etapa de escritura.

A mis amigas, “Los cacos”, porque desde el día uno del curso de ingreso nunca dejamos de reírnos de nuestros logros y fracasos.

A mis amigos de la facu, mis colegas, por poder compartir las frustraciones y alegrías que pasamos en la tesis. Por todas las juntadas y risas, siempre con una birra de por medio.

A mis hermanos de la vida, “Los pibes y las pibas”, por bancarme a la distancia hace tantos años.

A Sofi, Meli y Lu, lo mejor que me trajo el hockey. Gracias por tanto apoyo y juntadas, fueron mi sostén estos últimos años en La Plata.

A Grace y Braca, mis padrinos, por su cariño y apoyo desde siempre.

A toda la gente del INIFTA, en especial a la gente del primer piso, por la buena onda, las juntadas primaverales y de fin de año, las charlas en los pasillos y salidas en los congresos.

# ÍNDICE



# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

<b>1. Fotoquímica y fotosensibilización</b>	1
1.1. Procesos fotofísicos	1
1.2. Procesos fotoquímicos	4
1.3. Fotosensibilización	5
1.3.1. Transferencia de energía	6
1.3.2. Transferencia de electrones	7
1.4. Oxidaciones fotosensibilizadas	7
1.4.1. Mecanismo Tipo I	8
1.4.2. Mecanismo Tipo II	9
<b>2. Efectos de la radiación UV en sistemas biológicos</b>	11
2.1. Distribución de la radiación solar en la Tierra	11
2.2. Daño en proteínas	12
2.2.1. Daño directo e indirecto	12
2.2.2. Aminoácidos oxidables	14
2.2.3. Efecto de la oxidación fotoinducida en proteínas a nivel estructural	17
2.2.4. Dímeros de tirosina	18
2.2.4.1. Métodos de síntesis	20
2.2.4.2. Propiedades fisicoquímicas de Tyr <sub>2</sub>	21
2.2.5. Fotoalergia	23
2.3. Daño fotoinducido a otras biomoléculas	23
2.3.1. Ácido desoxirribonucleico	23
2.3.2. Lípidos	25
<b>3. Propiedades químicas y bioquímicas de las Pterinas</b>	29
3.1. Propiedades químicas y fotofísicas	29
3.2. Propiedades bioquímicas	34
3.3. Vitiligo	35

<b>4. Propiedades fotosensibilizadoras de las Pterinas</b>	41
4.1. Efectos fotodinámicos sobre células eucariotas	41
4.2. Fotosensibilización del ADN y sus componentes	41
4.2.1. Fotosensibilización de nucleótidos púricos	41
4.2.2. Fotosensibilización de nucleótidos pirimidínicos	43
4.2.3. Fotosensibilización de ADN plasmídico	46
4.2.4. Fotosensibilización de ADN eucariota	46
4.3. Fotosensibilización del proteínas y sus componentes	47

## **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

<b>5. Preparación e irradiación estacionaria de soluciones</b>	53
5.1. Reactivos	53
5.2. Preparación de soluciones	54
5.2.1. Soluciones stock	54
5.2.2. Soluciones para irradiar	56
5.3. Experimentos en condiciones especiales	57
5.3.1. Condiciones anaeróbicas y de saturación de O <sub>2</sub>	57
5.3.2. Experimentos en presencia de yoduro de potasio (KI)	58
5.3.3. Experimentos comparativos en H <sub>2</sub> O y D <sub>2</sub> O	59
5.4. Irradiación estacionaria de las soluciones	60
5.4.1. Sistemas de irradiación	60
5.4.2. Metodología general para la toma de muestra	63
5.5. Actinometría	64
<b>6. Técnicas espectroscópicas</b>	71
6.1. Espectroscopía UV-visible	71
6.1.1. Titulación Espectrofotométrica	72
6.1.2. Técnicas colorimétricas	74
6.1.2.1. Determinación colorimétrica de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	74
6.1.2.2. Detección de anión superóxido por Citocromo c	76
6.1.2.3. Medidas de actividad hemolítica de $\alpha$ -HlyA	77
6.2. Espectroscopía de emisión	78
6.2.1. Descripción del equipo	78

6.2.2. Emisión en estado estacionario	80
6.2.2.1. Titulación Espectrofluorométrica	82
6.2.3. Emisión resuelta en el tiempo	83
6.2.3.1. Espectros de emisión con resolución temporal	85
6.2.4. Oxígeno molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ )	85
6.2.4.1. Rendimiento cuántico de generación de $^1\text{O}_2$	86
6.3. Fotólisis de destello láser	88
6.3.1. Fundamento	88
6.3.2. Descripción del equipo	89
6.3.3. Decaimientos y espectros de especies transitorias	90
6.4. Resonancia magnética nuclear	91
<b>7. Técnicas cromatográficas</b>	95
7.1. Cromatografía líquida de alta resolución	95
7.2. Cromatografía líquida de rápida resolución	97
7.3. Cromatografía líquida de ultra-rápida resolución con detección de MS	98
7.3.1. Nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	101
7.4. Columnas <i>Sephadex</i>	102
<b>8. Otras técnicas</b>	105
8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	105
8.1.1. Fundamento	105
8.1.2. Procedimiento experimental	106
8.2. Dicroísmo circular	108
8.3. Espectrometría de masas	111
<b>OBJETIVOS</b>	115
<b>RESULTADOS</b>	
<b>PARTE I</b>	
<b>9. Síntesis, purificación e identificación de dímeros de tirosina</b>	117
9.1. Formación del radical Tyr	117
9.2. Aislamiento del producto compatible con Tyr <sub>2</sub>	123
9.3. Identificación Tyr <sub>2</sub>	126
9.4. Preparación de soluciones acuosas de Tyr <sub>2</sub>	131

<b>10. Propiedades espectroscópicas de dímeros de tirosina</b>	141
10.1. Determinación del $pK_a$	141
10.2. Fluorescencia	142
10.2.1. Fluorescencia estacionaria	142
10.2.2. Fluorescencia resuelta en el tiempo	144
10.2.3. Rendimiento cuántico de fluorescencia	146
<b>11. Fotoquímica de dímeros de tirosina</b>	149
11.1. Fotodegradación de Tyr <sub>2</sub>	149
11.2. Rendimiento cuántico de fotodegradación	153
11.3. Estudios de fotoproductos	155
11.3.1. Análisis por HPLC	155
11.3.2. Análisis por UPLC-MS	158
11.3.3. Análisis por MS-MS	164
<b>12. Propiedades fotosensibilizadoras de los dímeros de tirosina</b>	169
12.1. Producción fotoquímica de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	169
12.1.1. Determinación de la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	169
12.1.2. Investigación de la producción de O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	170
12.2. Producción fotoquímica de <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	173
12.3. Capacidad de Tyr <sub>2</sub> para fotosensibilizar la oxidación de Tyr	177
<b>PARTE II</b>	
<b>13. Daño fotoinducido de Ubiquitina en presencia de O<sub>2</sub></b>	181
13.1. Fotosensibilización de Ub por Ptr	181
13.1.1. Análisis electroforético	182
13.1.2. Análisis cromatográfico	183
13.2. Análisis de fotoproductos por MALDI-TOF y nano LC-MS	187
13.3. Caracterización del producto compatible con el aducto Ub-Ptr	191
13.3.1. Aislamiento	191
13.3.2. Análisis de fluorescencia	192
13.4. Esquema de reacción	195
<b>14. Daño fotoinducido a Ubiquitina en ausencia de O<sub>2</sub></b>	197
14.1. Irradiación de Ub en presencia de Ptr en condiciones anaeróbicas	197

14.1.1. Análisis cromatográfico	197
14.1.2. Análisis electroforético	199
14.2. Análisis del producto fluorescente obtenido en anaerobiosis	200
14.2.1. Análisis de fluorescencia	200
14.2.2. Análisis por espectrometría de masas	202
<b>15. Oligomerización de albúmina fotoinducida por Ptr</b>	207
15.1. Evaluación de la capacidad de Ptr para oligomerizar la HSA	208
15.1.1. Análisis electroforético	208
15.1.2. Análisis cromatográfico	210
15.2. Formación de Tyr <sub>2</sub>	213
15.2.1. Análisis por fluorescencia	213
15.3. Fotooligomerización mediada por <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	218
15.4. Estudio de la alteración de la estructura secundaria y terciaria de HSA	219
<b>16. Fotooxidación del Trp de albúmina</b>	223
16.1. Modificaciones químicas en el residuo Trp de HSA	223
16.1.1. Fotooxidación del residuo Trp	223
16.1.2. Productos fluorescentes del Trp	226
16.2. Formación fotoaducto fluorescente HSA-Ptr	228
<b>17. Mecanismo de reacción del daño fotoinducido a albúmina por Ptr</b>	231
17.1. Interacción de HSA con Ptr	231
17.2. Participación del <sup>3</sup> Ptr*	232
17.3. Determinación de la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	237
<b>18. Daño fotoinducido de α-hemolisina por Ptr</b>	239
18.1. Fotosensibilización de α-HlyA por Ptr	240
18.1.1. Medidas de actividad hemolítica	240
18.1.2. Alteraciones de los residuos Trp y Tyr	240
18.1.3. Análisis electroforético	244
18.2. Fotosensibilización de proHlyA por Ptr	246
18.2.1. Alteraciones en los residuos Trp	246
18.2.2. Análisis electroforético	247
<b>CONCLUSIONES</b>	251



# INTRODUCCIÓN



# CAPÍTULO 1

## FOTOQUÍMICA Y FOTONSENSIBILIZACIÓN

Cuando una molécula absorbe radiación electromagnética se produce la excitación desde un estado cuántico de menor energía a otro de mayor energía. En este estado electrónico excitado, la molécula se encuentra en una situación muy inestable respecto de su estado basal, motivo por el cual puede perder el exceso de energía de diferentes modos. Si la molécula sufre una transformación química, entonces se denomina proceso fotoquímico. En cambio, si permanece químicamente inalterada y se desactiva mediante alguna forma física, el proceso es fotofísico.

### 1.1. Procesos fotofísicos

En los procesos fotofísicos, existen muchos caminos de relajación física posibles y el más favorable dependerá del tipo de molécula, de la naturaleza de los estados electrónicos involucrados y de las propiedades del medio. Estas vías de desactivación suelen ser muy rápidas y pueden clasificarse de la siguiente manera:

✓ *Transiciones radiativas*: una molécula excitada emite radiación electromagnética para regresar al estado de menor energía. Esta energía emitida es menor (es decir, de mayor longitud de onda) que la utilizada para generar el estado excitado.

✓ *Transiciones no radiativas*: un estado previamente excitado se convierte en otro de menor energía, sin emisión de radiación, por transferencia intramolecular de energía.

✓ *Procesos de desactivación física (o quenching)*: involucran la transferencia de energía de la molécula inicialmente excitada a otras moléculas que se encuentran presentes en el medio.

Cada una de estas vías de desactivación física puede involucrar, a su vez, distintos procesos. En el Figura 1.1 se muestra un diagrama de Jablonski modificado,<sup>1</sup> donde se representan las transiciones radiativas y no radiativas que puede sufrir una molécula. En este esquema simplificado de niveles de energía, las transiciones radiativas se representan con flechas

de línea recta y las transiciones no radiativas con flechas de líneas onduladas. Los niveles vibracionales asociados a cada estado electrónico se representan con líneas horizontales.

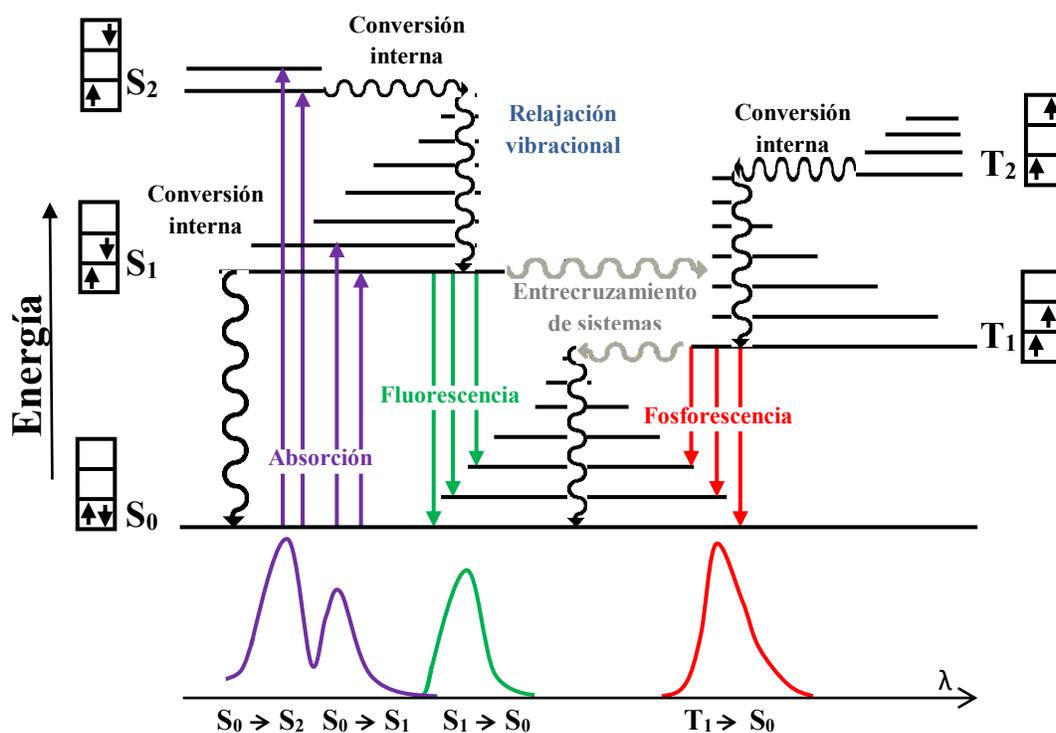


Figura 1.1. Diagrama de Jablonski modificado.<sup>1</sup>

En general, las moléculas orgánicas se encuentran en su estado electrónico basal de tipo singlete ( $S_0$ ). Cuando la molécula absorbe radiación electromagnética, un electrón se promueve a un orbital de mayor energía. Si no hay cambio en la multiplicidad de *spin*, el estado electrónico excitado alcanzado continúa siendo singlete ( $S_1$ ). Desde el estado  $S_1$  puede tener lugar un cambio de multiplicidad de *spin*, generando un estado excitado triplete ( $T_1$ ). Este último estado posee menor energía que el estado excitado  $S_1$ , debido a que al estar los dos electrones desapareados en diferentes orbitales, la energía de repulsión electrón-electrón es menor. Cuando se produce un proceso de excitación electrónica siempre existe una preferencia sobre la conservación del *spin*, motivo por el cual las bandas de absorción más intensas en un espectro corresponden a transiciones del tipo  $S_0 \rightarrow S_1$ . En cambio, las transiciones  $S_0 \rightarrow T_1$  están “prohibidas por *spin*”, es decir, que tienen una probabilidad de ocurrencia extremadamente baja, lo que deriva en

transiciones muy débiles. Usualmente, la excitación al primer estado excitado ( $S_1$ ) es el proceso más favorable. Sin embargo, muchas moléculas pueden absorber radiación a un segundo estado excitado singlete de mayor energía presentando transiciones  $S_0 \rightarrow S_2$ .

Como se observa en el diagrama de Jablonski modificado (Figura 1.1), las transiciones no radiativas pueden ocurrir entre estados de igual multiplicidad o entre estados de distinta multiplicidad. A los primeros se los denomina procesos de conversión interna (IC, *internal conversion*) y a los últimos, entrecruzamiento de sistemas (ISC, *intersystem crossing*). Las transiciones horizontales entre estados, por IC o ISC, dejan a la molécula con un exceso de energía vibro-rotacional. En solución esta energía es rápidamente removida por colisiones con moléculas del solvente, en un proceso denominado relajación vibracional (VR).

Los procesos radiativos que pueden ocurrir se denominan fluorescencia y fosforescencia. En ambos casos, la emisión de la radiación sucede a longitudes de onda mayores que la radiación absorbida inicialmente. Este efecto se conoce como desplazamiento de Stokes y se debe a la pérdida de energía por la relajación térmica de la molécula excitada para alcanzar el estado de menor energía vibro-rotacional (dentro del mismo estado electrónico). Esto tiene lugar a través de diversos fenómenos fisicoquímicos, como por ejemplo, la disipación de energía vibracional, procesos de tautomerización e interacciones entre la molécula excitada y las moléculas del solvente.<sup>2</sup> Si la transición ocurre desde un estado electrónico de igual multiplicidad de spin que el estado final, la emisión se denomina fluorescencia. La misma es una transición fuertemente permitida y muy rápida ( $\sim$ ns). La fosforescencia, en cambio, es una transición que involucra estados de diferente multiplicidad de spin, es decir, una transición prohibida en términos de la teoría de la mecánica-cuántica. No obstante, esta puede ocurrir y, generalmente, es de menor intensidad y más lenta que la fluorescencia ( $\sim$  $\mu$ s-ms). Pueden evaluarse experimentalmente las propiedades de la radiación emitida para conocer detalles de la naturaleza y el comportamiento de los estados excitados.

La relajación del estado excitado por desactivación física (*quenching*), ocurre cuando en el medio de reacción se encuentra otra especie química que puede interactuar con la molécula en estado excitado, conocida como desactivador o *quencher* (Q) (Reacción 1.1). Así, una molécula excitada ( $A^*$ ) puede interactuar con el desactivador dando lugar a la relajación sin emisión de radiación. En este proceso generalmente está involucrada la transferencia de energía de la molécula excitada a la otra molécula en una colisión. La ecuación de velocidad de dicho proceso

queda representada en la Ecuación 1.1, donde  $k_q$  es la constante de velocidad bimolecular de desactivación. La intensidad de la radiación disminuye en función de la cantidad de desactivador y de la eficiencia del proceso. Además, la presencia del desactivador aumenta la velocidad del decaimiento de la emisión, al disminuir el tiempo de vida ( $\tau$ ) del estado excitado. Por lo tanto, medidas de la intensidad de emisión y su dependencia con el tiempo proporcionan información sobre las velocidades de reacción entre la molécula excitada y el desactivador.<sup>3</sup>



$$v = k_q[A^*][Q] \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

La desactivación física puede tener lugar con un *quenching colisional o dinámico*, como resultado de los choques generados entre las moléculas electrónicamente excitadas y del desactivador, o mediante un *quenching estático* debido a la formación de complejos no fluorescentes de los estados electrónicos fundamentales del fluoróforo y el desactivador. Una gran variedad de sustancias pueden actuar como desactivadores de estados excitados, y por ello, es importante identificar los que son de interés para la especie en estudio. Un ejemplo representativo es la desactivación de estados excitados tripletes por O<sub>2</sub> molecular, motivo por el cual se elimina de las soluciones sobre las que se van a medir sus tiempos de vida y rendimientos cuánticos.

Dado un proceso de desactivación dinámica, se puede calcular la constante de velocidad del proceso registrando los espectros de emisión del compuesto en estudio en estado excitado o los tiempos de vida, en presencia y en ausencia de desactivador, aplicando la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 1.2):

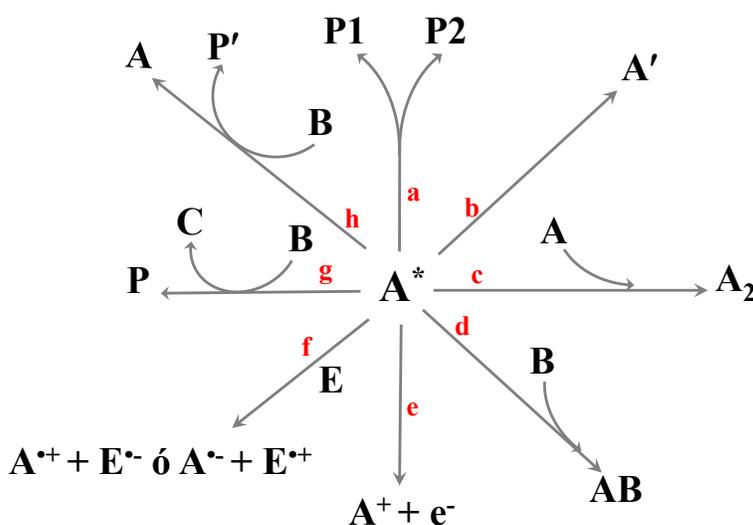
$$\frac{\tau^0}{\tau} = \frac{I_{em}^0}{I_{em}} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau^0[Q] \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

donde  $I_{em}^0$  e  $I_{em}$  son las intensidades de la emisión en ausencia y presencia del desactivador,  $\tau^0$  y  $\tau$  son los tiempos de vida en ausencia y en presencia de desactivador,  $K_{sv}$  es la constante de Stern-Volmer,  $[Q]$  es la concentración del desactivador y  $k_q$  es la constante biomolecular de desactivación.

## 1.2. Procesos fotoquímicos

Cuando una molécula absorbe radiación electromagnética y pasa a un estado de mayor energía, se vuelve más reactiva y aumentan las probabilidades de reacción.<sup>4</sup> Si este exceso de energía se emplea para promover una reacción química, se habla entonces de reacción fotoquímica. Esto puede ocurrir por distintos mecanismos, por ejemplo, la energía se puede utilizar para romper una unión química, para superar una energía de activación, etc. La reactividad química de una molécula en su estado excitado puede ser muy diferente a la de esa misma molécula en su estado fundamental.

Las reacciones fotoquímicas se pueden clasificar en función del tipo de transformación química (Esquema 1.1): ruptura o clivaje de la molécula excitada (a); isomerización (b); dimerización (c); adición o asociación de dos moléculas (d), que puede llevar a la formación de aductos covalentes como se detalla en la *Sección 4.4.4*; ionización (e); transferencia electrónica (f) y reacciones intermoleculares donde A\* reacciona con B y ambos se modifican (g) o en las que solo se modifica el que no absorbió radiación electromagnética (h).



**Esquema 1.1.** Tipos de reacciones fotoquímicas a partir del estado excitado de una molécula "A".

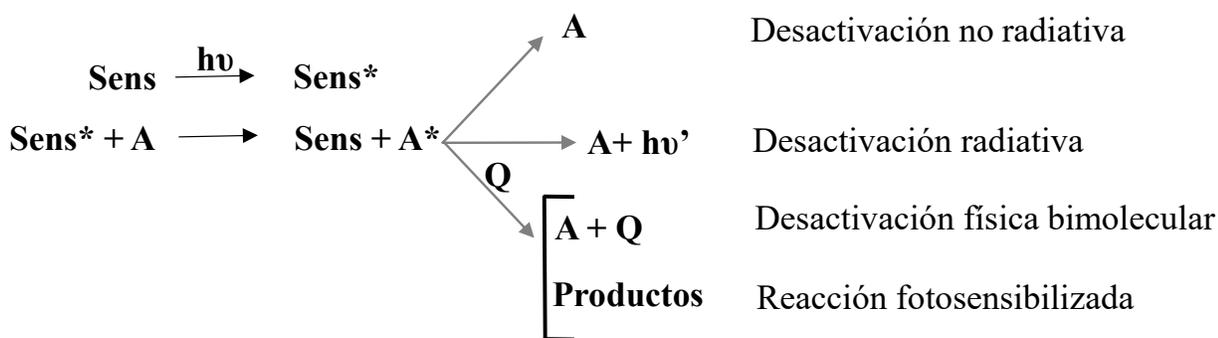
### 1.3. Fotosensibilización

La fotosensibilización abarca un conjunto especial de procesos fotoquímicos en los que una especie química sufre una alteración fotoquímica o fotofísica como consecuencia de la absorción inicial de radiación electromagnética por otra especie química que se denomina fotosensibilizador o, simplemente, sensibilizador (Sens).<sup>5,6</sup> Si bien ésta es una definición amplia,

es la más aceptada en el campo de la fotoquímica aplicada a reacciones de compuestos orgánicos y procesos bioquímicos. Las reacciones fotosensibilizadas pueden ocurrir a través de la transferencia de energía o de carga.

### 1.3.1. Transferencia de energía

La fotosensibilización por transferencia de energía es un proceso en el cual una especie química electrónicamente excitada (“dador”) se desactiva transfiriendo energía a una segunda especie química (“aceptor”). Como consecuencia, esa energía produce en el aceptor una transición electrónica poblando estados excitados (generalmente los de más baja energía,  $S_1$  o  $T_1$ ) que luego se transforma en algún fenómeno químico o físico. En el Esquema 1.2 se presenta la secuencia de reacciones involucradas en este mecanismo. Primero, el Sens obtiene la energía de excitación a partir de la absorción de un fotón generando un estado excitado ( $Sens^*$ ). Luego, la energía se transfiere al aceptor (A) y el sensibilizador regresa al estado basal. Esta energía transferida es menor a la absorbida inicialmente debido a la relajación o pérdida de energía vibro-rotacional. Posteriormente, el aceptor excitado ( $A^*$ ) puede volver a su estado fundamental desactivándose a través de cualquiera de las vías fotofísicas o sufrir algún cambio químico.



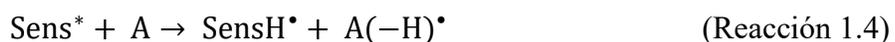
**Esquema 1.2.** Proceso fotosensibilizado que ocurre a través de mecanismos de transferencia de energía.

La transferencia de energía puede generar cambios químicos en el aceptor que no ocurren en ausencia de radiación y del fotosensibilizador. Además, esta vía alternativa de excitación puede poblar estados excitados distintos a los obtenidos por absorción directa y, por lo tanto, dar lugar a diferentes reacciones químicas.<sup>7</sup> La transferencia de energía puede tener lugar a través de dos mecanismos:<sup>8</sup>

- Transferencia de energía radiativa: la energía se transfiere por desactivación radiativa de Sens\* y absorción de la radiación emitida por A.<sup>5</sup>
- Transferencia de energía no radiativa: requiere una interacción directa entre el Sens\* y A.

### 1.3.2. Transferencia de electrones

Cuando una especie química se oxida o reduce por reacción con otra especie electrónicamente excitada, se dice que la transferencia de electrones es fotosensibilizada. Esta transferencia de electrones consiste en una reacción en la cual un electrón es cedido (o aceptado) por una molécula excitada hacia (o desde) un aceptor (o dador) en su estado fundamental, de acuerdo con los respectivos potenciales redox de los dos estados involucrados. Este proceso puede tener lugar por una transferencia electrónica propiamente dicha, generando el radical anión y el radical catión (Reacciones 1.2 y 1.3), o bien, mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno, generando los radicales neutros (Reacciones 1.4 y 1.5).

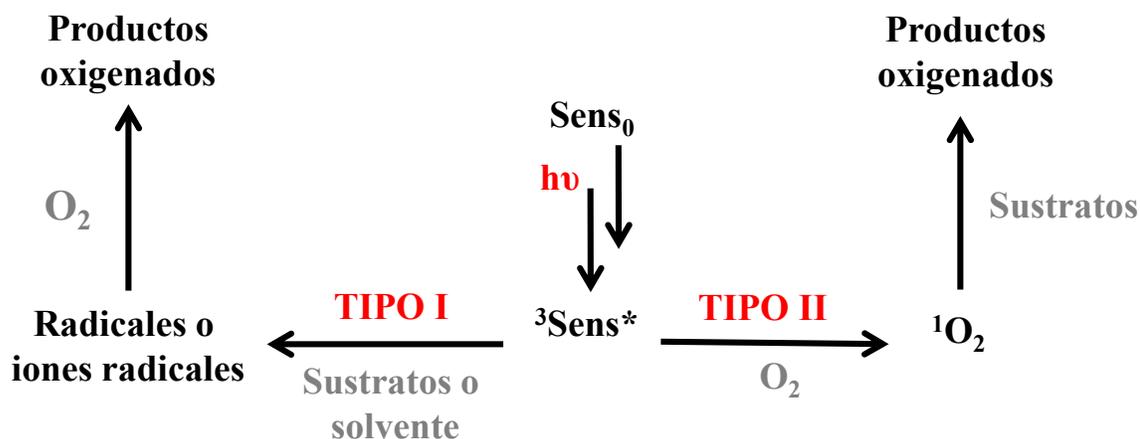


Posteriormente, los radicales formados pueden sufrir diferentes reacciones dependiendo de sus propiedades, de la presencia de otras especies en el medio y de las condiciones experimentales, tales como temperatura, pH y propiedades del solvente.

### 1.4. Oxidaciones fotosensibilizadas

Las fotooxidaciones son un conjunto de procesos fotoinducidos de gran importancia en sistemas biológicos. Si la fotooxidación ocurre en una molécula como resultado de la absorción de radiación por otra (sensibilizador), la reacción es una oxidación fotosensibilizada. Estos procesos ocurren a través de un conjunto de mecanismos que pueden involucrar fenómenos de transferencia de energía o de electrones. El oxígeno que participa en las oxidaciones se puede encontrar en su estado triplete basal o en un estado excitado singlete.<sup>9</sup> Probablemente, la

clasificación más aceptada de los mecanismos de oxidaciones fotosensibilizadas es la propuesta por Foote (Esquema 1.3).<sup>10,11</sup> Como en cualquier proceso fotosensibilizado, la primera etapa consiste en la absorción de la radiación por el sensibilizador. De esta manera, se genera su estado excitado, que puede ser singlete o triplete. Esta especie excitada puede reaccionar con un sustrato o con el solvente a través de un mecanismo Tipo I, o bien, con el O<sub>2</sub> mediante un mecanismo Tipo II.

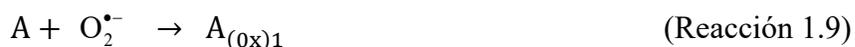


**Esquema 1.3.** Oxidaciones fotosensibilizadas Tipo I y Tipo II.<sup>11</sup>

#### 1.4.1. Mecanismo Tipo I

En los mecanismos Tipo I, el estado excitado del sensibilizador reacciona con el sustrato o con el solvente mediante una reacción de transferencia electrónica, generando los correspondientes pares radicales. Por lo general, en los sistemas biológicos el sensibilizador actúa como aceptor de electrones y los sustratos, como por ejemplo nucleótidos y aminoácidos, operan como dadores de electrones (Reacción 1.6). Dependiendo del pH del medio y de las correspondientes constantes de disociación ácida, el radical catión puede formar el radical neutro por la pérdida de un protón (Reacción 1.7). Simultáneamente, el radical anión puede reaccionar con el O<sub>2</sub> disuelto, generando anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Reacción 1.8). Posteriormente, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puede reaccionar con el sustrato (Reacción 1.9) o con su radical neutro (Reacción 1.10) para generar productos oxigenados. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> también puede sufrir una desproporción formando peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Reacción 1.11), que puede participar en otras reacciones de oxidación. El radical neutro también puede reaccionar con el O<sub>2</sub> (Reacción 1.12) o, si la reacción tiene lugar en

medio acuoso, con el agua (Reacción 1.13) y generar productos oxigenados. Finalmente, el sustrato puede dimerizar por la reacción entre dos de sus radicales neutros (Reacción 1.14).



#### 1.4.2. Mecanismo Tipo II

Los mecanismos de Tipo II involucran la producción de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) por procesos de transferencia de energía. El estado excitado del sensibilizador se genera por la absorción de radiación por dicha especie (Reacción 1.15). El  $\text{O}_2$  en su estado basal triplete interacciona con el estado triplete excitado del sensibilizador dando lugar a la desactivación del sensibilizador y la formación de  $^1\text{O}_2$  (Reacción 1.16). Luego, esta especie altamente reactiva, oxida al sustrato (A) generando productos oxigenados  $\text{A}_{(\text{ox})}$  (Reacción 1.17).



## **Bibliografía**

- <sup>1</sup> M. Vignoni, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, 2011.
- <sup>2</sup> J. R. Lakowicz, “*Principles of Fluorescence Spectroscopy*”, Tercera Edición, Springer, 2006.
- <sup>3</sup> V. A. Gilbert, J. Baggott, “*Essentials of Molecular Photochemistry*”, Blackwell Scientific, Oxford, 1991.
- <sup>4</sup> N. J. Turro, “*Modern Molecular Photochemistry*”, Univeristy Science, 1991.
- <sup>5</sup> S. E. Braslavsky, *Pure Appl. Chem.*, **79**, 293-465, 2007.
- <sup>6</sup> J. C. Scaiano, “*Handbook of Organic Photochemistry*”, CRC Press, 1989.
- <sup>7</sup> C.E. Wayne, R. P. Wayne, *Photochemistry*; Oxford Univerity Press: Oxford, 1996.
- <sup>8</sup> A. Braun, *et.al*, “*Photochemical technology*”, Vol. 104, 1991.
- <sup>9</sup> P. Klán, J. Wirz, “*Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*”; John Wiley and Sons Ltd.: Chichester, 2009.
- <sup>10</sup> C. S. Foote, *Photoche. Photobiol.*, **54**, 659-659, 1991.
- <sup>11</sup> M.S. Baptista, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 912-919, 2017.

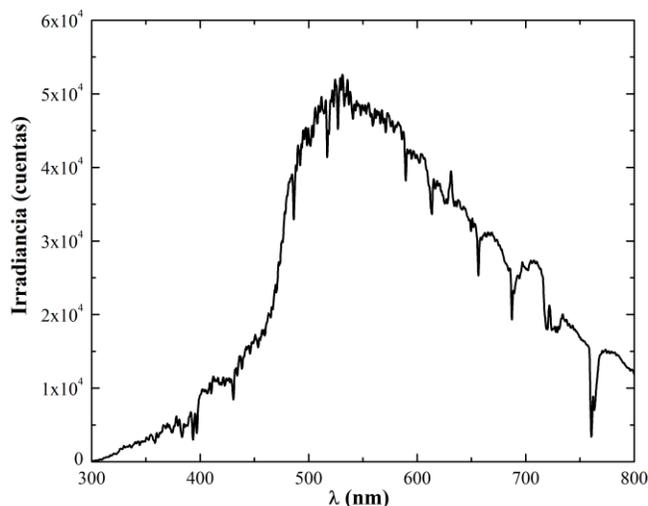
## CAPÍTULO 2

# EFECTO DE RADIACIÓN UV DIRECTO E INDIRECTO EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

La mayoría de las formas de vida en la Tierra se encuentran expuestas diariamente a la luz solar, y en la mayoría de los casos, esta exposición es esencial para la viabilidad y la salud. Sin embargo, a pesar de los efectos positivos de la exposición a la luz, la radiación UV y la luz visible en presencia de determinados cromóforos, pueden inducir daño en biomoléculas. Los efectos perjudiciales para la salud provocados por la radiación electromagnética proveniente del Sol incluyen quemaduras, fotoalergias, fotoenvejecimiento o cáncer de piel.

### **2.1. Distribución de la radiación solar en la Tierra**

La radiación solar está compuesta por un espectro de radiación electromagnética continuo que se divide en tres regiones principales: ultravioleta (UV), visible e infrarrojo (IR). Sin embargo, sólo una porción de la radiación emitida por el sol alcanza la superficie terrestre. Este fenómeno se debe a la presencia de los gases de la atmósfera, que actúan como filtros. La distribución de la radiación solar sobre la superficie terrestre depende de la época del año (posición respecto al sol), composición de la atmósfera (aerosoles, ozono, nubosidad), posición geográfica (latitud, longitud y altura sobre el nivel del mar), del tipo de suelo (nieve, arena, césped, asfalto), entre otros. Por lo tanto, la radiación solar que llega a la tierra no se distribuye de manera homogénea y varía en cada punto del planeta. A modo de ejemplo, en la Figura 2.1 se muestra la irradiancia solar registrada en la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina) en el mes de octubre de 2014 a mediodía con un cielo despejado. Del total de la energía solar que alcanza la superficie terrestre, un 15 % pertenece a la radiación ultravioleta (UV) (200 - 400 nm), un 60 % a la radiación visible (400 - 700 nm) y el 25 % remanente a radiación infrarroja (>700 nm).<sup>1</sup>



**Figura 2.1.** Irradiancia solar espectral en función de la longitud de onda. Registrado el 8 de octubre de 2014 con cielo despejado en la ciudad de La Plata, Argentina.<sup>2</sup>

La radiación UV corresponde a la fracción más pequeña de energía solar que alcanza la superficie terrestre, sin embargo, por ser la radiación con longitud de onda más corta y por lo tanto más energética, es la más nociva para los sistemas biológicos. La radiación UV se divide en tres regiones:

- ✓ La región UV-C comprende las longitudes de onda desde 200 hasta 280 nm. Esta región del espectro solar es absorbida principalmente por el ozono ( $O_3$ ) en la atmósfera y por lo tanto, no alcanza la superficie terrestre.<sup>1</sup>
- ✓ El intervalo intermedio es la región UV-B, la cual comprende desde 280 hasta 320 nm, una porción de la cual no alcanza la superficie de la Tierra por ser absorbida parcialmente por el  $O_3$ . Sin embargo, este punto de corte es altamente dependiente de la concentración de  $O_3$  atmosférico.
- ✓ La región UV-A abarca desde 320 hasta 400 nm, constituye la mayor parte de la radiación solar UV que alcanza la superficie terrestre.

## 2.2. Daño en proteínas

### 2.2.1. Daño directo e indirecto

Las proteínas son las moléculas blanco principales en las células capaces de sufrir fotooxidación por absorción directa dentro de la estructura proteica, como el caso de algunas cadenas laterales de aminoácidos y de cromóforos unidos, como flavinas y porfirinas. El daño por radiación en proteínas puede ocurrir por dos vías.<sup>3-6</sup> La primera de ellas se basa en la oxidación por absorción directa de radiación UV-B y en menor medida, de radiación UV-A. Los cromóforos intrínsecos principales en proteínas son Triptófano (Trp), Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe), Histidina (His), Cisteína (Cys) y puentes di-sulfuro de Cistina, provocados por la unión covalente de dos residuos Cys, ya que las cadenas laterales del resto de los aminoácidos y el enlace peptídico absorben radiación por debajo de 230 nm. Luego de la absorción de radiación UV, los residuos pasan a un estado excitado singlete y a continuación, pueden perder energía por un cruce entre sistemas para formar estados excitados tripletes o por transferencia de energía a otros grupos (*Sección 1.1*). Los estados excitados tripletes participan en mecanismos de transferencia de un electrón y de abstracción de hidrógeno.<sup>4,6</sup> A su vez, como consecuencia de las reacciones de fotoionización, se forma el electrón hidratado, que en presencia de O<sub>2</sub> genera O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.<sup>7</sup> En menor medida, puede ocurrir la adición del electrón hidratado a grupos carbonilos libres (C-terminal o cadenas laterales de Aspartato (Asp)/Glutamato (Glu)) y a grupos aminos (N-terminal o la cadena lateral de Lisina (Lys)), provocando la desaminación y la eliminación de H<sup>•</sup>. La adición también puede ocurrir en Cys y en las cadenas laterales protonadas de His. En péptidos, la adición del electrón hidratado puede ocurrir a grupos carbonilos en la estructura del péptido para formar un radical anión que, a continuación, genera la ruptura de la cadena peptídica.<sup>7,8</sup>

La segunda vía ocurre cuando la radiación UV y/o visible es absorbida por un sensibilizador, capaz de llevar a cabo reacciones fotosensibilizadas. Los sensibilizadores pueden ser endógenos (por ejemplo, porfirinas, vitaminas como la Riboflavina) o exógenos (drogas, compuestos poliaromáticos o moléculas coloreadas). El sensibilizador, como consecuencia de la absorción de radiación, pasa a un estado excitado singlete de vida corta que sufre rápidamente un cruce entre sistemas para alcanzar un estado excitado triplete de vida más larga. Este último puede volver a su estado basal o reaccionar con otras especies a través de mecanismos Tipo I o Tipo II (*Sección 1.4*), provocando daño en moléculas blanco, como el caso de proteínas. Teniendo en cuenta que los sensibilizadores raramente actúan exclusivamente por un mecanismo Tipo I o Tipo II debido a la variación de la eficiencia de transferencia de energía, las reacciones fotosensibilizadas ocurren por una mezcla entre ambos mecanismos. Por lo tanto, el daño

proteico depende de la proporción de cada especie reactiva generada en el proceso fotosensibilizado, de la naturaleza del sensibilizador, la longitud de onda de excitación y las condiciones de reacción.<sup>9,10</sup> La fotooxidación indirecta de proteínas puede ocurrir por la formación y la reacción del  $^1\text{O}_2$  con Trp, Tyr, His, Metionina (Met) y las cadenas lateral de Cys. Estas reacciones se ven favorecidas a pH fisiológico (pH= 7,4)<sup>5,6,9,11</sup> y, por las altas concentraciones de proteínas en los sistemas biológicos. En condiciones alcalinas (pH >10,0), el  $^1\text{O}_2$  reacciona con Lys y Arginina (Arg) en sus formas neutras (no protonadas).

### 2.2.2. Aminoácidos oxidables

A continuación se describen los tres aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr y Phe) y el resto de los aminoácidos más susceptibles a ser oxidados mencionados previamente (His, Cys y Met).

#### ✓ **Triptófano**

Trp es un aminoácido hidrofóbico, que presenta un grupo indol en su cadena lateral (Figura 2.2). La fórmula química de este aminoácido es  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$  (Mr= 204,2 g/mol). Posee dos equilibrios de disociación que involucra al grupo carboxilo (-COOH,  $pK_{a1}$ ) y al amino ( $-\text{NH}_3^+$ ,  $pK_{a2}$ ), con valores de 2,38 y 9,39, respectivamente. Es el cromóforo más importante en las proteínas, ya que su banda de absorción presenta un coeficiente de extinción molar alto ( $\epsilon^{270} = 6982 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y se extiende a longitudes de onda mayores que otros aminoácidos (Figura 2.3). A longitudes mayores a 295 nm, la absorción de las proteínas se debe únicamente al Trp.<sup>12</sup> Por lo tanto, Trp puede ser excitado selectivamente en las proteínas si se trabaja a longitudes de onda entre 295 y 305 nm y se evalúa su emisión con un máximo centrado en 350 nm. Se encuentra reportado que Trp sufre fotodegradación debido a la reacción fotosensibilizada por Riboflavina (Rb), donde se generan distintas especies reactivas de oxígeno:  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Se encontraron distintos fotoproductos, entre ellos: productos indólicos asociados a flavinas, productos indólicos de mayor peso molecular que Trp y N-formilquinurenina (NFK), junto con otros productos de menor peso molecular que Trp. Se postula la transferencia de un electrón del Trp al estado excitado triplete de Rb y la formación del radical anión de Rb y el radical catión del Trp, los cuales actúan como intermediarios en la formación de los distintos fotoproductos. Por otro lado, la presencia de  $^1\text{O}_2$  justifica la formación de NFK, ya que es un típico producto de oxidación de Trp por esta especie reactiva de  $\text{O}_2$ .<sup>13</sup>

### ✓ **Tirosina**

Tyr es un aminoácido aromático (Figura 2.2) que se encuentra presente en la mayoría de las proteínas. Su fórmula química es  $C_9H_{11}NO_3$  ( $M_r = 181,2$  g/mol). Posee un valor de  $pK_{a1}$  de 2,20, un  $pK_{a2}$  de 9,11 y tiene un grupo ionizable en su cadena lateral (R), que posee  $pK_R$  de 10,07. La absorción de las proteínas a 280 nm se debe principalmente a los residuos de Tyr y Trp, ya que Tyr posee un espectro de absorción con una banda de menor energía centrada en 275 nm (Figura 2.3). A diferencia de lo observado para Trp, Tyr presenta un espectro de emisión centrado a 305 nm. Se encuentra reportado que Tyr sufre daño fotosensibilizado por Rb y que este proceso ocurre principalmente por un mecanismo Tipo I, involucrando una interacción directa entre el estado excitado del fotosensibilizador y Tyr. Durante el proceso de fotooxidación, se detectó la formación de distintas especies reactivas de oxígeno, tales como  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$  y  $O_2^{\bullet-}$  y se identificó a un fotoproducto, el cual se asigna al dímero de tirosina.<sup>14</sup>

### ✓ **Fenilalanina**

Phe es un aminoácido aromático, cuya fórmula química es  $C_9H_{11}NO_2$  ( $M_r = 165,2$  g/mol) y presenta un valor de  $pK_{a1}$  de 1,83 y un  $pK_{a2}$  de 9,13. Como se mencionó previamente, las proteínas son excitadas generalmente a 280 nm o a longitudes de onda mayores, sin embargo, Phe no se lo logra excitar a estas longitudes de onda debido a que no absorbe (Figura 2.2). Además, el rendimiento cuántico de fluorescencia en proteínas de este aminoácido es 0,02 contra valores de 0,14 y 0,13 para Tyr y Trp, respectivamente,<sup>12</sup> por lo que la emisión de los residuos de Phe raramente son observados en las proteínas. Por lo tanto, la oxidación de Phe mediada por UV se vuelve irrelevante cuando se compara con los otros aminoácidos aromáticos.

### ✓ **Histidina**

His es un aminoácido básico, que posee en su cadena lateral un grupo imidazol (Figura 2.2) cargado positivamente a pH 7,0, ya que posee un  $pK_{a1}$  de 1,82, un  $pK_R$  de 6,00 y un  $pK_{a2}$  de 9,17. Es decir que, a un pH cercano a 6,0, su grupo lateral imidazol sólo está cargado en un 50 %, lo que hace que His sea neutra a pH fisiológico. Su fórmula química es  $C_6H_9N_3O_2$  ( $M_r = 155,16$  g/mol). La absorción directa de radiación UV por His no es un mecanismo importante, y la mayoría de los daños observados en dichos residuos se produce a través de procesos

sensibilizados. Como consecuencia del proceso fotosensibilizado, ocurre la formación de radicales de His.<sup>15,16</sup> La interacción (a través de un mecanismo de Tipo I) entre el estado triplete del fotosensibilizador y His es dependiente del pH, lo que se atribuye a los distintos estados de protonación del grupo imidazol. La oxidación de His, tanto libre como en péptidos por  $^1\text{O}_2$ , lleva a la formación de endoperóxidos.<sup>16,17</sup> Estos productos se forman como consecuencia de la apertura del anillo imidazol y en soluciones acuosas, His puede generar productos bicíclicos.<sup>16</sup> Muchos de los productos de oxidación de His pueden llevar al entrecruzamiento de proteínas, formando enlaces His-His e His-Lys, a partir de la adición nucleofílica de una cadena lateral de His o Lys sin oxidar, al grupo ceto de una His oxidada.<sup>18,19</sup>

#### ✓ **Cisteína**

Cys es un aminoácido polar sin carga (Figura 2.2), el cual se oxida fácilmente formando un aminoácido dimérico, denominado Cistina, el cual se encuentra unido covalentemente por un enlace disulfuro. Su fórmula química es  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$  ( $M_r = 121,2$  gr/mol) y presenta un valor de  $pK_{a1}$  de 1,96, un  $pK_R$  de 8,18 y un  $pK_{a2}$  de 10,28. El estudio de la oxidación de puentes disulfuro por absorción directa de radiación UV toma relevancia a longitudes de onda menores a 260 nm. Cys puede oxidarse vía  $^1\text{O}_2$ , generado en reacciones fotosensibilizadas, para dar cistina y tiosulfatos, entre otras especies.<sup>20</sup>

#### ✓ **Metionina**

Met es un aminoácido hidrofóbico, con un grupo tioéter apolar en su cadena lateral (Figura 2.2). Su fórmula química es  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$  ( $M_r = 149,2$  gr/mol) y presenta un valor de  $pK_{a1}$  de 2,28 y un  $pK_{a2}$  de 9,21. Si bien no se observa daño directo por absorción de radiación UV, Met sufre oxidación por reacciones fotosensibilizadas.<sup>21</sup> El estado triplete excitado del sensibilizador, mediante una transferencia de carga con Met forma el radical catión ( $\text{MetS}^{+\bullet}$ ),<sup>22</sup> el cual participa en distintas reacciones según el pH, incluyendo una dimerización y reacciones de deprotonación para formar radicales centrados en el carbono de enlaces C–H adyacentes en la cadena lateral.<sup>23</sup> Met también puede sufrir oxidación vía  $^1\text{O}_2$ , generado en reacciones fotosensibilizadas,<sup>6,21,24</sup> que lleva a la formación de especies zwitteriónicas, las cuales, según el pH, pueden oxidar una segunda Met o eliminar  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

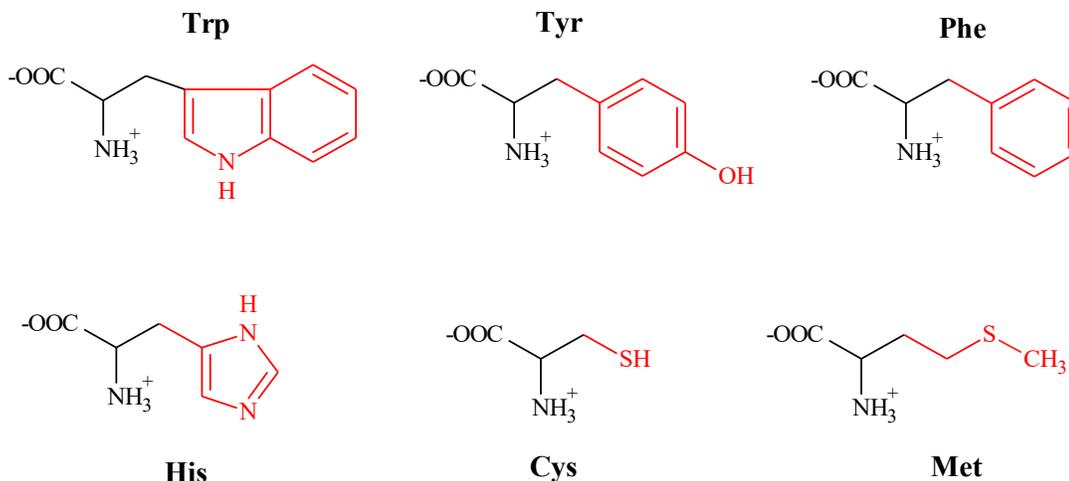


Figura 2.2. Estructuras de los aminoácidos más susceptibles a sufrir oxidación (pH= 7,0).

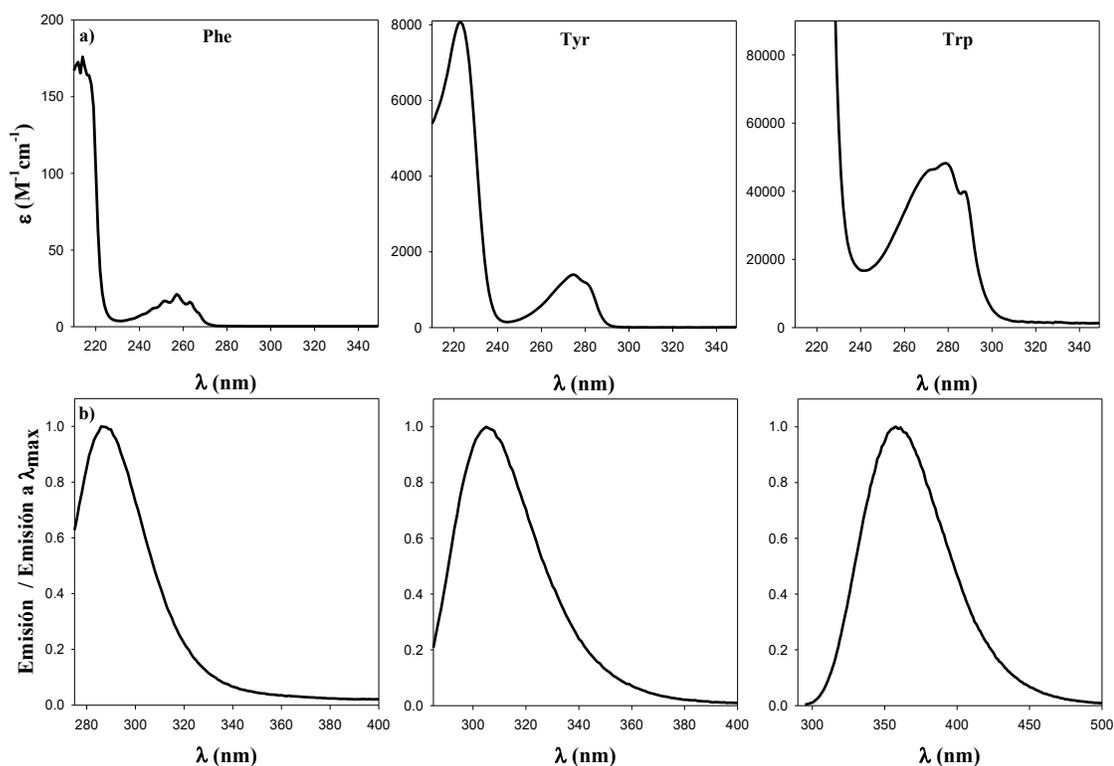


Figura 2.3. Espectros de absorción (a) y espectros de emisión normalizados (b) de los aminoácidos Trp, Tyr y Phe en medio acuoso a pH neutro.

### 2.2.3. Efecto de la oxidación fotoinducida en proteínas a nivel estructural

A pesar que el daño inicial involucra solo a unos pocos aminoácidos, existen procesos secundarios, los cuales ocurren durante y luego de la exposición a la radiación, que pueden

afectar otros sitios, tanto en la misma proteína como en otras. El daño secundario puede derivar de vías radicalarias (por la formación de radicales Trp, Tyr y Cys), por intermediarios reactivos generados por  $^1\text{O}_2$  (como el caso de peróxidos de Trp, Tyr e His) y mediados por reacciones moleculares de fotoproductos (como carbonilos reactivos). Estos procesos pueden culminar con la fragmentación proteica, el entrecruzamiento, la formación de agregados y la alteración tanto física como química de las estructuras proteicas.<sup>10</sup>

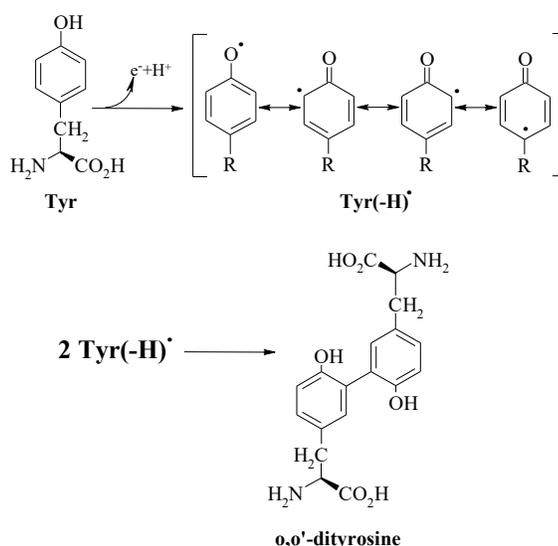
Como consecuencia de la fotooxidación proteica, ocurre la formación de agregados de alto peso molecular, como dímeros y productos de mayor tamaño.<sup>25-29</sup> La oligomerización puede ocurrir por diversas reacciones, una de las cuales involucra especies radicalarias, como es el caso de la formación de Tyr<sub>2</sub> a partir de la reacción entre dos Tyr(-H)<sup>•</sup> (Sección 2.2.4).<sup>30</sup> Hay evidencias que muestran que los residuos de His oxidados llevan a la oligomerización en proteínas,<sup>16,18,19,31,32</sup> debido a que estos productos de oxidación contienen grupos carbonilos, que pueden participar en reacciones de adición con otros nucleófilos,<sup>16,17</sup> como el caso de residuos Lys, Arg y la cadena lateral de residuos Cys.

La fragmentación fotoinducida de proteínas posee menor relevancia que la agregación, sin embargo, puede ocurrir bajo ciertas circunstancias.<sup>9,33,34</sup> La formación de radicales en el carbono- $\alpha$  en la estructura de un péptido en presencia de  $\text{O}_2$ ,<sup>6,35</sup> lleva a la ruptura de la cadena. La formación de peróxidos en los residuos His y Tyr son capaces de generar estos radicales en péptidos chicos.<sup>16,36,37</sup> Por lo tanto, la oxidación inicial en una cadena lateral puede llevar al clivaje de la cadena a través de la transferencia del daño dentro de la proteína, siendo los radicales los intermediarios. Estas reacciones de transferencia pueden ocurrir en residuos cercanos en la secuencia de la proteína o en cualquier otra ubicación, si la estructura 3D de la proteína permite que los sitios se encuentren espacialmente cerca.

A su vez, la fotooxidación en algunas proteínas favorece el desplegamiento y los cambios conformacionales, que llevan a la exposición de residuos hidrofóbicos, alterando la dispersión de luz y sus propiedades de rotación ópticas.<sup>9,25,38,39</sup> La estructura y la conformación de cada proteína influyen en el desplegamiento, siendo las estructuras globulares compactas más estables y menos susceptibles al daño de aminoácidos individuales que las que presentan estructuras secundarias y desordenadas (“*random coil*”).

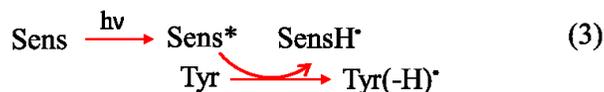
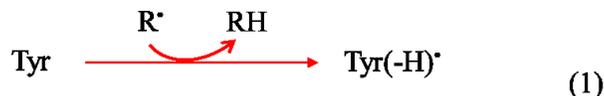
#### 2.2.4. Dímeros de Tirosina

Las modificaciones químicas o estructurales que sufren las proteínas son utilizadas como marcadores de diferentes procesos relacionados con el envejecimiento, el estrés y patogénesis.<sup>40</sup> Una de las modificaciones oxidativas más importantes en proteínas es la formación del enlace covalente entre dos residuos Tyr, para formar el dímero de tirosina (Tyr<sub>2</sub>). Este enlace puede ocurrir entre dos residuos Tyr en la misma proteína o entre dos proteínas distintas. Este último proceso lleva a la formación de productos de mayor peso molecular que afecta a la solubilidad y elasticidad de las proteínas.<sup>41,42</sup> La formación de Tyr<sub>2</sub> se relaciona con situaciones patológicas tales como el caso del Parkinson, cataratas, carcinomas epidérmicos, entre otras.<sup>43</sup> El mecanismo propuesto de formación de Tyr<sub>2</sub>, basado en medidas de resonancia paramagnética electrónica (EPR), involucra la formación del radical neutro Tyr (Tyr(-H)<sup>•</sup>), luego de que Tyr se oxida por transferir un electrón. A continuación, dos radicales Tyr(-H)<sup>•</sup> reaccionan para dar o,o'-Tyr<sub>2</sub> (Figura 2.4).<sup>44</sup>



**Figura 2.4.** Formación postulada para el o,o'-Tyr<sub>2</sub>.

La formación de Tyr<sub>2</sub> *in vivo* puede estar mediada por la exposición de proteínas que contienen residuos Tyr a radicales libres de oxígeno (1), tales como el radical hidroxilo,<sup>40</sup> y por procesos fotoquímicos, ya sea por absorción directa de luz (2)<sup>45,46</sup> o por fotosensibilización (3)<sup>14,44</sup> (Esquema 2.1). Por otro lado, la formación *in vitro* esta mediada por reacciones enzimáticas y por especies reactivas de oxígeno en oscuridad (4) (Esquema 2.1).<sup>47,48</sup>



**Esquema 2.1.** Formación de Tyr<sub>2</sub> *in vivo* (1-3) e *in vitro* (4)

### 2.2.4.1. Métodos de síntesis

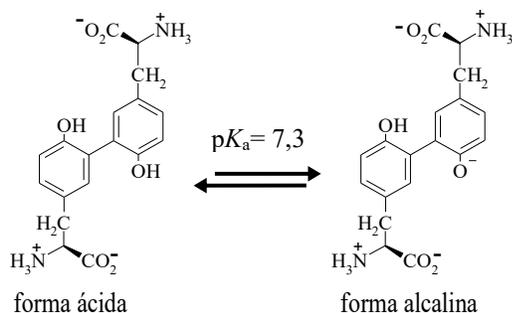
Existen distintos métodos de síntesis de Tyr<sub>2</sub>, sin embargo, hasta el momento ninguno de ellos permite obtener soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> puros y de forma sencilla. Tradicionalmente, se realizaban reacción de acoplamiento arilo-arilo utilizando haluros de arilos o derivados de arilborónicos como materiales de partida, los cuales se reducen en presencia de un metal como el Pd, Cu y Ni.<sup>49</sup> De hecho, Tyr<sub>2</sub> se preparó a partir de la reacción de acoplamiento *Miyaura-borylation-Suzuki* de cuatro pasos, utilizando 3-iodo-L-Tyr como sustrato.<sup>50</sup> Por otro lado, se han llevado a cabo distintas síntesis de Tyr<sub>2</sub>, utilizando agentes oxidantes, tales como Mn (III) y hexacianoferrato (III) de potasio, pero aún no se lograron aplicar estos métodos de manera exitosa.<sup>51-53</sup> El aumento de interés en involucrar a la luz en síntesis orgánicas, permitió descubrir que Tyr es capaz de generar Tyr<sub>2</sub> por absorción directa de luz.<sup>45,46</sup> A su vez, existen muchos ejemplos de la aplicación de catálisis fotoredox en transformaciones orgánicas utilizando metales de transición o fotocatalisis en ausencia de metales.<sup>54-56</sup> La formación de enlaces arilo-arilo puede ocurrir a través de una reacción de oxidación fotocatalizada, como lo reportado para el entrecruzamiento de proteínas por la formación de radicales Tyr, como consecuencia de la fotosensibilización de Tyr en presencia de Rb.<sup>14,44</sup>

A diferencia de los métodos anteriores, la producción de Tyr<sub>2</sub> a partir de la oxidación *in vitro* de Tyr mediante el uso de una peroxidasa, extraída de la planta de rábano picante (*Horseradish*) y peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), es el método más utilizado en la actualidad.<sup>47,48,57</sup> Sin embargo, la principal desventaja es que el aislamiento de Tyr<sub>2</sub> puros de la mezcla de incubación involucra varios pasos. Además, la incubación prolongada de la peroxidasa con Tyr

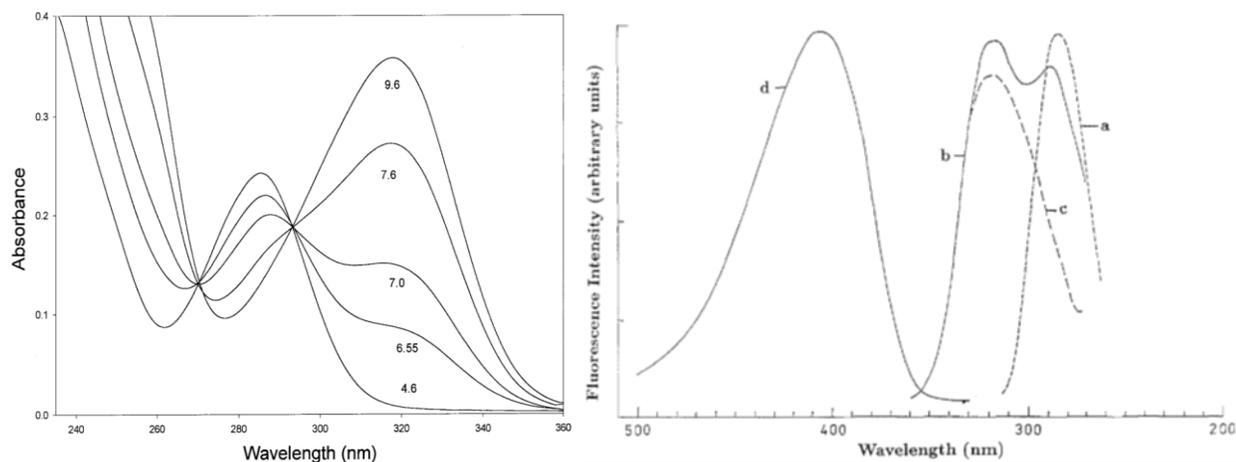
lleva a la generación de otros productos, que incluyen derivados trifenílicos y productos coloreados.<sup>47</sup>

#### 2.2.4.2. Propiedades fisicoquímicas de Tyr<sub>2</sub>

Las propiedades fluorescentes características de Tyr<sub>2</sub> hace que sean utilizados como marcadores oxidativos en péptidos y proteínas.<sup>42,58</sup> Los grupos fenoles de Tyr<sub>2</sub> son mucho más ácidos que el correspondiente a Tyr, ya que presentan valores de pK<sub>a</sub> de 7,3 y 10,5, respectivamente.<sup>59,60</sup> Por otro lado, Tyr<sub>2</sub> posee dos grupos ácidos que poseen un pK<sub>a</sub> de 2,6, mientras que los grupos aminos poseen un pK<sub>a</sub> de ~9,9. Estos valores son similares a los de Tyr, que posee un pK<sub>a</sub> 2,2 y 9,2 para el grupo ácido y amino, respectivamente.<sup>60</sup> A pH fisiológico, Tyr<sub>2</sub> posee dos formas ácido-base, que presentan características espectrales distintas (Figura 2.5).<sup>57,58</sup> La forma ácida (protonada) presenta una banda de menor energía con un máximo en 284 nm, mientras que la forma alcalina (deprotonada) lo tiene en 315 nm. El corrimiento a mayores longitudes de onda de la banda se debe a la disociación del grupo fenol y la contribución del monoanión Tyr<sub>2</sub>, mientras que a pH ácido, la absorbancia a longitudes de onda menores se debe al grupo fenol. Como se observa en la Figura 2.6.a, al medir el espectro de absorción UV de una solución de Tyr<sub>2</sub> en un rango de pH que incluye al pK<sub>a</sub>, se observan ambas bandas y dos puntos isobésticos, en 268 nm y 295 nm.<sup>58,60</sup> Cabe aclarar que no se observa un espectro de absorción correspondiente a una especie fenólica dianiónica, lo que junto con la presencia de los puntos isobésticos definidos y el ajuste de la curva de pH en función de la absorbancia, utilizando un modelo de ácido monoprótico, confirma que un solo protón fenólico se ioniza.<sup>60</sup>



**Figura 2.5.** Equilibrio ácido-base Tyr<sub>2</sub> en soluciones a pH 7,0.



**Figura 2.6.a.** Espectro de absorción UV de Tyr<sub>2</sub> purificado y obtenido a partir de la oxidación enzimática de Tyr. El valor de pH se indica bajo cada espectro (extraído de referencia 58). **b)** Espectros en estado estacionario de soluciones acuosas Tyr<sub>2</sub>. Las curvas a, b y c corresponden con los espectros de excitación ( $\lambda_{em}=408$  nm) a pH 2,0, 6,94 y 10,0, respectivamente. La curva d corresponde al espectro de emisión de fluorescencia a los distintos pH (extraído de referencia 62).

Por otro lado, al analizar la fluorescencia de las dos formas ácido-base de Tyr<sub>2</sub>, se observó que ambas emiten con un máximo centrado en aproximadamente 410 nm, es decir, el espectro de emisión es independiente del pH de la muestra (Figura 2.6.b, curva d). Esto indica que la especie emisora es la misma, es decir, la forma ionizada (alcalina) generada en el estado basal a pH alcalino o la forma ácida en su estado excitado que ioniza. Los espectros de excitación, siguiendo la emisión a 408 nm, se corresponden con sus respectivos espectros de absorción (Figura 2.6.b, curvas a-c).<sup>61,62</sup> En estudios de fluorescencia resulta en el tiempo de Tyr<sub>2</sub>, registrando los decaimientos de emisión a 408 nm, se demostró que entre pH 4,0 y 10,0 la curva se ajusta con una ecuación triexponencial, obteniendo los siguientes valores de tiempos de vida:  $\tau_1=4,5-4,7$  ns,  $\tau_2=0,8-2,9$  ns y  $\tau_3=0,13-0,29$  ns.<sup>62</sup>

El espectro de absorción de Tyr<sub>2</sub> presenta un corrimiento batocrómico inusualmente grande cuando se pasa una solución de pH ácido a alcalino. Esto se debe a la estabilización del estado basal en medio básico, debido a que la formación de la especie monoaniónica lleva a una deslocalización del par libre de electrones del oxígeno deprotonado en el sistema aromático del anillo.<sup>62</sup> Por otro lado, se observa un corrimiento pronunciado de la emisión de fluorescencia con respecto a las bandas de absorción de cada forma ácido-base. Esto se debe a un corrimiento de Stoke's anómalo, como resultado de una reacción consecutiva del estado excitado. Bridges y

colaboradores,<sup>63</sup> sugirieron para el 2,2'-dihidroxibifenol, una subestructura de Tyr<sub>2</sub>, que la deprotonación del estado excitado de un solo grupo hidroxilo puede causar el corrimiento de Stoke's que se observa para Tyr<sub>2</sub>.

### 2.2.5. Fotoalergia

Como consecuencia de una alteración en una proteína, se puede desencadenar un proceso de fotoalergia, es decir, un trastorno de fotosensibilidad asociado a una modificación de la habilidad de la piel para reaccionar con el efecto combinando de una droga y la luz solar. Es el resultado de la conversión de un xenobiótico a un antígeno, luego de la activación fotoquímica en sistemas biológicos. La fotoalergia se atribuye a la formación de una proteína modificada, ya sea por su unión covalente a una droga con capacidad fotosensibilizadora, a intermediarios fotoquímicos o fotoproductos; que puede actuar como un antígeno, desencadenando una respuesta inmune.<sup>64</sup> Los agentes fotoalergénicos reportados suelen ser compuestos exógenos, tales como antifúngicos, antibacteriales, tranquilizantes, protectores solares, entre muchos otros.<sup>65</sup> El trifusal es un fármaco inhibidor de la agregación plaquetaria el cual, luego de su absorción, se transforma a su metabolito activo, el ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoico (HTB), en el hígado. Se ha demostrado que HTB posee la capacidad de inducir fotoalergia en humanos. E. Nuin y colaboradores,<sup>66</sup> reportaron que al exponer a radiación solar al HTB en presencia de una proteína globular modelo como la ubiquitina (Ub), se genera la unión covalente entre ambos. A partir de estudios fotofísicos y de proteómica, se confirma que la formación del monoadocto HTB-Ub es el producto principal, pero que la reacción ocurre en los grupos aminos de los siete residuos Lys presentes en la secuencia de la Ub, involucrando el reemplazo del grupo trifluorometilo del HTB con un nuevo grupo amida. Al trabajar a concentraciones, tanto de la droga como de la proteína, del orden de las presentes en el plasma sanguíneo, se espera que ocurra una respuesta inmune en pacientes que se encuentran bajo tratamientos con trifusal cuando se exponen a radiación solar, lo que desencadenaría la fotoalergia.

## 2.3. Daño fotoinducido a otras biomoléculas

### 2.3.1. Ácido desoxirribonucleico (ADN)

La radiación electromagnética ocasiona modificaciones químicas en la biomolécula de ADN a través de diversos mecanismos, lo que puede originar alteraciones a nivel celular.<sup>67</sup> Si el daño en el material genético de una célula es significativo y no puede ser revertido por los mecanismos de reparación celular, lleva a la muerte celular. Si el daño en el material genético no es suficiente como para provocar la muerte, las consecuencias para la célula dependerán del tipo y magnitud de las lesiones. Antes de que se produzca la división celular, el material genético debe duplicarse. Si el ADN utilizado como molde posee alguna base modificada químicamente (por ejemplo, por exposición a radiación UV) es probable que se genere una mutación durante la replicación del ADN, es decir, un cambio permanente en la secuencia de bases, a pesar de los múltiples sistemas de reparación que poseen las células. La modificación se puede dar debido a la sustitución de un par de bases por otro (mutación por sustitución) o por la adición o la eliminación de uno o más pares de bases (mutaciones de inserción o deleción).

El ADN puede ser dañado por dos tipos de mecanismos. Por un lado, la absorción directa de radiación UV-B y UV-C por las bases nitrogenadas que lo componen, genera estados excitados que vuelven reactiva a la biomolécula de ADN, produciendo su modificación o alteración química (daño directo). Los principales fotoproductos generados en el ADN por absorción directa de radiación UV-B son los dímeros ciclobutil pirimidina (CPD) y los aductos pirimidina-(6,4)-pirimidona. Si la radiación incidente es de tipo UV-C, el daño puede revertirse por un proceso de monomerización, ya que los dímeros absorben en esa región del espectro electromagnético. También pueden sufrir procesos de deaminación, generando así un nuevo producto. Se cree que la formación de CPD tiene lugar por la fotoexcitación de una pirimidina a un estado excitado singlete, y que tras la formación del triplete por un cruce de sistemas, reacciona con una segunda molécula adyacente en estado fundamental.<sup>68</sup> La formación de 6,4-fotoproductos involucra reacciones de estados excitados singletes, y a diferencia de los CDP, el proceso no es reversible.

Por otro lado, la absorción de radiación UV-A y visible por parte de otro cromóforo genera especies químicas que reaccionan con el ADN (daño indirecto por procesos fotosensibilizados). La radiación UV-A también induce la formación de CPD en el ADN, aunque en menor medida que la UV-B y a través de un mecanismo diferente. La fotoexcitación con radiación UV-A de un sensibilizador apropiado, como benzofenona, puede originar CPD tras la formación de estados excitados capaces de participar en reacciones de transferencia de energía

triplete-triplete con determinadas bases del ADN.<sup>69</sup> La guanosina (Gua) es la base que posee el menor potencial de oxidación, por lo que en un mecanismo de transferencia electrónica, es la más reactiva en comparación con las otras tres bases nitrogenadas.<sup>67,70</sup> La formación del radical catión de guanosina ( $\text{dGuo}^{\bullet+}$ ) en el ADN en presencia de un fotosensibilizador Tipo I, se puede originar por la abstracción de un electrón de un residuo Gua o mediante una transferencia de huecos desde otra base relativamente lejana. Los principales productos generados a partir del radical  $\text{dGuo}^{\bullet+}$  son 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapydGuo), 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), 2-amino-5-[2-desoxi-b-Deritro-pentofuranosil) amino]-4H-imidazol-4-ona (imidazolona) y 2,2-diamino-5-[2-desoxi-b-Deritro-pentofuranosil)amino]-5(2H)-oxazolona (oxazolona). Por otro lado, en las reacciones que tienen lugar a través de un mecanismo Tipo II, la base Gua es el único componente del ADN que reacciona significativamente con  $^1\text{O}_2$  a pH neutro.<sup>71</sup> El producto de oxidación de Gua vía  $^1\text{O}_2$  es la espiroiminodihidantoína (Sp).<sup>72</sup>

### 2.3.2. Lípidos

La peroxidación lipídica se encuentra involucrada en distintos aspectos fisiológicos y patológicos, en general, como consecuencia de un daño oxidativo.<sup>73</sup> Este proceso puede ocurrir por tres mecanismos distintos: por la oxidación mediada por radicales libres, la cual ocurre a través un mecanismo de reacción en cadena (iniciación, propagación y terminación); por la oxidación independiente de radicales libres, que involucran la participación de  $^1\text{O}_2$  (mecanismo Tipo II); y por la oxidación enzimática.<sup>74</sup> El mecanismo más importante es a partir de radicales libres, donde la fase de iniciación involucra la abstracción de un átomo de hidrogeno y los *targets* principales son los fosfolípidos que contienen ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Si bien los PUFAs no absorben radiación solar o luz artificial, pueden sufrir oxidaciones fotosensibilizadas por fotonsensibilizadores tanto endógenos como exógenos y pueden reaccionar tanto por un mecanismo Tipo I como Tipo II.<sup>75,76</sup> Los productos de oxidación generados principalmente en la oxidación lipídica, ya sea por la oxidación mediada por radicales o  $^1\text{O}_2$ , son los hidroperóxidos (LOOH).

**Bibliografía**

- <sup>1</sup> F.P. Gasparro, “In Sunscreen Photobiology”; Spring-Verlag: New York, 1997.
- <sup>2</sup> M.P. Serrano, Tesis Doctoral; Universidad Nacional de La Plata, 2014.
- <sup>3</sup> R. V. Bensasson, *et.al*, “*Pulse radiolysis and flashphotolysis: Contributions to the chemistry of biology and medicine*”, Pergamon Press, Oxford, 1983.
- <sup>4</sup> R. V. Bensasson, *et.al*, “*Excited states and free radicals in biology and medicine*”, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- <sup>5</sup> M. J. Davies, *et.al*, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 17-25, 2004.
- <sup>6</sup> M. J. Davies, R. J. W. Truscott, *J. Photochem. Photobiol. B*, **63**, 114-125, 2001.
- <sup>7</sup> E. J. Hart, M. Anbar, “*The hydrated electron*”, Wiley-Interscience, New York, 1970.
- <sup>8</sup> M. J. Davies, R. T. Dean, “*Radical-mediated protein oxidation: From chemistry to medicine*”, Oxford University Press, Oxford, 1997.
- <sup>9</sup> R. C. Straight, J. D. Spikes, “*Photosensitized oxidation of biomolecules, in Singlet O<sub>2</sub>*”, Ed. A.A. Frimer, CRC Press, Boca Raton, pp. 91-143, 1985.
- <sup>10</sup> D.I. Pattison, *et.al*, *Photochem. Photobiol. Sci.* **11 (1)**, 38-53, 2012.
- <sup>11</sup> M. J. Davies, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 761-770, 2003.
- <sup>12</sup> J. R. Lakowicz, “*Principles of Fluorescence Spectroscopy*”, Tercera Edición, Springer, 2006.
- <sup>13</sup> E. Silva, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **23**, 43-48, 1994.
- <sup>14</sup> E. Silva, J. Godoy, *Internat.J. Vit.Nutr.Res.*, **64**, 253-256, 1994.
- <sup>15</sup> K. Huvaere, L. H. Skibsted, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 8049-8060, 2009.
- <sup>16</sup> V. V. Agon, *et.al*, *Free Radical Biol. Med.*, **40**, 698-710, 2006.
- <sup>17</sup> M. Tomita, *et.al*, *Biochemistry*, **8**, 5149-5160, 1969.
- <sup>18</sup> H.R. Shen, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol., B*, **34**, 203-210, 1996.
- <sup>19</sup> H.R. Shen, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol., A*, **130**, 1-6, 2000.
- <sup>20</sup> R.W. Murray, S.L. Jindal, *Photochem. Photobiol.*, **16**, 147-151, 1972.
- <sup>21</sup> C. Schöneich, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, **1703**, 111-119, 2005.
- <sup>22</sup> G.L. Hug, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **68**, 785-796, 1998.
- <sup>23</sup> T. Pedzinski, *et.al*, *Res. Chem. Intermed.*, **35**, 497-506, 2009.
- <sup>24</sup> G. E. Ronsein, *et.al*, *Quim. Nova*, **29**, 563-568, 2006.
- <sup>25</sup> L. Redecke, *et.al*, *Free Radical Biol. Med.*, **46**, 1353-1361, 2009.
- <sup>26</sup> S. Roy, *et.al*, *J. Pharm. Sci.*, **98**, 3182-3199, 2009.

- <sup>27</sup> J.D. Goosey, *et.al*, *Science*, **208**, 1278-1280, 1980.
- <sup>28</sup> M. Francis Simpanya, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1589-1595, 2008.
- <sup>29</sup> W. Wang, *et.al*, *Int. J. Pharm.*, **390**, 89-99, 2010.
- <sup>30</sup> H. Shen, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol.*, A, **133**, 115-122, 2000.
- <sup>31</sup> H. Verweij, J. van Steveninck, *Photochem. Photobiol.*, **35**, 265-267, 1982.
- <sup>32</sup> J. Dillon, R. Chiesa, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **57**, 526-530, 1993.
- <sup>33</sup> A. Michaeli, J. Feitelson, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **59**, 284-289, 1994.
- <sup>34</sup> S. Rinalducci, *et.al*, *J. Proteome Res.*, **4**, 2327-2337, 2005.
- <sup>35</sup> C. L. Hawkins, M. J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1504**, 196-219, 2001.
- <sup>36</sup> A. Wright, *et.al*, *Redox Rep.*, **5**, 159-161, 2000.
- <sup>37</sup> A. Wright, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **76**, 35-46, 2002.
- <sup>38</sup> C. Prinsze, *et.al*, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1038**, 152-157, 1990.
- <sup>39</sup> T. K. Dalsgaard, *et.al*, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 10968-10976, 2007.
- <sup>40</sup> K.J. Davies, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895-9901, 1987.
- <sup>41</sup> R. Kanwar, D. Balasubramanian, *Exp. Eye Res.*, **68**, 773-784, 1999.
- <sup>42</sup> R. Amado, R. *et.al*, *Methods Enzymol.*, **107**, 377-388, 1984.
- <sup>43</sup> D. Balasubramanian, R. Kanwar, *Mol. Cell. Biochem.*, **234/235**, 27-38, 2002.
- <sup>44</sup> T. K. Dalsgaard, *et.al*, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 7939-7947, 2011.
- <sup>45</sup> G. Boguta, A. M. Dancewicz, *Studia Biophys.*, **73**, 149-156, 1979.
- <sup>46</sup> G. Boguta, A. M. Dancewicz, *Int. J. Radiat. Biol.*, **39**, 163-174, 1981.
- <sup>47</sup> A. J. Gross, I. W. Sizer, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1611-1614, 1959.
- <sup>48</sup> V. Malanik, M. Ledvina, *Prep. Biochem.*, **9**, 273-280, 1979.
- <sup>49</sup> J. Hassan, *et.al*, *Chem Rev.*, **102**, 1359-470, 2002.
- <sup>50</sup> C. A. Hutton, O. Skaff, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 4895-4898, 2003.
- <sup>51</sup> S. Nishiyama, *et.al*, *Tetrahedron Lett.*, **35**, 8397-8400, 1994.
- <sup>52</sup> H. Eickhoff, G. Jung, A. Rieker, *Tetrahedron*, **57**, 353-364, 2001.
- <sup>53</sup> D. Lee, *et.al*, *Process Biochem.*, **43**, 999-1003, 2008.
- <sup>54</sup> J. M. R. Narayanama, C. R. J. Stephenson, *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 102-113, 2011.
- <sup>55</sup> C. K. Prier, *et.al*, *Chem. Rev.*, **113**, 5322-5363, 2013.
- <sup>56</sup> I. Ghosh, *et.al*, *Acc. Chem. Res.*, **49**, 1566-1577, 2016.
- <sup>57</sup> S. O. Andersen, *Acta Physio. Scand.*, **66**, 1-81, 1966.

- <sup>58</sup> D. A. Malencik, *et.al*, *Anal. Biochem.*, **242**, 202-213, 1966.
- <sup>59</sup> S. O. Andersen, *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 249-262, 1963.
- <sup>60</sup> S. F. Mahamoud, S. E. Bialkowski, *Appl. Spectrosc.*, **49**, 1669-1676, 1995.
- <sup>61</sup> S. S. Lehrer, G. D. Fasman, *Biochemistry*, **6**, 757-767, 1967.
- <sup>62</sup> A. J. Kungl, *et.al*, *J. Fluoresc.*, **2 (1)**, 63-73, 1992.
- <sup>63</sup> J. W. Bridges, *et.al*, *Biochem. J.*, **96**, 872-878, 1965.
- <sup>64</sup> S. Montaro, *et.al*, *Chem. Med. Chem.*, **4**, 1196-1202, 2009.
- <sup>65</sup> L.C. Harber, R. Baer, *J. Invest. Dermatol.*, **58**, 327-342, 1972.
- <sup>66</sup> E. Nuin, *et.al*, *Front. Pharmacol.*, **7**, 1-8, 2016.
- <sup>67</sup> J.L. Ravanat, *et.al*, *Photochem. Photobiol. B*, **63**, 88-102, 2001.
- <sup>68</sup> J. Cadet, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **15**, 277-298, 1992.
- <sup>69</sup> T. Delatour, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **44**, 191-198, 1998.
- <sup>70</sup> S. Steenken, S.V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 617-618, 1997.
- <sup>71</sup> J. Cadet, R. Treoule, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 661-667, 1978.
- <sup>72</sup> W. Luo, *et.al*, *C. J. Organic Letters*, **2**, 613- 616, 2000.
- <sup>73</sup> A. Catalá, *et.al*, *Chem. Phys.Lipids*, **157**, 1-11, 2009.
- <sup>74</sup> E. Niki, *et.al*, *Free. Radic.Biol.Med.*, **47**, 469-484, 2009.
- <sup>75</sup> A.W. Girotti, *et.al*, *Photochem.Photobiol.*, **51**, 497-509, 1990.
- <sup>76</sup> F. Boscá, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **58**, 1-5, 2000.

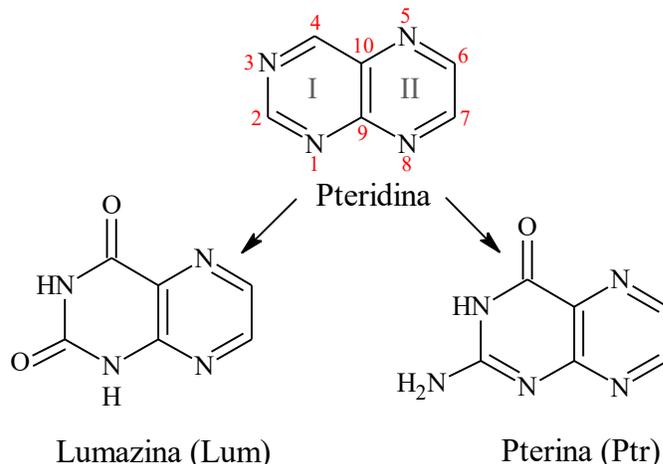
## CAPÍTULO 3

# PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS DE LAS PTERINAS

Las pteridinas son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos muy distribuidos en la naturaleza. Aunque se encuentran presentes en muy pequeñas cantidades en los seres vivos, son esenciales en los mamíferos ya que desempeñan diversas funciones. Los primeros trabajos científicos relacionados con las pteridinas, se llevaron a cabo en el año 1889. En estos trabajos, se manifiestan los primeros intentos por aislar algunos pigmentos de diferentes clases de mariposas.<sup>1-3</sup> Más tarde, se elucidó la estructura molecular de éstos pigmentos, planteándolos como derivados del heterociclo pirazina[2,3-d]pirimidina<sup>4,5</sup> al que, posteriormente, se lo denominó pteridina.<sup>6</sup>

### 3.1. Propiedades químicas y fotofísicas

Las pteridinas pueden definirse como tetra-azo-naftalenos. En la Figura 3.1 se observa la estructura heterocíclica común a todas las pteridinas con la correspondiente numeración. El anillo I corresponde a la estructura de la pirimidina, mientras que el anillo II a la pirazina. En la naturaleza esta familia de compuestos se puede subdividir en pterinas (2-aminopteridin-4(3*H*)-ona o pterina) y lumazinas (pteridin-2,4(1*H*, 3*H*)-diona) (Figura 3.1).

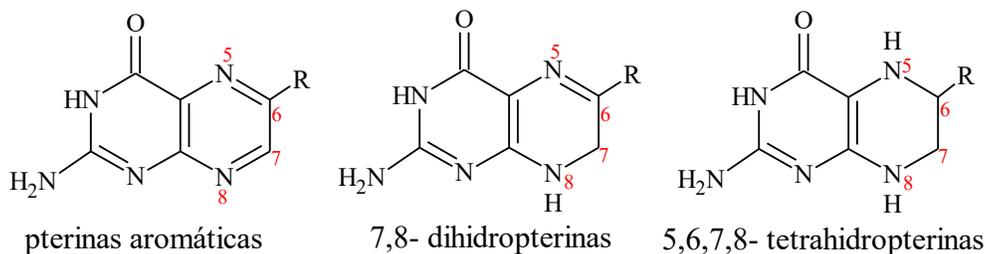


**Figura 3.1.** Estructura química básica de las pteridinas con sus dos anillos típicos: pirimidínico (I) y pirazínico (II). Estructuras de las pteridinas no sustituidas lumazina y pterina.

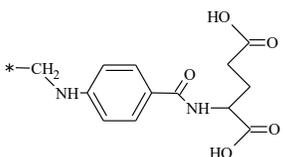
Los derivados pterínicos se encuentran normalmente sustituidos en la posición 6 del doble anillo. En la Tabla 3.1 se resumen los sustituyentes de los derivados pterínicos más importantes desde el punto de vista biológico. En función de la estructura del sustituyente, se pueden clasificar en dos grupos:

- ✓ Pterinas no conjugadas, cuyos sustituyentes poseen una corta cadena hidrocarbonada o un solo átomo de carbono.
- ✓ Pterinas conjugadas, cuyos sustituyentes son de mayor peso molecular e incluyen una molécula de ácido *p*-aminobenzoico (PABA). Un ejemplo es el ácido fólico (PteGlu), que además del PABA posee una molécula de ácido glutámico unidas por una unión peptídica.

En la naturaleza, las pterinas se pueden encontrar en diferentes estados de oxidación, donde el anillo pirazina es el que se encuentra parcial o completamente reducido. Las pterinas reducidas más comunes presentes en sistemas biológicos son las 7,8-dihidropterinas y las 5,6,7,8-tetrahidropterinas (Figura 3.2).<sup>7</sup>

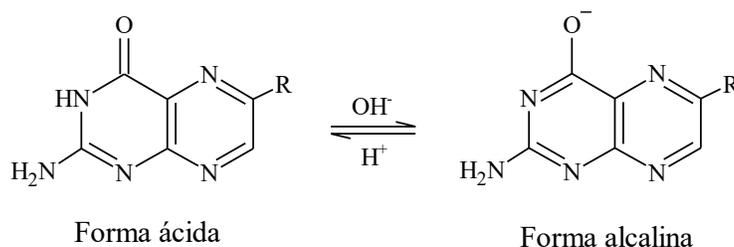


**Figura 3.2.** Estructura química de las pterinas aromáticas, 7,8-dihidropterinas y 5,6,7,8-tetrahidropterinas.

Pterinas oxidadas	-R
Pterina (Ptr)	-H
6-metilpterina (Mep)	-CH <sub>3</sub>
6-formilpterina (Fop)	-CHO
6-carboxipterina (Cap)	-COOH
Biopterina (Bip)	-(CHOH) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
Neopterina (Nep)	-(CHOH) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> OH
Ácido Fólico (PteGlu)	

**Tabla 3.1.** Estructura y nomenclatura de algunas pterinas oxidadas.

En la Figura 3.3 se muestra el equilibrio ácido-base más importante de las pterinas en solución acuosa, considerando los valores de pH presentes en los sistemas biológicos. La forma ácida (amida) de este equilibrio corresponde a la forma neutra, mientras que la forma alcalina (fenolato) posee una carga negativa. Este equilibrio ya ha sido estudiado en solución acuosa, habiéndose publicado valores de  $pK_a$  cercanos a 8 para las pterinas aromáticas,<sup>8-12</sup> y próximos a 10 para las dihidropterinas.<sup>13-16</sup> Durante el desarrollo de esta tesis se trabajó con Ptr, que es el compuesto modelo no sustituido de las pterinas oxidadas y cuyo  $pK_a$  es 7,9.<sup>9</sup>



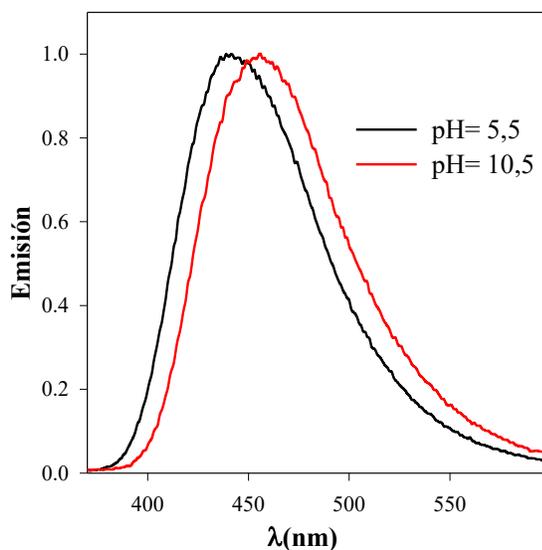
**Figura 3.3.** Equilibrio ácido-base del anillo pterínico en solución acuosa de pH entre 5 y 11.

La forma neutra de las pterinas presenta un equilibrio tautomérico (Figura 3.4), el cual consiste en una transferencia de protón muy rápida, desde el nitrógeno en posición 3 (lactama) al



**Figura 3.5.** Espectros de absorción de la forma ácida y alcalina de Ptr en solución acuosa.

Existen diversos estudios sobre los estados excitados de los distintos compuestos pterínicos, ya sea pterinas oxidadas o los dihidroderivados. Las características fluorescentes de las pterinas aromáticas (espectros de emisión y excitación, rendimiento cuántico de emisión ( $\Phi_F$ ) y tiempo de vida ( $\tau_F$ )) dependen de varios factores.<sup>11,20,21</sup> Por un lado, varían según la naturaleza química del sustituyente de la posición 6 del anillo pterínico. Mientras las denominadas pterinas conjugadas poseen una fluorescencia despreciable, las no conjugadas, por el contrario, presentan emisión con  $\Phi_F$  entre 0,1-0,85. En particular, Ptr posee un  $\Phi_F$  de 0,33 y de 0,27 a pH 5,5 y 10,5, respectivamente. El pH del medio es otro factor significativo, debido a que la forma ácido-base también afecta a las características de emisión de estos compuestos. Concretamente, en medio alcalino los espectros de emisión presentan un desplazamiento hacia el visible (entre 10 y 15 nm), si se comparan con los obtenidos en medio ácido. Además, es importante mencionar, que los espectros de emisión normalizados de las pterinas no conjugadas son independientes de la longitud de onda de excitación, sugiriendo que la emisión fluorescente solo tiene lugar desde el estado excitado singlete de menor energía ( $S_1$ ). En la Figura 3.6 se muestra, a modo de ejemplo, los espectros de emisión normalizados de las formas ácido-base de Ptr.



**Figura 3.6.** Espectros de emisión normalizados de la forma ácida y básica de Ptr en solución acuosa ( $\lambda_{exc} = 350$  nm).

En los estudios de absorción de transientes de pterinas por la técnica de fotólisis de destello láser, se postula que al excitar una solución de Ptr a 355 nm se observan en simultáneo tanto especies tripletes como radicales.<sup>22</sup> Los autores asignaron dos de estos transientes a estados tripletes de Ptr. Uno de ellos con un máximo de absorción a 550 nm y un tiempo de vida del estado excitado triplete ( $\tau_T$ ) de  $2,3 (\pm 0,2) \mu s$ , mientras que el otro transiente posee dos máximos de absorción a 415 y 600 nm y un  $\tau_T$  de  $0,3 (\pm 0,1) \mu s$ . Según los autores del trabajo, la existencia de dos estados excitados triplete se debe al equilibrio tautomérico presente en el estado fundamental de Ptr (Figura 3.4).

Las pterinas no conjugadas presentan una elevada eficiencia de producción de  $^1O_2$  cuando se encuentran en solución acuosa y bajo irradiación UV-A.<sup>23</sup> Presentan valores de rendimientos cuánticos de producción de  $^1O_2$  ( $\Phi_\Delta$ ) comprendidos entre 0,18-0,47. En particular, Ptr tiene  $\Phi_\Delta$  de 0,18 y 0,30 a pH 5,5 y 10,5, respectivamente. En cambio, las pterinas conjugadas, como PteGlu, no generan esta especie reactiva de oxígeno. Para explicar la diferencia observada con PteGlu, se propuso que la cadena lateral actúa como desactivador interno, aumentando la velocidad de desactivación no radiativa (IC) del estado excitado singlete. Así, la emisión es muy débil y el cruce entre sistemas extremadamente ineficiente, y por lo tanto, no se genera  $^1O_2$ . Por último, los valores revelan que tanto la naturaleza del sustituyente de la posición 6 del anillo pterínico como el pH del medio afectan significativamente los valores de  $\Phi_\Delta$ , siendo mayor en medio alcalino para las pterinas estudiadas.

### 3.2. Propiedades bioquímicas

Aunque las pterinas se encuentran en muy pequeñas cantidades en los organismos vivos, participan en muchas reacciones bioquímicas de gran importancia, por ejemplo, la 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina ( $H_4Bip$ ) actúa como cofactor de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos:

- ✓ Fenilalanina hidroxilasa, que convierte fenilalanina en tirosina, reacción muy importante en el catabolismo de este aminoácido, otorgando así el sustrato para la primera reacción de la síntesis de melanina (melanogénesis).
- ✓ Tirosina hidroxilasa, que cataliza la conversión de tirosina a 3,4-hidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA), primer paso en la biosíntesis de catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina).

✓ Triptófano hidroxilasa, necesaria para la síntesis de serotonina y melatonina a partir del triptófano

La neopterina (Nep) y su forma reducida, 7,8-dihidroneopterina (H<sub>2</sub>Nep) son intermediarios de la biosíntesis de H<sub>4</sub>Bip, su principal interés bioquímico proviene de su participación en procesos inmunológicos. Se ha encontrado que ante una activación del sistema inmune, los macrófagos sintetizan y liberan al medio, entre otras sustancias, especies reactivas de oxígeno (EROs), H<sub>2</sub>Nep y Nep.<sup>24</sup> El rol de estas pterinas en la respuesta inflamatoria no ha sido totalmente dilucidado.

Otro derivado pterínico de importancia biológica es el ácido fólico (PteGlu) y sus derivados reducidos. El PteGlu es una molécula indispensable para la vida, los derivados activos del PteGlu participan en la biosíntesis de nucleótidos y en el metabolismo de aminoácidos, transportando unidades activas de un átomo de carbono. Los requerimientos de folatos aumentan en períodos de rápida división celular y crecimiento, por lo que es indispensable mantener sus niveles de concentración adecuados durante el embarazo.<sup>25</sup> Más aún, en mujeres embarazadas se ha relacionado la deficiencia de estos metabolitos con el aumento de los defectos de tubo neural en el feto, tales como espina bífida y anencefalia.<sup>26</sup> Por otra parte, el déficit de folatos está relacionado con el desarrollo de otras enfermedades tales como la anemia megaloblástica, cardiopatías y problemas de fertilidad.<sup>27</sup>

### 3.3. Vitiligo

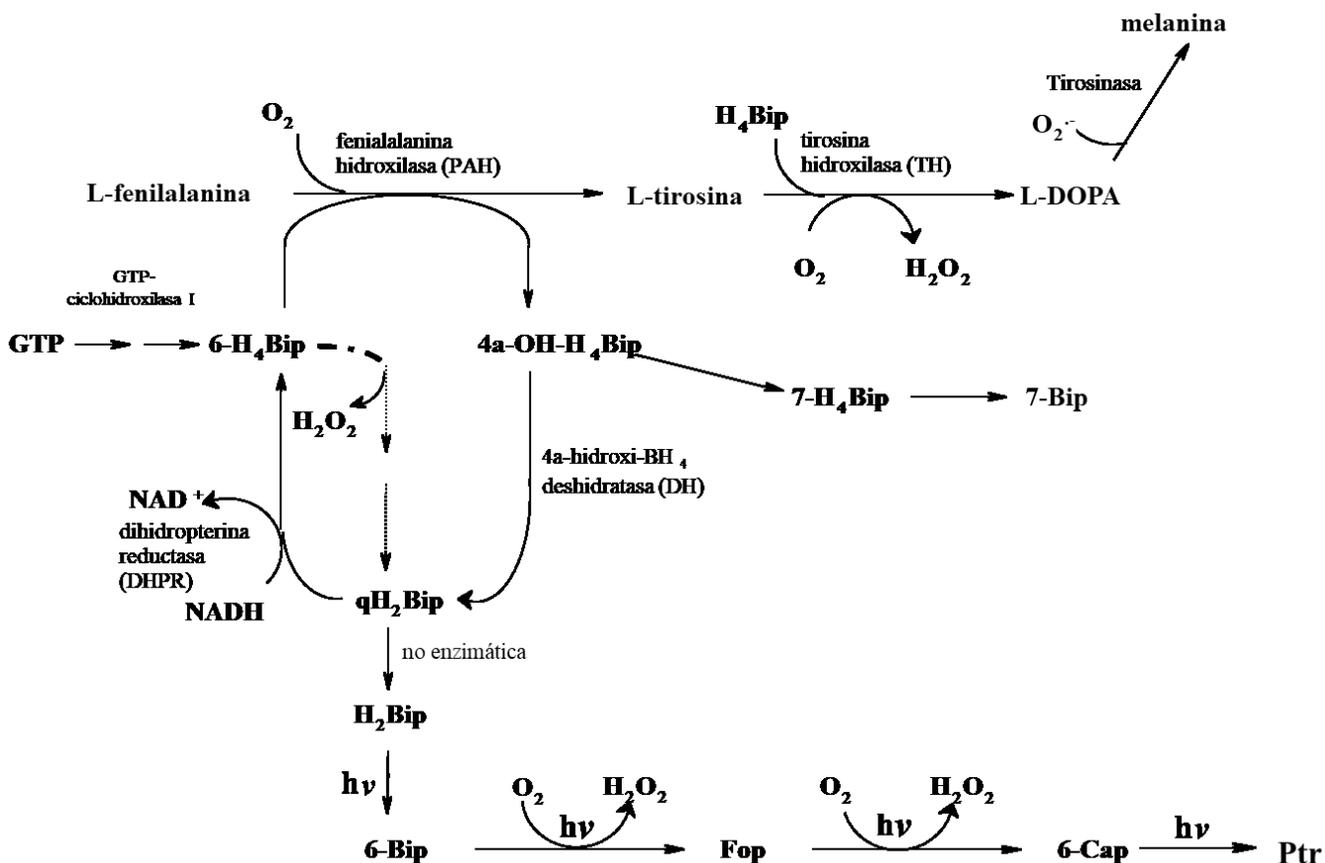
El vitiligo es una patología cutánea en la cual falla la protección contra la radiación UV por una alteración en la síntesis de melanina, que lleva a la aparición de manchas blancas sobre la piel. Estas manchas muestran una fluorescencia característica cuando se someten al examen con luz de Wood (351 nm). Se ha confirmado que este fenómeno ocurre por la acumulación de pterinas oxidadas en las zonas afectadas por la enfermedad,<sup>28,29</sup> ya que son compuestos muy fluorescentes.<sup>30</sup> Por este motivo, resulta interesante comentar el papel que juegan varios derivados pterínicos en esta patología.

Los pacientes con vitiligo presentan un gran aumento en la síntesis *de novo* de H<sub>4</sub>Bip, y una alteración de la ruta de reciclado de este cofactor (Esquema 3.1).<sup>31-33</sup> El aumento de los niveles de este tetrahydroderivado lleva a la acumulación de 7,8-dihidrobiopterina (H<sub>2</sub>Bip) y 7-

H<sub>4</sub>Bip (un isómero de H<sub>4</sub>Bip).<sup>34</sup> Este último es un potente inhibidor de la actividad de fenilalanina hidroxilasa (PAH), enzima que otorga el sustrato de la primera reacción de la melanogénesis.<sup>35</sup> Como consecuencia de la baja actividad de PAH, falla la protección contra la radiación UV dado que no se sintetiza melanina, y aumentan los niveles de Phe en piel, favoreciendo la síntesis de H<sub>4</sub>Bip y aumentando aún más los niveles de este tetrahidroderivado. El incremento de los niveles de Phe y de 7-H<sub>4</sub>Bip, la disminución de la actividad enzimática y la oxidación no enzimática de H<sub>4</sub>Bip a qH<sub>2</sub>Bip, llevan a la generación y acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la piel de estos pacientes (Esquema 3.1).<sup>36</sup> Esta acumulación conduce a la inactivación de la enzima catalasa,<sup>37</sup> haciendo que en los melanocitos el medio se vuelva fuertemente oxidante debido a las altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (de orden milimolar).

Como se mencionó anteriormente, en la manchas despigmentadas de los pacientes con vitiligo, se acumulan derivados pterínicos aromáticos, sin embargo, el origen de estos aún no ha sido dilucidado. Teniendo en cuenta que en estas zonas hay acumulación de H<sub>2</sub>Bip proveniente de la oxidación de H<sub>4</sub>Bip, un posible origen de las pterinas aromáticas puede ser la oxidación fotoquímica de este dihidroderivado el cual da origen a su forma oxidada (Bip) (Esquema 3.1).<sup>38</sup> Posteriormente, Bip puede ser fotooxidada generando como productos finales H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Cap. Esto fue demostrado a través del descubrimiento de la presencia de cantidades considerables de Cap en la piel de pacientes con vitiligo.<sup>39</sup> Esta última por reacción fotoquímica es oxidada dando origen a la Ptr.<sup>40</sup> Si bien estos procesos han sido estudiados en solución acuosa, pueden estar ocurriendo en zonas de la piel que no poseen protección contra la radiación.

El incremento de los niveles de especies oxidantes en las manchas depigmentadas quedó demostrado por biopsias de piel, en las que se encuentra un alto grado de vacuolización y peroxidación lipídica. Además de la inhibición de PAH, se ha demostrado que en los tejidos afectados por vitiligo se produce inhibición de una de las enzimas más importantes de la melanogénesis, la tirosinasa, pero, en la mayor parte de los casos, los mecanismos involucrados en dichos procesos no están dilucidados. A partir de este hecho, el estudio de la fotoquímica de los compuestos presentes en la piel, y en particular, de los procesos fotosensibilizados que afectan a las biomoléculas adquiere gran relevancia.



**Esquema 3.1.** Síntesis *de novo*, reciclado y regulación de la síntesis de  $H_4Bip$  que tiene lugar en la melanogénesis.

Las flechas punteadas indican la ruta corta de reciclado de  $H_4Bip$ , favorecida en el vitiligo.

## Bibliografía

- <sup>1</sup> F. G. Hopkins, *Proc. Chem. Soc.*, **5**, 117, 1889.
- <sup>2</sup> F. G. Hopkins, *Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B*, **186**, 661-682, 1895.
- <sup>3</sup> F. G. Hopkins, *Proceedings Chem. Soc. London. Ser. B - Biol. Sci.* **130**, 359-379, 1942.
- <sup>4</sup> R. Purmann, *Liebigs Ann. Chem.*, **544**, 182-190, 1940.
- <sup>5</sup> R. Purmann, *Liebigs Ann. Chem.*, **548**, 284-292, 1941.
- <sup>6</sup> C. Schöpf, R. Reichert, *Liebigs Ann. Chem.*, **548**, 82-94, 1941.
- <sup>7</sup> M. L. Dántola, *et.al, Helvet. Chim. Acta*, **91**, 411-425, 2008.
- <sup>8</sup> A. Albert, *Biochem. J.*; **54**, 646-654, 1953.
- <sup>9</sup> V.D. Monópoli, *et.al, Int. J. Chem. Kinet.* **32**, 231-237, 2000.
- <sup>10</sup> A.H. Thomas, *et.al, Transit. Met. Chem.* **21**, 317-321, 1996.

- <sup>11</sup> C. Lorente, *et.al*, *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 167-173, 2004.
- <sup>12</sup> A.H. Thomas, A, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **135**, 147–154, 2000.
- <sup>13</sup> W. Pfeleiderer, “Chemistry and properties of dihydropterins, in *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*”, J. A. B. W. d. G. . C., Ed.; Berlin, New York, 1987.
- <sup>14</sup> W. Pfeleiderer, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **1**, 54-60, 1978.
- <sup>15</sup> G. Maharaj, *et.al*, *Biochemistry*, **29**, 4554-4560, 1990.
- <sup>16</sup> M.L. Dántola, Tesis doctoral; La Plata; 2008
- <sup>17</sup> S. Murata, *et.al*, *Top. Heterocycl. Chem.*, SpringerVerlag Berlin Heidelberg, **8**, 127-171, 2007.
- <sup>18</sup> A. H. Thomas, *et.al*, *Helvet. Chim. Acta*, **85**, 2300-2315, 2002.
- <sup>19</sup> F. M. Cabrerizo, *et.al*, *Photochem. Photob.*, **81**, 793-801, 2005.
- <sup>20</sup> A. H. Thomas, *et.al*, *Photochem. Photobiol.Sciences*, **1**, 421-426, 2002.
- <sup>21</sup> F. M. Cabrerizo, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **81**, 1234-1240, 2005.
- <sup>22</sup> C. Chahidi, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **33**, 641-649, 1981.
- <sup>23</sup> A.H. Thomas, *et.al*, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**, 245 -250, 2003.
- <sup>24</sup> J. M. Hevel, M. A. Marietta *Biochem.*, **31**, 7160, 1992.
- <sup>25</sup> L. B. Bailey, J. F. Gregory, *J. Nutr.* **129**, 779-782, 1999.
- <sup>26</sup> L. E. Mitchell, *Am. J. Med. Genet. C. Semin Med. Genet.* **135**, 88-94, 2005.
- <sup>27</sup> T. Tamura, M. Frances, *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 993-1116, 2006.
- <sup>28</sup> K. U. Schallreuter, *et.al*, *Science*, **263**, 1444-1446, 1994.
- <sup>29</sup> K. U. Schallreuter, *et.al*, *Biochim. Biophys.Acta*, **1226**, 181-192, 1994.
- <sup>30</sup> C. Lorente, A.H. Thomas, *Acc. Chem. Res.*, **39**, 395-402, 2006.
- <sup>31</sup> S. Kaufman, *J. Biol. Chem.*, **245**, 4751-4759, 1970.
- <sup>32</sup> C. Y. Huang, *et.al*, *J. Biol. Chem.*, **248**, 4235-4241, 1973.
- <sup>33</sup> J. E. Ayling, *et.al*, *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*, Eds. W. Pfeleiderer and R. Rokos, Blackwell Science, Berlin, 565-570, 1997.
- <sup>34</sup> H. C. Curtius, *et.al*, *J. Biol. Chem.*, **265**, 3923-3930, 1990.
- <sup>35</sup> M. D. Davis, *et.al*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 10109-10113, 1992.
- <sup>36</sup> K. U. Schallreuter, *et.al*, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, **4**, 91-96, 1999.
- <sup>37</sup> S. Aronoff, *Science*, **150**, 72-73, 1965.
- <sup>38</sup> M. Vignoni, *et.al*, *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 800-810, 2010.
- <sup>39</sup> H. Rokos, *et.al*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 805-811, 2002.

<sup>40</sup> G. Suárez, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol.*, **132**, 53-57, 2000.



# CAPÍTULO 4

## PROPIEDADES FOTOSENSIBILIZADORAS DE LAS PTERINAS

A finales de los años noventa se demostró que las pterinas son capaces de fotoinducir modificaciones químicas en el ácido desoxirribonucleico (ADN).<sup>1</sup> Posteriormente, se evaluó la capacidad fotosensibilizadora de las pterinas sobre células y otras biomoléculas y se dilucidaron los mecanismos de reacción involucrados. En este apartado se hará un breve resumen de los resultados más relevantes desarrollados hasta el momento, utilizando Ptr como fotosensibilizador.

### **4.1. Efectos fotodinámicos sobre células eucariotas**

Bajo irradiación UV-A se observó el efecto fotodinámico de Ptr y Lum sobre una línea cancerígena de células eucariotas (células HeLa) a pH fisiológico.<sup>2,3</sup> Ambos fotosensibilizadores interaccionan con las células penetrando y localizándose dentro de los dominios, o bien, asociándose a las membranas de las mismas. En condiciones de oscuridad, ninguno de los sensibilizadores resultó tóxico para las células. Bajo irradiación UV-A, las células incubadas con Ptr o Lum perdieron la integridad de su estructura. Este evento se relacionó con una falla mitocondrial y con la alteración de las membranas celulares.

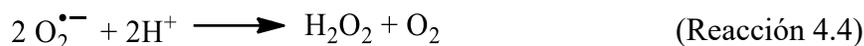
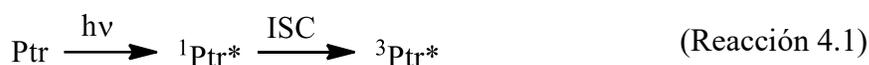
### **4.2. Fotosensibilización del ADN y sus componentes**

#### *4.2.1. Fotosensibilización de nucleótidos púricos*

El antecedente más antiguo reportado en literatura sobre la fotosensibilización de monómeros de ADN por Ptr es del año 1981.<sup>4</sup> En este estudio se cuantificó el porcentaje de degradación de las bases púricas (adenina (dAMP), guanina (dGMP), xantina e hipoxantina) irradiadas en presencia de Ptr, xantopterina o isoxantopterina. Los autores concluyeron que los sustratos que sufren una mayor degradación son guanina y xantina, y por otra parte, que Ptr tiene un efecto fotosensibilizador superior que las pterinas con sustituyentes hidroxilos (xantopterina e

isoxantopterina). Postularon que las pterinas pueden actuar tanto mediante una transferencia electrónica (Tipo I) como de energía (Tipo II).

El mecanismo general para la fotodegradación de nucleótidos comienza con la generación del estado excitado triplete ( $^3\text{Ptr}^*$ ) (Reacción 4.1). A continuación, tiene lugar la transferencia electrónica desde la base al  $^3\text{Ptr}^*$ , generando los correspondientes pares de radicales (Reacción 4.2). El  $\text{Ptr}^{\bullet-}$  reacciona con el  $\text{O}_2$  disuelto generando  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Reacción 4.3), que a su vez puede dismutar para generar  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Reacción 4.4). El radical catión reacciona con  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , dando lugar a los diferentes productos oxigenados (Reacción 4.5). En el proceso sólo hay consumo de nucleótido.



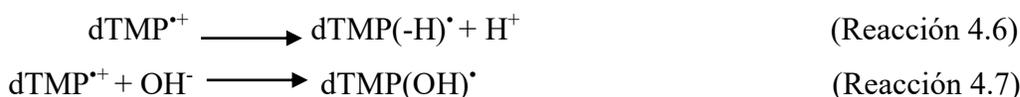
Estudios más recientes acerca del daño fotosensibilizado de los nucleótidos dGMP y dAMP inducida por Ptr en solución acuosa revelaron que Ptr induce modificaciones químicas a dAMP en medio ácido (pH= 5,5) a través de un mecanismo Tipo I, pero en medio alcalino (pH= 10,5) no tiene lugar la reacción.<sup>5,6</sup> El  $\text{O}_2$  es indispensable para que se produzca la fotooxidación y el  $^1\text{O}_2$  no participa a pesar de ser generado por el fotosensibilizador. En el proceso se genera  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reacción se acelera en presencia de superóxido dismutasa (SOD), enzima que cataliza la descomposición de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Como producto de oxidación se identificó a la 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (8-oxodAMP), observada previamente en reacciones fotoinducidas por otros sensibilizadores que actúan a través de mecanismos Tipo I.<sup>7</sup> Además se encontró otro producto que no había sido reportado en publicaciones anteriores, en el que la base se enlaza al grupo fosfato formando un ciclo.

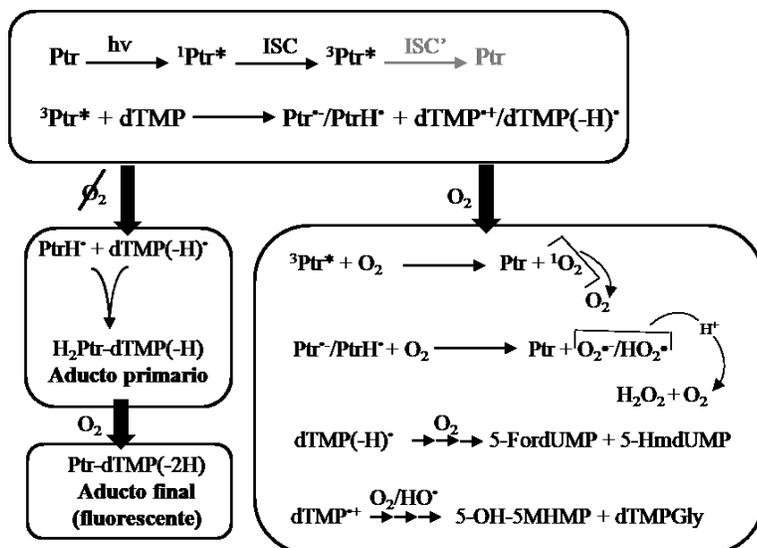
Por otra parte, Ptr fotosensibiliza a dGMP tanto en medio ácido como en medio alcalino. Los productos identificados en este caso son los derivados de los desoxirribonucleósidos 5'-monofosfato de imidazolona (dIzMP), dihidroguanidinohidantoína (dDGhMP), guanidinohidantoína (dGhMP), oxazolona (dZMP) y espiroiminodihidantoína (dSpMP). También se encontró un producto denominado P680 (por su peso molecular), que está formado por una molécula de dGMP y otra de dDGhMP, unidas a través de las bases en una reacción donde se pierde una molécula de H<sub>2</sub>O.<sup>8</sup> En este sistema hay una competencia entre los mecanismos Tipo I y Tipo II, y dependiendo del pH del medio se favorece una vía u otra.

#### 4.2.2. Fotosensibilización de nucleótidos pirimidínicos

Estudios recientes revelaron que Ptr es capaz de fotodegradar al nucleótido dTMP, bajo irradiación UV en solución acuosa a través de un mecanismo Tipo I.<sup>9</sup> Este resultado es sorprendente debido a que timina (dTMP) es la base del ADN con mayor potencial de oxidación, y por lo tanto, la menos oxidable. El mecanismo de fotodegradación depende de la presencia de O<sub>2</sub> disuelto en el medio (Esquema 4.1).

El radical catión de dTMP presenta dos reacciones competitivas, que son la desprotonación (Reacción 4.6) y la hidratación (Reacción 4.7). La unión de un átomo de oxígeno al grupo metileno del radical dTMP(-H)<sup>•</sup> da lugar a 5-formil-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (5-FordUMP) y 5-hidroximetil-2'-uridina 5'-monofosfato (5-HmdUMP). En cambio, en el radical dTMP(OH)<sup>•</sup>, el oxígeno se une a la posición 5 y genera 1-(2-desoxi-beta-D-eritro-pentofuranosil-5-fosfato)-5-hidroxi-5-metilhidantoína (5-HO-5MHMP) y timina glicol 5'-monofosfato (dTMPGly).





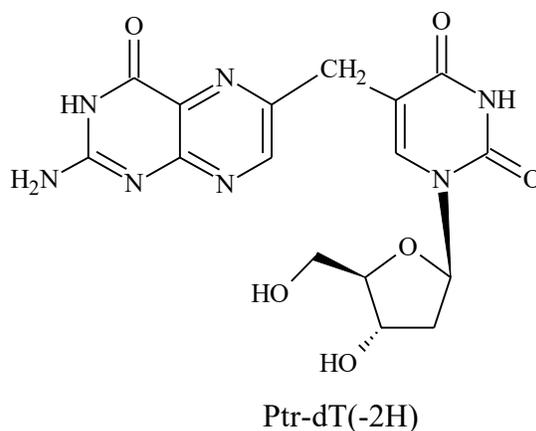
Esquema 4.1. Principales vías de la fotodegradación de dTMP inducida por Ptr.<sup>9</sup>

Por otra parte, cuando la reacción ocurre en ausencia de O<sub>2</sub>, el comportamiento es completamente diferente y no se había observado con otros sensibilizadores. Sorprendentemente, no sólo hay consumo de sustrato, sino que la concentración de fotosensibilizador también disminuye con el tiempo de irradiación, y el consumo de los reactivos se da en una relación 1:1. Estudios de espectrometría de masas revelaron que se forma un aducto entre el nucleótido y Ptr, con un peso molecular que coincide con la suma de las masas de Ptr y dTMP, menos dos átomos de hidrógeno que se pierden en la formación del enlace covalente. Este producto, Ptr-dTMP(-2H), es interesante debido a que presenta propiedades espectroscópicas similares a las de Ptr. Su formación se puede explicar con el acoplamiento de los radicales PtrH<sup>\*</sup> y dTMP(-H)<sup>\*</sup> (Esquema 4.1). Esta fue la primera vez que se encontraron aductos de Ptr con nucleótidos, en los cuales se une covalentemente el fotosensibilizador.

Con el fin de evaluar si el fosfato del nucleótido dTMP juega un papel importante en la reacción de generación de aductos fluorescentes entre Ptr y los nucleótidos pirimidínicos, se realizaron estudios en condiciones anaeróbicas, pero utilizando como sustrato el nucleósido timidina (dT).<sup>10</sup> Se observó una disminución tanto en la concentración de sustrato como en la de fotosensibilizador, con una relación estequiométrica de 1:1. En las corridas cromatográficas de las muestras de dT irradiadas en presencia de Ptr, se observaron picos cromatográficos nuevos con espectros de absorción similares al de Ptr, que emitían en las mismas condiciones que el

fotosensibilizador. Se realizaron mediadas de espectrometría de masas que revelaron la formación de, al menos, dos aductos Ptr-dT(-2H). Por lo tanto, para profundizar con el análisis, se llevó a cabo el aislamiento del aducto Ptr-dT(-2H) mayoritario y se llevó a cabo su caracterización fotofísica. Las propiedades fotofísicas del sensibilizador se mantienen prácticamente invariables en el aducto. En el Esquema 4.2 se puede observar la estructura molecular propuesta para el aducto y en la Tabla 4.1, se resumen los resultados obtenidos. Se confirmó que el fosfato no participa en el proceso fotoquímico de la formación del aducto.

Este producto tiene lugar tras la recombinación de  $\text{Ptr}^{\bullet-}$  y  $\text{dT}(-\text{H})^{\bullet}$  (Reacción 4.8). Esta reacción compite con la transferencia electrónica entre los radicales  $\text{dT}(-\text{H})^{\bullet}$  y  $\text{Ptr}^{\bullet-}$  (*back electron transfer*), regenerando los compuestos en su estado fundamental (Reacción 4.9). La formación del aducto no tiene lugar en presencia de  $\text{O}_2$  debido a que el  $\text{Ptr}^{\bullet-}$  reacciona con el  $\text{O}_2$  del medio para regenerar el fotosensibilizador y producir  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .



**Esquema 4.2.** Estructura molecular propuesta para el aducto Ptr-dT(-2H).<sup>10</sup>

	<b>Ptr</b>	<b>Ptr-dT(-2H)</b>	<b>Ptr-dT<sub>5</sub></b>	<b>Ptr-ADN</b>
<b>Absorción (<math>\lambda_{\max}</math>, nm)</b>	340 ± 1	340 ± 1	333 ± 1	~350 ± 1
<b>Emisión (<math>\lambda_{\max}</math>, nm)</b>	440 ± 1	437 ± 1	436 ± 1	442 ± 1
$\Phi_F$	0,32 ± 0,01	0,29 ± 0,02	--	--
$\tau_F$ (ns)	7,6 ± 0,4	7,2 ± 0,1	6,4 ± 0,4	8,3 ± 0,4
			2,2 ± 0,4	1,7 ± 0,4
$\Phi_{\Delta}$	0,18 ± 0,02	0,07 ± 0,01	--	--

**Tabla 4.1.** Propiedades fotofísicas de Ptr y el aducto Ptr-dT(-2H).<sup>10</sup>

#### 4.2.3. Fotosensibilización de ADN plasmídico

Se han realizado estudios de fotosensibilización del plásmido pUC18 utilizando Ptr como sensibilizador.<sup>11</sup> Este plásmido es una molécula de ADN circular de doble hebra y bajo peso molecular. Los autores demostraron que cuando la mezcla se expone a radiación UV-A (350 nm) las hebras del ADN sufren cortes al azar. Como consecuencia, el topoisómero superenrollado se transforma en el topoisómero relajado. La acumulación de estos cortes termina ocasionando un corte en la doble hebra, convirtiendo el plásmido circular en una molécula lineal. Los autores encontraron que la reacción ocurre tanto en presencia como en ausencia de O<sub>2</sub>, pero no hallaron diferencias en la cantidad de plásmido relajado. Por lo tanto, descartan la participación de EROs en el mecanismo de reacción.

#### 4.2.4. Fotosensibilización de ADN eucariota

Cuando se expone ADN eucariota de doble hebra a radiación de 365 nm en presencia de Ptr se generan lesiones en secuencias específicas.<sup>12,13</sup> En estos estudios observaron que las oxidaciones y rupturas tenían lugar en secuencias con varias dGMP consecutivas, debido a que el apilamiento de dos bases de dGMP en un fragmento de ADN de doble cadena produce una disminución en el potencial de ionización. La detección de radicales por EPR y experimentos realizados en D<sub>2</sub>O, permitió postular que el daño fotoinducido al ADN consiste en una oxidación fotosensibilizada Tipo I. Como producto de reacción se detectó 8-oxodG.

En estudios recientes, se estudió si Ptr era capaz de generar fotodaño en timina, cuando se encuentra formando los polímeros de ADN.<sup>14</sup> Para ello, se realizaron distintos ensayos utilizando

oligonucleótidos de cinco dTMP (dT<sub>5</sub>) como modelo y ADN eucariota (*Calf thymus*). Al exponer una solución que contiene la mono hebra dT<sub>5</sub> y Ptr en ausencia de O<sub>2</sub> a radiación UV-A, se genera un aducto covalente entre Ptr y una de las bases de dTMP. También se observa un producto consistente con la unión de dos Ptr al oligonucleótido. En presencia de O<sub>2</sub>, no se observó la unión de Ptr a la cadena. Al realizar los estudios con el ADN doble hebra, se observó que los procesos químicos fotoinducidos por Ptr depende fuertemente de la presencia de O<sub>2</sub>. En soluciones equilibradas en aire, ocurre la ruptura de la cadena, mientras que en ausencia de O<sub>2</sub>, ocurre la formación del aducto. Se compararon las propiedades espectroscópicas de los aductos generados con las del fotosensibilizador libre, las cuales se resumen en la Tabla 4.1.

### 4.3. Fotosensibilización de proteínas y sus componentes

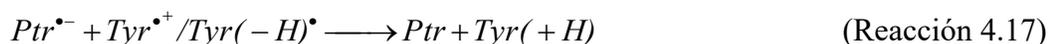
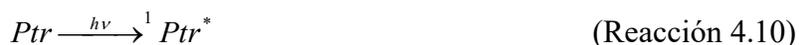
En los últimos años, se ha demostrado que Ptr es capaz de generar daño fotosensibilizado a aminoácidos libres cuando se exponen a radiación UV-A, concretamente se evaluaron las modificaciones sufridas por Trp,<sup>15</sup> Tyr,<sup>16</sup> Met e His.<sup>17</sup> En presencia de O<sub>2</sub>, el principal mecanismo propuesto para los distintos aminoácidos es la transferencia electrónica desde el sustrato hacia el estado excitado del fotosensibilizador, es decir, un mecanismo Tipo I.

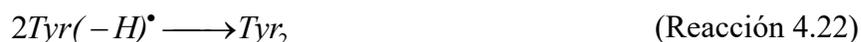
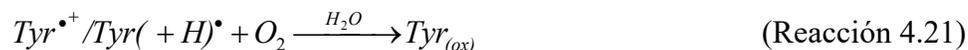
La oxidación de His es dependiente del pH: en medio ácido (pH= 5,5) predomina un mecanismo de transferencia de electrones, mientras que en medio alcalino (pH=10,5), ambos mecanismos (Tipo I y II) compiten en la degradación de la His. En estas condiciones se identificó la formación de endoperóxidos inestables, que llevan a la generación de un biciclo intramolecular y la formación de productos diméricos oxidados.

Para el caso de Trp, la excitación de Ptr lleva al consumo del aminoácido y a la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que el fotosensibilizador no se consume. Si bien Ptr es un fotosensibilizador de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ( $\Phi_{\Delta}$ = 0,18, pH= 5,5), la fotodegradación de Trp se inhibe en soluciones saturadas en O<sub>2</sub>, lo que indica que los procesos mediados por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (mecanismo Tipo II), no son relevantes en la oxidación de Trp. A su vez, se demostró la formación del radical de Trp con estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR)<sup>15</sup> y fotólisis de destello láser (LFP).<sup>18</sup> Por lo tanto, se postuló que el mecanismo principal es la transferencia de un electrón desde el Trp al <sup>3</sup>Ptr\*, generándose así el correspondiente par radical ( $Ptr^{\bullet-}$  y  $Trp^{\bullet+} / Trp(-H)$ ). El análisis de fotoproductos confirmó la presencia de un producto con peso molecular similar al 5-hidroxitriptófano (5-HTP), el cual ha sido identificado en la piel de pacientes que sufren

vitíligo.<sup>19</sup> También se encontraron productos con pesos moleculares similares a N-formilquinurenina (NFK).<sup>15</sup>

En el caso de Tyr, los resultados obtenidos indicaron que la oxidación fotosensibilizada de Tyr por Ptr en solución acuosa bajo irradiación UV-A, lleva a la oxidación del aminoácido, mientras que la concentración del fotosensibilizador se mantiene constante.<sup>16</sup> Durante este proceso, el oxígeno disuelto se consume y hay generación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado, Tyr no se consume en ausencia de O<sub>2</sub>. El análisis del mecanismo indica que la reacción por la cual Ptr fotosensibiliza la oxidación de Tyr, no involucra al <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, pero sí, un mecanismo iniciado por una transferencia de electrones. En este mecanismo la excitación de Ptr es seguida por la transferencia de un electrón desde el aminoácido al <sup>3</sup>Ptr\*, llevando a la formación del radical anión de Ptr (*Ptr*<sup>•-</sup>) y el radical catión de la Tyr (*Tyr*<sup>•+</sup>). En el siguiente paso de reacción, la transferencia de electrones de *Ptr*<sup>•-</sup> al O<sub>2</sub> regenera a Ptr y forma el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el cual puede dismutarse con su respectivo ácido conjugado (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o reaccionar con *Tyr*<sup>•+</sup> para regenerar a Tyr. El análisis de los fotoproductos confirmó la generación de diferentes compuestos de oxidación (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (DOPA) y L-Dopacroma), y sugiere la formación de dímeros de Tyr (Tyr<sub>2</sub>). El mecanismo propuesto se resume a continuación:





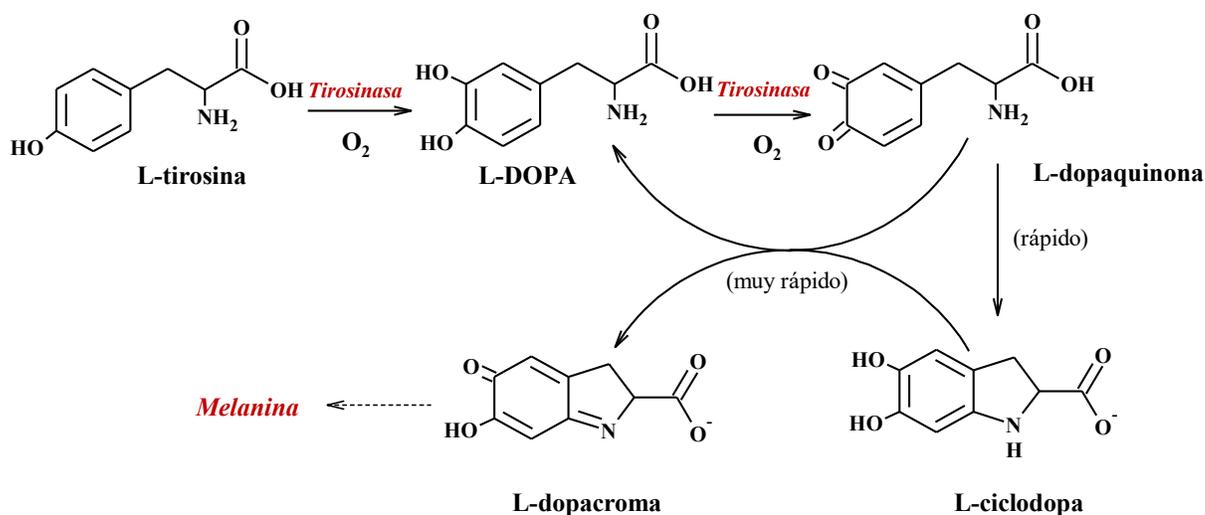
El daño fotoinducido a aminoácidos también puede ocurrir en entornos peptídicos. Se evaluó el daño fotosensibilizado por Ptr utilizando como sustrato la hormona estimulante de melanocitos ( $\alpha$ -MSH), la cual es un péptido de trece aminoácidos que estimula la producción y liberación de melanina por los melanocitos en piel y pelo.<sup>20</sup> Se demostró que los procesos fotosensibilizados llevan a la oxidación del péptido y a la degradación de al menos los residuos Trp y Tyr. El fotosensibilizador no se consume en el proceso y se genera  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Además, se observó la dimerización del péptido, la cual se adjudica a la formación de  $\text{Tyr}_2$ . El mecanismo de reacción propuesto se basa en la transferencia de electrones desde la  $\alpha$ -MSH al  $^3\text{Ptr}^*$ , para formar el radical catión ( $\alpha\text{-MSH}^{\bullet+}$ ) y el  $\text{Ptr}^{\bullet-}$ . Luego, ocurren una serie de reacciones que llevan al consumo del péptido y a la formación de diferentes productos de reacción. Debido a que tanto Tyr como Trp se oxidan en el proceso fotosensibilizado y generan fotoproductos que presentan propiedades espectroscópicas similares, el estudio se dificulta. Por lo tanto, se reemplazó el residuo Tyr de la posición 2 en la secuencia de  $\alpha$ -MSH (Tabla 4.2) por una glicina (Gly) y se realizó el estudio de la fotosensibilización por Ptr del péptido mutado ( $\alpha\text{-MSH}_{\text{Y2G}}$ ).<sup>21</sup> La identificación de fotoproductos demostró que debido a la reacción fotosensibilizada se generaron N-formilquinurenina (NFK) y 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Se repitió el procedimiento pero mutando a  $\alpha$ -MSH en el residuo Trp de la posición 9 por una Gly ( $\alpha\text{-MSH}_{\text{W9G}}$ ).<sup>21</sup> En este caso, se lograron identificar productos con incorporación de hasta 3 átomos de oxígeno a  $\text{MSH}_{\text{W9G}}$  y además, se evidenció la formación de productos con pesos moleculares mayores al del péptido, correspondientes un producto dimérico mediado por  $\text{Tyr}_2$ .

Péptido	Secuencia
$\alpha$ -MSH	Ac-Ser <sup>1</sup> -Tyr <sup>2</sup> -Ser <sup>3</sup> -Met <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -His <sup>6</sup> -Phe <sup>7</sup> -Arg <sup>8</sup> -Trp <sup>9</sup> -Gly <sup>10</sup> -Lys <sup>11</sup> -Pro <sup>12</sup> -Val <sup>13</sup> -NH <sub>2</sub>
$\alpha$ -MSH <sub>Y2G</sub>	Ac-Ser <sup>1</sup> -Gly <sup>2</sup> -Ser <sup>3</sup> -Met <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -His <sup>6</sup> -Phe <sup>7</sup> -Arg <sup>8</sup> -Trp <sup>9</sup> -Gly <sup>10</sup> -Lys <sup>11</sup> -Pro <sup>12</sup> -Val <sup>13</sup> -NH <sub>2</sub>
$\alpha$ -MSH <sub>W9G</sub>	Ac-Ser <sup>1</sup> -Tyr <sup>2</sup> -Ser <sup>3</sup> -Met <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -His <sup>6</sup> -Phe <sup>7</sup> -Arg <sup>8</sup> -Gly <sup>9</sup> -Gly <sup>10</sup> -Lys <sup>11</sup> -Pro <sup>12</sup> -Val <sup>13</sup> -NH <sub>2</sub>

**Tabla 4.2.** Secuencia de  $\alpha$ -MSH y de los péptidos mutados.

La fotodegradación de proteínas inducida por Ptr se estudió con la albúmina sérica bovina (BSA).<sup>22,23</sup> Como consecuencia del proceso fotosensibilizado, BSA sufre modificaciones químicas y conformacionales. Este proceso lleva a la oxidación de la proteína en al menos dos aminoácidos, Trp y Tyr. A su vez, se demostró que BSA sufre dimerización, por un mecanismo iniciado por la formación de radicales Tyr. Se encontró que la degradación del residuo Trp ocurre más rápido que el entrecruzamiento de la proteína y que el proceso es iniciado por una transferencia de electrones desde el estado fundamental de BSA al estado excitado triplete del fotosensibilizador.

Con el fin de evaluar si las modificaciones químicas fotoinducidas en BSA, utilizada como proteína modelo, podían afectar la actividad de enzimas, se realizaron experimentos utilizando Tirosinasa (TYR) como sustrato.<sup>24</sup> TYR es una cuproglicoproteína de cadena simple que cataliza la ortohidroxilación de monofenoles (actividad monofenolasa) y la subsecuente oxidación del producto difenólico a la quinona resultante (actividad difenolasa).<sup>25</sup> Cataliza las dos primeras etapas de la melanogénesis dentro de los melanocitos: la hidroxilación de L-tirosina a L-DOPA y la oxidación de ésta a dopaquinona (Esquema 4.3),<sup>26</sup> utilizando como agente oxidante el oxígeno molecular, siendo la primera etapa el paso limitante de la melanogénesis. En un principio se creía la existencia de dos sitios activos aunque, actualmente, se acepta que existe un único centro activo responsable de las dos actividades de la enzima.<sup>27</sup> Esta teoría se basa en el establecimiento de la naturaleza cuproproteica de la enzima y de los estados de oxidación posibles para el cobre en el centro activo. Se demostró por primera vez que TYR, al ser expuesta a radiación UV-A en presencia de Ptr, sufre inactivación como consecuencia de un proceso fotosensibilizado. El proceso fotoquímico afecta tanto a la actividad monofenolasa como la difenolasa de la enzima y el mecanismo del proceso fotosensibilizado involucra la transferencia de un electrón desde la enzima al  $^3\text{Ptr}^*$  (mecanismo Tipo I).<sup>24</sup>



Esquema 4.3. Primeras etapas de la melanogénesis y estructura de los principales intermediarios.

### **Bibliografía**

- <sup>1</sup> K. Ito, S. Kawanishi, *Biochemistry*, **36**, 1774-1781, 1997.
- <sup>2</sup> M.P. Denofrio, S. Hatz, *Photochem. Photobiol. Sci*, **8**, 1539-1549, 2009.
- <sup>3</sup> M.P. Denofrio, *et.al*, *P. R. Photochem. Photobiol.*, **84**, 862-866, 2011.
- <sup>4</sup> A. Momzikoff, R. Santus, *C. R. Acad. Sci.*, **293**, 15-18, 1981.
- <sup>5</sup> G. Petroselli, *et.al*, *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 2792-2799, 2007.
- <sup>6</sup> G. Petroselli, *et.al*, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3001-3011, 2008.
- <sup>7</sup> T. Douki, J. Cadet, *Int. J. Radiat. Biol.*, **75**, 571-581, 1999.
- <sup>8</sup> M.P. Serrano, *et.al*, *New J. Chem.*, **41**, 7273-7282, 2017.
- <sup>9</sup> M.P. Serrano, *et.al*, *Free Radic. Biol. Med.*, **96**, 418-431, 2016.
- <sup>10</sup> S. Estébanez, *et.al*, *Chem.Phys.Chem.*, **19**,300-306, 2018.
- <sup>11</sup> C. Lorente, *et.al*, *Pteridines*, **11**, 100-105, 2000.
- <sup>12</sup> K. Ito, S. Kawanishi, *Biochemistry*, **36**, 1774-1781, 1997.
- <sup>13</sup> K. Hirakawa, *et.al*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **410**, 261-268, 2003.
- <sup>14</sup> S. Estébanez, *et.al*, *Dyes.Pigments*, **160**. 624-632, 2019.
- <sup>15</sup> A.H. Thomas, *et.al*, *Free Radic. Biol. Med.*, **63**, 467-475, 2013.
- <sup>16</sup> C. Castaño, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **89**, 1448-1455, 2013.
- <sup>17</sup> C. Castaño, *et al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **153**, 483-489, 2015.
- <sup>18</sup> C. Castaño, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **95**, 220-226, 2019.

- <sup>19</sup> K.U. Schallreuter, *et.al*, *Faseb J.*, **26**, 2457-2470, 2012.
- <sup>20</sup> C. Castaño, *et.al*, *Org. Biomol. Chem.*, **12**, 3877-86, 2014.
- <sup>21</sup> C. Castaño, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **164**, 226-235, 2016.
- <sup>22</sup> A.H. Thomas, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **120**, 52-58. 2013.
- <sup>23</sup> A.H. Thomas, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **141**, 262-268, 2014.
- <sup>24</sup> M.L. Dántola, *et.al*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **424**, 568-72, 2012.
- <sup>25</sup> E. I. Solomon, *et.al*, *Chem. Rev.*, **96**, 2563-2606, 1996.
- <sup>26</sup> V. J. Hearing, K. Tsukamoto, *Faseb J.*, **5**, 2902-2909, 1991.
- <sup>27</sup> K. Lerch, *Mol Cell Biochem.*, **52**, 125-138, 1983.

# **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**



# CAPÍTULO 5

## PREPARACIÓN E IRRADIACIÓN DE SOLUCIONES

En este capítulo, se explicarán los procedimientos y las técnicas empleadas en la preparación de las soluciones acuosas y en la irradiación continua con radiación UV-A y UV-B de las mismas. Además, se describirá la técnica empleada para medir la cantidad de radiación que alcanza la celda en un período de tiempo (con un volumen de solución determinado).

### 5.1. Reactivos

El derivado pterínico oxidado utilizado como fotosensibilizador en este trabajo de tesis fue pterina (Ptr), el cual es sintetizado por el Laboratorio Schircks (Suiza). El sólido fue usado sin purificación previa debido a que presenta una pureza mayor al 99%.

Los sustratos utilizados en las reacciones fotoquímicas se listan a continuación:

- *Dímeros de tirosina (Tyr<sub>2</sub>)*: generados fotoquímicamente a partir de la irradiación de Tyr (Sigma-Aldrich con pureza de 99,0%) en presencia de Ptr, purificados por HPLC.
- *Ubiquitina de eritrocitos bovinos (Ub)*: polvo liofilizado, esencialmente sin sales y pureza  $\geq 98\%$ , provista por Sigma-Aldrich.
- *Albumina de Suero Humano (HSA)*: polvo liofilizado, libre de ácidos grasos y globulina, (pureza  $\geq 99\%$ ) fue provista por Sigma-Aldrich.
- *$\alpha$ -Hemolisina de Escherichia Coli ( $\alpha$ -HlyA)*: extraída de la cepa *E. Coli* recombinante WAM 1824, sobreproductora de  $\alpha$ -HlyA. Las vesículas de membrana externa liberadas por la bacteria, se aislaron del cultivo bacteriano y luego, la  $\alpha$ -HlyA libre se purificó del sobrenadante resultante. Se concentró y purificó parcialmente mediante la precipitación con etanol frío al 20% y luego de una centrifugación durante 1 hora a 10000 rpm, se resuspendió el precipitado en 20 mM Tris, 150 mM NaCl a pH 7,0. En corridas electroforéticas (SDS-PAGE), la solución resultante presenta una banda principal de 110 kDa, que se asigna a  $\alpha$ -HlyA.<sup>1</sup> Provista por la Dra. Vanesa Herlax.

Los reactivos utilizados provistos por Sigma-Aldrich fueron: acetato de amonio (AcNH<sub>4</sub>, 98%), ácido fórmico (HCOOH), yoduro de potasio (KI), superóxido dismutasa de eritrocito

bovino (SOD), cloruro de guanidinio (ClG), citocromo C de corazón de caballo (Cyt c), agua deuterada ( $D_2O > 99,9\%$ ), hidróxido de sodio deuterado (NaOD, 99,5%), ácido clorhídrico deuterado (DCl, 99%).

Otros reactivos utilizados fueron: NaOH, HCl y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Merck), fosfato diácido de potasio ( $KH_2PO_4$ , Anedra), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS, Genbiotech), NaCl (J. T. Baker), quinina bisulfato (QBS, Fluka), acetonitrilo y metanol calidad HPLC (J. T. Baker), *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG, *Life technologies*).

Se utilizaron columnas de Sephadex G-25 (GE *Healthcare*), para la separación de Ub, HSA y  $\alpha$ -HlyA de Ptr libre.

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, *Sección 8.1*) se utilizaron los siguientes reactivos: dodecilsulfato de sodio (SDS,  $\sim 99\%$ ), glicerol, 2- $\beta$ -mercaptoetanol, bromofenol blue, Glicina (Gly,  $> 99\%$  titration), persulfato de amonio ( $> 98\%$ ) and N, N, N', N'-tetrametiletileno-diamina (TEMED,  $\sim 9\%$ ) provistos por Sigma. Acrilamida y Tris provistos por Genbiotech. El metanol y el ácido acético fue provisto por Laboratorios Cicarelli, el *coomassie brilliant blue G* por Fluka.

Se utilizó agua como solvente para todas las soluciones empleadas en este trabajo. Dicha agua fue de calidad miliQ (agua destilada purificada en un equipo *Mili Q Reagent Water System* (resistividad  $\sim 10\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$ )).

## 5.2. Preparación de soluciones

### 5.2.1. Soluciones stock

La preparación y manipulación de las soluciones de Ptr se llevó a cabo en un cuarto oscuro iluminado con luz roja para evitar la fotodegradación de los reactivos. Las soluciones se prepararon disolviendo el sólido en agua libre de iones metálicos, agitando durante aproximadamente una hora. Debido a que, como se mencionó en el Capítulo 3, las pterinas presentan grupos ionizados en medio alcalino, se agregaron volúmenes pequeños (10 – 100  $\mu\text{L}$ ) de una solución de NaOH 0.5 – 2 M para facilitar la disolución del compuesto.

Para determinar la concentración exacta de las soluciones empleadas en los distintos experimentos se utilizaron distintos métodos:

- i) A partir de la cantidad de sólido pesado, el volumen de solución y su peso molecular.

- ii) A partir del factor de dilución y la concentración (calculada según i)) de una solución más concentrada.
- iii) A partir de medidas de absorbancia y con los correspondientes valores de los coeficientes de absorción molar a una determinada longitud de onda aplicando la ley de Lambert-Beer (Ecuación 5.1), que establece que la absorbancia de un determinado compuesto es directamente proporcional a su concentración.

$$[C] = \frac{A^\lambda}{\varepsilon_\lambda \cdot l} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

Donde [C] es la concentración del compuesto calculado,  $A^\lambda$  es el valor de absorbancia a la longitud de onda determinada ( $\lambda$ ),  $\varepsilon_\lambda$  es el coeficiente de extinción molar a una determinada longitud de onda y  $l$  es el camino óptico en centímetros (cm).

Las soluciones de Ptr son estables durante al menos dos semanas si se almacenan en frascos de color caramelo, ya que se evita la degradación por la exposición a la luz. Las concentraciones de las soluciones fueron calculadas mediante el método iii) y variaron entre 45 y 200  $\mu\text{M}$ , según las condiciones experimentales.

Por otra parte, tanto Tyr como las proteínas utilizadas son solubles en agua en las concentraciones utilizadas en este trabajo de tesis, por lo que se prepararon disolviendo el sólido correspondiente en agua a pH neutro. Para el cálculo de la concentración de las soluciones se utilizaron tanto el método i) como el iii). En el caso de  $\alpha\text{-HlyA}$ , su concentración fue determinada mediante el método colorimétrico de Bradford. En la Tabla 5.1 se presentan los valores de los coeficientes de extinción molar utilizados para el cálculo de las concentraciones de los distintos compuestos.

Compuesto	$\lambda$ (nm)	$\varepsilon$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
Ptr	360 (pH 10,5)	6723 <sup>2</sup>
	340 (pH 5,5)	5300 <sup>2</sup>
Tyr	274	1400 <sup>3</sup>
Tyr <sub>2</sub>	315 (pH 9,5)	8380 <sup>4</sup>
	283 (pH 5,5)	5680 <sup>4</sup>
Ub	280	1254 <sup>5</sup>
HSA	280	36520 <sup>6</sup>

**Tabla 5.1.** Coeficientes de extinción molar del fotosensibilizador y los sustratos utilizados a sus respectivas longitudes de onda.

Las soluciones de Tyr<sub>2</sub> aisladas se concentraron mediante la técnica de liofilización, utilizando el equipo Rificor L-A-B3. El equipo utilizado cuenta con una cámara de secado, un condensador, un sistema de vacío y un panel de comando e instrumentación. El proceso consiste en congelar el producto a procesar por debajo de su temperatura eutéctica (temperatura más baja a la cual es posible encontrar una fase líquida). Para ello, se coloca el producto en un contenedor o cámara hermética y se procede a realizar vacío. Luego, se comienza a suministrar el calor necesario para la sublimación del hielo. Los vapores producidos en la sublimación son retenidos en un condensador que se encuentra a una temperatura inferior a la del producto congelado. Cuando todo el hielo ha sido eliminado se dice que el secado primario ha terminado. El secado secundario se realiza para eliminar las últimas trazas de agua ligada al producto. Esta etapa requiere de un alto vacío y de calefacción a la temperatura máxima que admite el producto sin desnaturalizarse.

#### 5.2.2. Soluciones para irradiar

Las mezclas de reacción se prepararon de diferentes formas en función del tipo de experimento. Una de ellas consistió en preparar la mezcla de sustrato y fotosensibilizador, y a continuación, llevarla a pH. La otra opción fue realizar la mezcla de ambas soluciones previamente llevadas a pH. En todos los casos, antes de comenzar las medidas se controlaron los espectros de absorbancia y el pH. Para el caso de las soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> (entre 10 y 15  $\mu\text{M}$ ), se utilizaron directamente luego de su aislamiento por HPLC y de controlar el pH. A su vez, las soluciones concentradas de Tyr<sub>2</sub> (entre 40-180  $\mu\text{M}$ ), se obtuvieron luego de liofilizar las soluciones acuosas aisladas y de resuspender el sólido obtenido en un volumen de agua menor. A continuación, las soluciones concentradas se llevaron a pH y se midieron los espectros de absorbancia para determinar la concentración de la solución y corroborar la forma ácido-base al pH de trabajo.

El pH de trabajo cambió en función del compuesto utilizado y de cada experimento. En los experimentos realizados con HSA y Ub se trabajó a pH 6,0, con el fin de tener una única especie ácido-base de Ptr. Así, en el medio sólo se encuentra presente la especie protonada, ya que el  $pK_a$  es cercano a 8, como se vio en el *Sección 3.1*. Para minimizar cambios de pH durante

la etapa de irradiación, se agregó a las soluciones mencionadas anteriormente una solución buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , donde la concentración final de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  fue 1 mM, teniendo en cuenta la concentración máxima de fosfato que no es capaz de producir la desactivación de los estados excitados de Ptr.<sup>7</sup> Los experimentos de fotoinactivación de  $\alpha\text{-HlyA}$ , se realizaron en soluciones buffer de TRIS 20 mM y NaCl 150 mM a pH 7,3 en presencia y ausencia de 0,2 M de ClG. En este caso, hay una mezcla de las formas ácida y básica de Ptr. Para el estudio de las soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> en ausencia de Ptr, se trabajó a modo comparativo a pH 5,5 y 9,5, teniendo en cuenta que posee un  $\text{pK}_a$  de 7,3.<sup>8</sup>

El ajuste del pH se llevó a cabo con el agregado de pequeños volúmenes de soluciones de HCl y NaOH (0,1 – 2 M) con una micropipeta. El HCl se preparó a partir de una dilución de la solución comercial concentrada, mientras que el NaOH se preparó por pesada de dicho reactivo y su posterior disolución en agua. Las medidas de pH se realizaron con un pH-metro sensION+pH31 GLP combinado con un electrodo de pH 5010T (*Hach*), con un microelectrodo combinado con un electrodo de pH modelo pHC3359-8 (*Radiometer Analytical*) o con un pH-metro *Mettler Toledo Seven Easy*. Para la calibración de los mismos se utilizaron soluciones amortiguadoras comerciales con valores de pH de 4,00, 7,00 y 10,00.

### 5.3. Experimentos en condiciones especiales

#### 5.3.1. Condiciones anaeróbicas y de saturación de $\text{O}_2$

En ciertas ocasiones, se buscó evaluar el efecto del oxígeno ( $\text{O}_2$ ) disuelto en la solución, por lo que se llevaron a cabo algunos experimentos con distintas concentraciones de  $\text{O}_2$ . Las soluciones equilibradas con aire presentan una concentración de  $\text{O}_2$  de aproximadamente 1,28 mM a 25 °C, la cual se puede modificar si se hace pasar un determinado gas a través de la solución durante un período de tiempo. Para trabajar en diferentes atmósferas, las soluciones se equilibraron con  $\text{O}_2$  y con argón (Ar) o nitrógeno ( $\text{N}_2$ ). En las soluciones saturadas en  $\text{O}_2$ , la concentración de este gas es aproximadamente 5 veces superior a la de soluciones equilibradas con aire. Sin embargo, cuando se burbujea con Ar o  $\text{N}_2$ , se desplaza el  $\text{O}_2$  disuelto, consiguiendo una concentración de  $\text{O}_2$  cercana a cero.

Para esto, se colocaron las soluciones preparadas de acuerdo a lo descrito en la *Sección 5.2.2*, en celdas de cuarzo con dimensión de 1x0,4x3 cm o 1x1x3 cm, con tapa rosca y *septum* de silicona. Se insertaron dos agujas atravesando el *septum*: una de ellas se introdujo hasta el fondo

de la celda, actuando como vía de entrada del gas, mientras que la otra se dejó por encima de la superficie de la solución, como vía de salida. De esta manera, se burbujearon las soluciones con un flujo de gas continuo y constante, durante aproximadamente 20 minutos. La disposición de las agujas permitió que la presión del interior de la celda y la externa (atmosférica) fuera idéntica, evitando que se genere una condición de sobrepresión en el interior de la celda. Para retirar las agujas, en primer lugar se sacó la de salida (generando una pequeña sobrepresión) y en segundo lugar se sacó la de entrada. Para evitar el intercambio de gases se cubrió la parte superior de la celda con *parafilm*.

Es importante aclarar que durante los burbujeos también se elimina el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) presente en la solución, el cual está en equilibrio con el ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), que al ser un ácido débil, se encuentra parcialmente disociado en solución acuosa. Por lo tanto, al eliminarse el CO<sub>2</sub>, los equilibrios de las Reacciones 5.1, 5.2 y 5.3 se desplazan hacia la izquierda, disminuyendo así la concentración de protones, con la consecuente alcalinización de la solución.



Teniendo en cuenta que las propiedades espectrales de Ptr y de Tyr<sub>2</sub> varían con el pH, se utilizó esta propiedad como indicador indirecto del pH de la solución. Se tomaron los espectros de absorción, antes y después de burbujear, para controlar que no se modifique la forma ácido-base de Ptr o Tyr<sub>2</sub>.

El burbujeo de soluciones por tiempos prolongados puede provocar la pérdida de solvente por arrastre de moléculas de agua con la corriente de gas, lo que puede llevar al cambio en la concentración de la solución. Para evitar esta situación, los gases (inicialmente libres de moléculas de agua) pasaron a través de una trampa con agua para saturar el gas con dicha sustancia antes de burbujear la solución.

### 5.3.2. Experimentos en presencia de yoduro de potasio (KI)

Algunos iones inorgánicos actúan como desactivadores de estados excitados de moléculas orgánicas, fenómeno que se conoce como efecto del átomo pesado.<sup>9</sup> En el presente trabajo de

tesis doctoral, se empleó el anión yoduro ( $I^-$ ) como desactivador de los estados excitados del fotosensibilizador de estudio. A determinadas concentraciones, dicho anión es capaz de desactivar tanto los estados excitados singletes como los estados excitados tripletes de las pterinas,<sup>10</sup> siguiendo un comportamiento de Stern-Volmer (Capítulo 1, Ecuación 1.2):



$$\frac{\tau_S^0}{\tau_S} = 1 + k_q^S \tau_S^0 [I^-] \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

$$\frac{\tau_T^0}{\tau_T} = 1 + k_q^T \tau_T^0 [I^-] \quad (\text{Ecuación 5.3})$$

donde los subíndices “S” y “T” representan el estado singlete y triplete respectivamente,  $\tau^0$  y  $\tau$  son los tiempos de vida del estado excitado en ausencia y presencia de  $I^-$ ,  $[I^-]$  representa la concentración de  $I^-$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ), y  $k_q$  es, en el caso de Ptr, el valor de las constantes de desactivación para el estado singlete ( $k_q^S = (9 \pm 1) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) y triplete ( $k_q^T = (4,9 \pm 0,6) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ),<sup>10</sup> las cuales son similares, pero debido a la diferencia en los tiempos de vida de los correspondientes estados excitados, se puede desactivar selectivamente uno u otro, eligiendo la concentración adecuada de  $I^-$ . Por ejemplo, para desactivar el 90% del estado excitado  $S_1$ , es suficiente con una concentración de 100 mM, mientras que para desactivar el mismo porcentaje de  $T_1$  sólo es necesario 0,5 mM. Por lo tanto, se trabajó con concentraciones de KI comprendidas entre 0,3 y 0,5 mM para que la mayor parte de los estados excitados tripletes estuvieran desactivados, mientras que la desactivación de los estados excitados singletes fuera menor al 2 %. El procedimiento general de trabajo consistió en irradiar soluciones acuosas del sustrato y Ptr en presencia y en ausencia de KI bajo las mismas condiciones experimentales (pH, geometría de irradiación, intensidad de radiación, concentraciones de reactivos, etc.). Luego se comparan las velocidades de consumo del sustrato en ambas condiciones. Si el estado excitado triplete de Ptr está implicado en el proceso fotoquímico, se observará una disminución de la velocidad de consumo del sustrato cuando en el medio se encuentra presente KI.

### 5.3.3. Experimentos comparativos en $H_2O$ y $D_2O$

El agua deuterada ( $D_2O$ ), se corresponde con una molécula de composición química equivalente al agua ( $H_2O$ ), en la que los dos átomos del hidrógeno, son sustituidos por dos deuterios, un isótopo pesado del hidrógeno. Este solvente disminuye la velocidad de desactivación del  $^1O_2$  aproximadamente en un orden de magnitud, debido a que las frecuencias vibracionales disminuyen. Esto da como resultado que el tiempo de vida del  $^1O_2$  ( $\tau_\Delta$ ) en  $D_2O$  sea mayor que en  $H_2O$  ( $\tau_\Delta^{H_2O} \sim 3\mu s$  y  $\tau_\Delta^{D_2O} \sim 63\mu s$ ).<sup>11,12,13</sup> Esta propiedad puede ser utilizada como técnica experimental para evaluar la participación del  $^1O_2$  en los procesos fotosensibilizados. Para ello, se prepararon soluciones de las mismas concentraciones del sustrato y el fotosensibilizador en  $D_2O$  y  $H_2O$  y se irradiaron en las mismas condiciones, para luego comparar las velocidades de consumo del sustrato. Debido a la diferencia en el  $\tau_\Delta$  en ambos solventes, se espera un aumento en la velocidad de consumo de sustrato de aproximadamente un orden de magnitud en las soluciones en  $D_2O$  con respecto a las soluciones en  $H_2O$ , si el proceso se lleva a cabo exclusivamente por una reacción química entre el  $^1O_2$  y el sustrato.

La concentración se determinó mediante el espectro de absorción. El pD ( $pD = -\log [D^+]$ ) fue medido, según el sustrato, con los electrodos nombrados en la *Sección 5.2.2* y los valores de pD se calcularon aplicando la corrección a cada medida de pH por la Ecuación 5.4, donde pH es el valor leído en el instrumento.<sup>14</sup> El valor final de pD se alcanza mediante agregados con micropipeta de pequeños volúmenes de soluciones concentradas de NaOD y DCl en  $D_2O$ .

$$pD = pH + 0,4 \quad (\text{Ecuación 5.4})$$

#### 5.4. Irradiación estacionaria de las soluciones

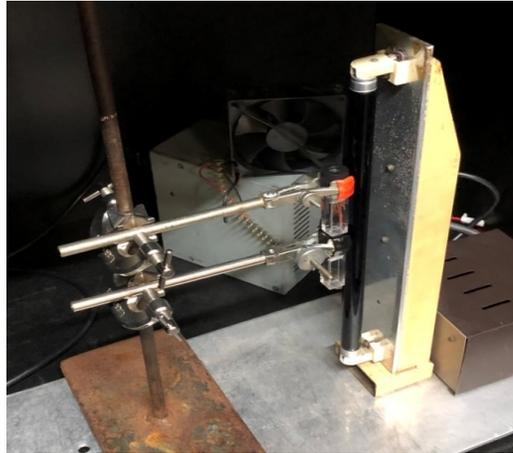
La irradiación continua consiste en iluminar una muestra con luz de intensidad constante y conocida procedente de una lámpara. El tiempo de irradiación es relativamente largo, ya que puede durar desde unos pocos segundos hasta unas horas. Este tiempo se considera largo por comparación con las técnicas de fotólisis de destello láser, en las cuales, el destello de luz puede durar desde unos pocos milisegundos hasta el fentosegundo, en función de la técnica empleada. Los experimentos en los que se estudian reacciones fotoquímicas inducidas por irradiación continua se conocen como fotólisis continuas o estacionarias.

##### 5.4.1. Sistemas de irradiación

Los estudios se realizaron con cuatro sistemas de irradiación de diferente geometría. Esto dependió principalmente del sustrato estudiado y del laboratorio donde se llevaron a cabo los experimentos.

- ✓ *Sistema de irradiación I:* se utilizó como fuente de irradiación una lámpara Rayonet RPR (*Southern N.E. Ultraviolet Co.*) que presenta un máximo de emisión en 350 nm y un ancho de banda de aproximadamente 20 nm. Se utilizaron celdas de fluorescencia de cuarzo (*Hellma*) de dimensiones de 1x0,4 cm y capacidad volumétrica de 1200  $\mu$ L. Se trabajó con una o dos celdas pegadas a la lámpara, irradiando con un camino óptico de 1 cm ó de 0,4 cm, según el sustrato y el experimento (Figura 5.1). Además se colocó un ventilador con el fin de evitar el calentamiento de la muestra durante la irradiación debido al calor desprendido por la lámpara. Este sistema se utilizó en la generación fotoquímica de Tyr<sub>2</sub> y para la fotoinactivación de  $\alpha$ -HlyA.
- ✓ *Sistema de irradiación II:* se emplearon dos lámparas Rayonet RPR 3500 A, colocadas una frente a la otra en presencia de un ventilador. Se colocaron una o dos celdas de fluorescencia de 1x0,4 cm, entre medio de las lámparas, irradiando por un camino óptico de 0,4 cm (Figura 5.2). Este sistema de irradiación se utilizó para la fotosensibilización de HSA y de Ub.
- ✓ *Sistema de irradiación III:* lámpara de Xenón (300 W) acoplado a un monocromador motorizado UV-VIS (Oriel Cornerstone 130 1/8 m) (Figura 5.3). Se colocaron las celdas de cuarzo de 1x0,4 cm a la salida del haz de luz, por camino óptico de 0,4 cm. Se utilizó un volumen de solución de 1 mL. La forma ácida y básica de Tyr<sub>2</sub> se irradiaron a 280 ( $\pm$  20) nm y 320 ( $\pm$  20) nm, respectivamente.
- ✓ *Sistema de irradiación IV:* fotorreactor equipado con 12 lámparas (Osram Sylvania, F15T8/BLB) y un ventilador para evitar el sobrecalentamiento de las soluciones. Se colocaron cuatro lámparas en la pared derecha del fotorreactor, cuatro en la pared izquierda y cuatro en la parte superior (Figura 5.4). Las lámparas emiten en la región de 310-410 nm y presentan su máximo de emisión centrado en 360 nm (1 mW/cm<sup>2</sup>). Se utilizaron celdas de fluorescencia de 1x1 cm con un volumen de solución de 2 – 3 mL. Este sistema de irradiación no precisó de agitación, ya que la muestra se irradió homogéneamente desde todas las direcciones. Este sistema se utilizó para la generación de fotoaductos de Ptr con HSA y Ub.

Los *Sistemas de Irradiación I y II* fueron ubicados dentro de una “caja negra”, para evitar el ingreso de luz proveniente desde el exterior. A su vez, en el *Sistemas de Irradiación III*, la celda también se encuentra protegida de la luz exterior. El tiempo de irradiación fue medido con un cronómetro de disparo manual, comenzando a contar desde el instante en el que se encendían las lámparas. La geometría de los sistemas de irradiación se mantuvo invariable durante los experimentos.



**Figura 5.1.** *Sistema de Irradiación I*, provisto de una lámpara Rayonet RPR 3500, pegada a dos celdas de cuarzo fluorescencia.



**Figura 5.2.** *Sistema de Irradiación II*, provisto de dos lámparas Rayonet RPR 3500 y celdas de cuarzo fluorescencia colocadas entre las dos lámparas.



**Figura 5.3.** Sistema de Irradiación III, compuesto por una lámpara de Xenón (300W) acoplada a un monocromador motorizado UV-VIS.



**Figura 5.4.** Sistema de Irradiación IV, provisto de 12 lámparas (Osram Sylvania, F15T8/BLB) colocadas dentro de un fotorreactor.

#### 5.4.2. Metodología general para la toma de muestra

Tras la irradiación continua de las soluciones durante distintos períodos de tiempo, se continuó con la toma de muestra para su posterior análisis. Con este fin se adoptaron dos procedimientos generales:

- ✓ *Medidas realizadas de forma consecutiva con la misma alícuota de solución original:* se irradia la solución en la celda durante un determinado período de tiempo, se corta la irradiación y se procede al análisis de la misma. A continuación, se devuelve el remanente de solución irradiada a la celda y se repite el procedimiento. Si la reacción estaba siendo estudiada bajo condiciones anaeróbicas, la solución se burbujea con Ar antes de retomar

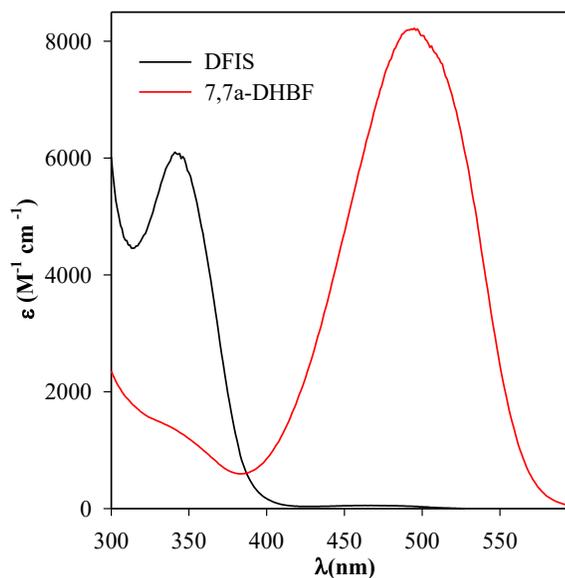
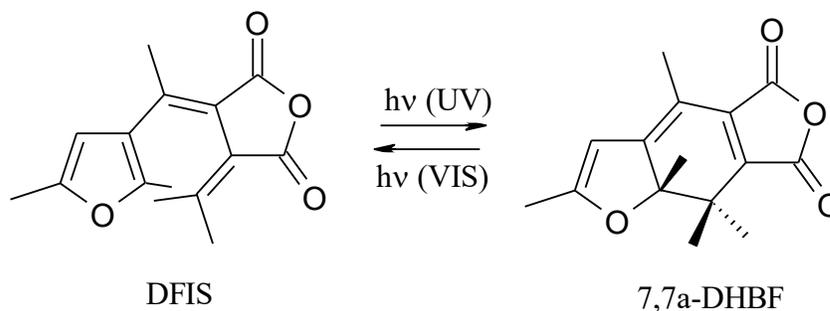
la irradiación. En ningún caso se redujo el volumen de la celda más de un 10 % del volumen inicial para no alterar la geometría del sistema. Este procedimiento se empleó principalmente en el estudio de la fotodegradación y la fotoquímica de Tyr<sub>2</sub> y en algunos experimentos de fotosensibilización de HSA y Ub, para evitar preparar volúmenes grandes de mezcla de reacción, debido al costo de estas proteínas.

- ✓ *Medidas realizadas con alícuotas frescas de la solución original:* luego de la irradiación de la solución, la totalidad de la muestra se retira de la celda para ser analizada. A continuación, se vuelve a cargar la celda con solución nueva, lavando la celda previamente en caso de no irradiar tiempos crecientes, y se repite el procedimiento. Si el estudio se realiza bajo condiciones anaeróbicas, la solución se burbujea con Ar antes de cada irradiación.

### 5.5. Actinometría

La determinación del flujo de fotones incidentes ( $q_{n,p}^{0,V}$ ) a la longitud de onda de excitación, que se define como la cantidad de fotones incidentes en un intervalo de tiempo ( $q_{n,p}^0$ ) por unidad de volumen (V) se realizó mediante el empleo del actinómetro químico *Aberchrome* 540 (Aberchromics Ltd.).<sup>15,16</sup> Los intervalos de longitudes de onda de aplicación de este actinómetro son de 310 a 370 nm y de 436 a 546 nm. Este compuesto es el anhídrido del ácido (E) $\alpha$ -(2,5-dimetil-3-furiletilden) (isopropiliden) succínico (DFIS) (Figura 5.5), el cual bajo irradiación con luz comprendida en el primer intervalo adquiere un color rojo intenso debido a la formación del 7,7a-dihidro-2,4,7,7a-pentametilbenzo[b]furano (7,7a-DHBF). Si se excita este producto, ahora irradiando en el segundo intervalo, esta reacción ocurre en sentido inverso. Las estructuras químicas de las dos especies, junto con los correspondientes espectros de absorción, se muestran en la Figura 5.5.

El *Aberchrome* fue usado en soluciones de tolueno, sin embargo, este actinómetro puede usarse en diferentes solventes. La  $\lambda$  del máximo de absorción del DFIS no depende de la naturaleza del solvente ( $\lambda_{\max}^{\text{DFIS}} = 343 \text{ nm}$ ;  $\epsilon_{343}^{\text{DFIS}} = 6077 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); en cambio, la  $\lambda$  del máximo de absorción de 7,7a-DHBF varía considerablemente según cuál sea el solvente usado ( $\lambda_{\max}^{\text{DHBF}} = 494 \text{ nm}$ ;  $\epsilon_{494}^{\text{DHBF}} = 8200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en tolueno).



**Figura 5.5.** Estructura química y espectros de absorción en tolueno de los dos isómeros del Aberchrome 540. La reacción hacia la derecha se logra irradiando en el intervalo 310 - 370 nm y hacia la izquierda irradiando entre 436 - 546 nm.

Para realizar la actinometría en el ultravioleta, se prepara una solución de DFIS a partir del sólido, se irradia a distintos tiempos y se sigue la absorbancia del 7,7a-DHBF a la  $\lambda$  de su máximo ( $A^{494}$ ) en función del tiempo. El flujo de fotones incidentes absorbidos por el actinómetro ( $q_{n,p}^{a,V}$ ) puede calcularse a partir de la siguiente ecuación:

$$q_{n,p}^{a,V} = \left( \frac{d[7,7a-DHBF]}{dt} \right) 1/\Phi_{Ac} \quad \text{(Ecuación 5.5)}$$

donde  $\Phi_{Ac}$  es el rendimiento cuántico del actinómetro. Cuando se irradia en el UV,  $\Phi_{Ac}$  es el rendimiento cuántico de la reacción de conversión de DFIS en 7,7a-DHBF ( $\Phi_{UV}$ ) y es igual a 0,2 independientemente del solvente usado.

De acuerdo a la ecuación de Lambert-Beer:

$$[7,7a-DHBF] = A^{494} / \epsilon_{494} l \quad (\text{Ecuación 5.6})$$

Por consiguiente, la Ecuación 5.5 puede expresarse de la siguiente manera:

$$q_{n,p}^{a,V} = (dA^{494} / dt) / (\epsilon_{494} * l * \Phi_{Ac}) \quad (\text{Ecuación 5.7})$$

donde  $\epsilon_{494} = 8200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (en tolueno) y  $l$  es el camino óptico de la celda en la cual se mide la absorbancia ( $l = 1 \text{ cm}$ ).

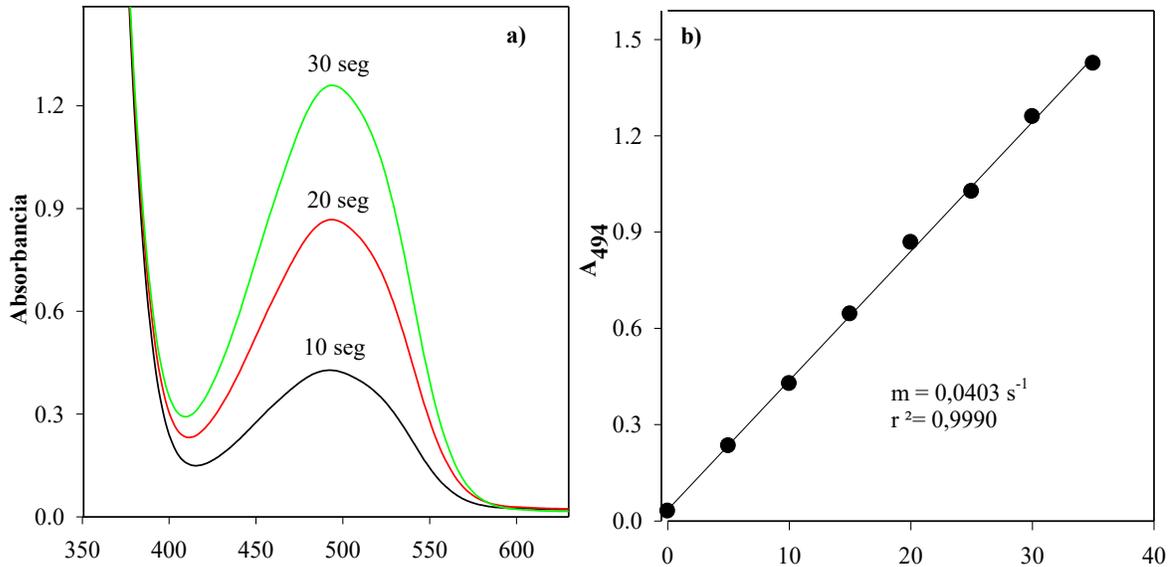
Para determinar  $q_{n,p}^{0,V}$ , en el intervalo 310 - 370, se cargó la celda de fotólisis con el actinómetro y se irradiaó esta solución durante un cierto tiempo y se midió el valor de absorbancia a 494 nm. Se repitió este procedimiento de manera de obtener varios puntos. Se graficó  $A^{494}$  vs.  $t$ , se realizó una regresión lineal y se obtuvo la pendiente de la correspondiente recta. Posteriormente se calculó  $q_{n,p}^{a,V}$  usando la Ecuación 5.7. En la Figura 5.6 se muestran los espectros de absorción obtenidos al irradiar el actinómetro a 350 nm.

Si más del 99,9% de la luz es absorbida por el actinómetro durante el período de tiempo de la irradiación, puede suponerse que  $q_{n,p}^{a,V}$  es aproximadamente igual a  $q_{n,p}^{0,V}$ . De lo contrario, se realiza el cálculo correspondiente empleando la Ecuación 5.8.

$$q_{n,p}^{a,V} = q_{n,p}^{0,V} (1 - 10^{-\epsilon l C}) \quad (\text{Ecuación 5.8})$$

Siendo  $q_{n,p}^{a,V}$  la intensidad de la luz absorbida por el actinómetro que se encuentra en la solución con una concentración molar  $C$ ,  $\epsilon$  es el coeficiente de absorción molar a la longitud de onda de irradiación y  $l$  es el camino óptico.

Es necesario aclarar que, calculando  $q_{n,p}^{0,V}$  de la manera que se acaba de explicar, el término “intensidad de la radiación incidente” se define como el número de moles de fotones (einstein) que alcanzan la celda por unidad de tiempo y por unidad de volumen. Por otro lado, resulta obvio que  $q_{n,p}^{0,V}$  depende de factores geométricos, tales como la distancia de la lámpara a la celda, las dimensiones de la celda misma, etc. Por esta razón en todos los experimentos en los cuales se empleó el valor de  $q_{n,p}^{0,V}$  para realizar cálculos, la geometría del sistema se mantuvo igual a la del experimento de actinometría.

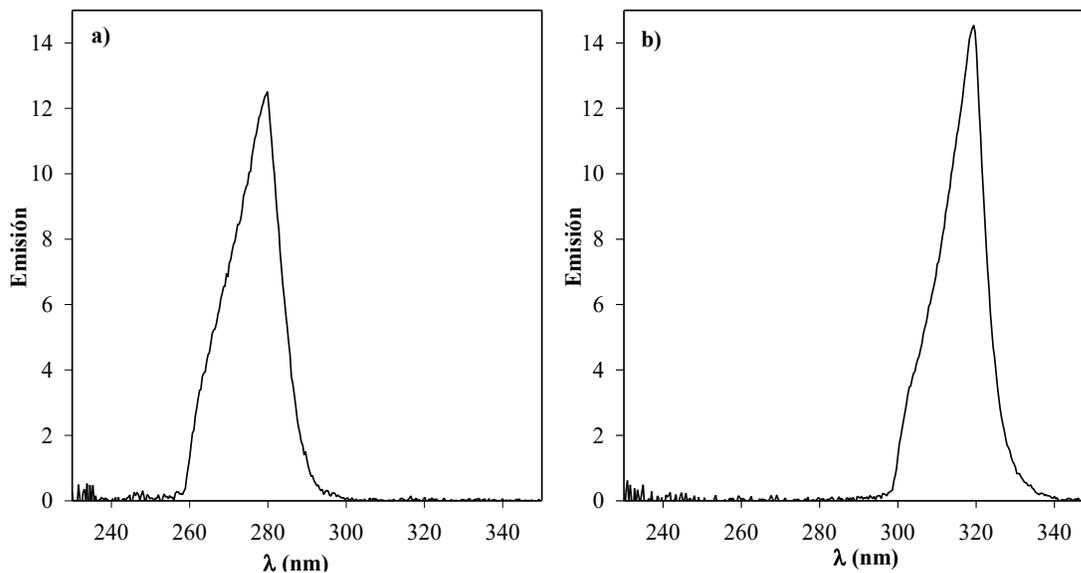


**Figura 5.6.a.** Evolución de los espectros de absorción de una solución de Aberchrome 540 irradiada a 350 nm (10, 20 y 30 seg);  $l = 1 \text{ cm}$ . **b)** Variación de la absorbancia a 494 nm en función del tiempo de irradiación.

Teniendo en cuenta que, como se mencionó previamente en esta sección, el actinómetro utilizado se puede utilizar para longitudes de onda comprendidas entre 310-370 nm, la actinometría del *Sistema de Irradiación III*, utilizado para el estudio de la fotodegradación y fotoquímica de Tyr<sub>2</sub> a 320 y 280 nm, se pudo realizar solamente para determinar el  $q_{n,p}^{0,V}$  a 320 nm. Se obtuvo un valor de  $8,1 (\pm 0,1) \times 10^{-5} \text{ Einstein L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Por lo tanto, para poder calcular el  $q_{n,p}^{0,V}$  a 280 nm, se utilizó la Ecuación 5.9:

$$q_{n,p}^{0,V}(280) = q_{n,p}^{0,V}(320) \frac{I(280)}{I(320)} \quad (\text{Ecuación 5.9})$$

Donde  $q_{n,p}^{0,V}(280)$  y  $q_{n,p}^{0,V}(320)$  son los valores de  $q_{n,p}^{0,V}$  a 280 nm y 320 nm, respectivamente, mientras que  $I(280)$  y  $I(320)$  son las intensidades de emisión del sistema de irradiación a 280 y 320 nm, respectivamente. Para determinar  $I(280)/I(320)$ , se registraron con un espectrofotómetro *Ocean Optics SD 2000* los espectros de emisión correspondientes a la salida del monocromador y se integró el área debajo de la curva de cada espectro (Figura 5.7). Para el  $q_{n,p}^{0,V}$  a 280 nm, se obtuvo un valor de  $7,7 (\pm 0,1) \times 10^{-5} \text{ Einstein L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .



**Figura 5.7.** Espectros de emisión de la lámpara de Xe, correspondientes a 280 nm (a) y 320 nm (b), a la salida del monocromador.

### **Bibliografía**

- <sup>1</sup> V. Herlax, *et.al*, *Health*, 2(5), 484-492, 2010.
- <sup>2</sup> C. Lorente; A.H Thomas, *Acc. Chem. Res*, **39**, 395-402, 2006.
- <sup>3</sup> J. R. Lakowicz, “*Principles of Fluorescence Spectroscopy*”, 3rd ed, 2006.
- <sup>4</sup> D. A. Malencik, *et.al*, *Anal. Biochem.*, **242**, 202-213, 1966.
- <sup>5</sup> M. Noronha, *et.al*, *Biophys J.*, **87**(4): 2609-2620, 2004.
- <sup>6</sup> G.H. Beaven, *et.al*, *Eur J Biochem*, **41**, 539-546, 1974.
- <sup>7</sup> A. D. Gojanovich, “Inactivación de Tirosinasa fotoinducida por Pterina”, Trabajo Final de la Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata (2012).
- <sup>8</sup> S. O. Andersen, *Biochim. Biophys. Acta.*, **69**, 249-262, 1963.
- <sup>9</sup> G. Guidi, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **63**, 455-462, 1996.
- <sup>10</sup> M.P. Denofrio, *et.al*, *Photobiol. Sci.*, **13**, 1058-1065, 2014.
- <sup>11</sup> P. Ogilby, *et.al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 3423-3430, 1983.
- <sup>12</sup> C.S. Foote, *et.al*, *Active Oxygen in Chemistry*, 105-140, 1995.
- <sup>13</sup> L.A. Martinez, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **58**, 94-107, 2000.
- <sup>14</sup> P. Salomaa, *et.al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1-7, 1964.

<sup>15</sup> S.E. Braslavsky, “*Glossary of terms used in photochemistry*”, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006), *Pure Appl. Chem.*, **79**, 293, 2007.

<sup>16</sup> A. Braun, *et.al*, “*Photochemical technology*”, *Vol. 104*, 1991.



# CAPÍTULO 6

## TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

En este capítulo, se detallan las diferentes técnicas espectroscópicas y colorimétricas empleadas en el análisis de las soluciones irradiadas. Las técnicas empleados incluyeron: i) espectrofotometría UV-Visible, ii) espectroscopía de emisión (estacionaria y resuelta en el tiempo), iii) fotólisis de destello láser (FLP) y iv) resonancia magnética nuclear (RMN). Estas técnicas, junto con las que aparecerán detalladas en los Capítulos 7 y 8, permitieron identificar, caracterizar y cuantificar tanto a los reactivos como a los productos de las reacciones, como así también, obtener información sobre los mecanismos de reacción involucrados.

### 6.1. Espectroscopía UV-visible

Esta técnica analítica está basada en la medida directa de la absorción de radiación electromagnética por parte de una muestra. La absorción de la radiación varía con la longitud de onda de la radiación dependiendo de la composición química de la muestra y es directamente proporcional a su concentración. Un espectro de absorción es un registro de la intensidad de absorción de luz por una muestra en función de la longitud de onda (o frecuencia) de la luz incidente. Indica qué longitudes de onda son absorbidas por la molécula en estudio al pasar de niveles de menor a mayor energía. Las bandas observadas en el espectro dan información sobre las diferencias energéticas entre los estados electrónicos de una molécula. Esta técnica no permite caracterizar a un compuesto, pero proporciona información acerca de si una molécula ha sufrido cambios estructurales. Por ejemplo, las distintas formas ácido-base de una misma sustancia pueden claramente ser distinguidas por las diferencias en sus espectros de absorción.

En este trabajo de tesis los espectros de absorción UV-visible se obtuvieron con un espectrofotómetro: UV-1800 (*Shimadzu*). Este equipo permite obtener espectros en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 190 y 1100 nm. Los espectros se

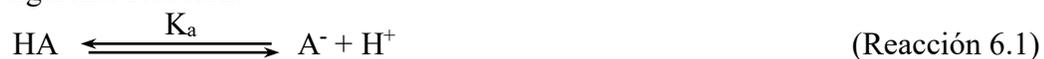
realizaron utilizando H<sub>2</sub>O como blanco. Para las medidas, se utilizaron celdas de cuarzo (*Hellma*), cuyo camino óptico es de 0,4 ó 1 cm de acuerdo a la absorbancia de la muestra.

En todos los experimentos se registraron los espectros de absorción a diferentes tiempos de irradiación. Cuando se observan cambios espectrales, se puede afirmar que ha tenido lugar una reacción química.

### 6.1.1. Titulación Espectrofotométrica

Entre los numerosos métodos analíticos diseñados para el estudio de los equilibrios ácido-base y la determinación de sus respectivas constantes de disociación ácida ( $K_a$ ), se destaca la titulación espectrofotométrica. Esta técnica se basa, en el análisis de la variación del espectro de absorción de una solución de la sustancia estudiada cuando se cambia el pH de la misma sin cambiar su concentración.<sup>1,2,3</sup>

El equilibrio ácido-base que presenta Tyr<sub>2</sub> (*Sección 2.2.4*) puede representarse mediante la siguiente reacción:



Donde HA representa la forma ácida y A<sup>-</sup> la forma alcalina; y  $K_a$  es la constante de equilibrio de esta reacción o constante de disociación ácida.

Sobre consideraciones sencillas basadas en el equilibrio entre dos formas ácido-base de una sustancia puede deducirse una ecuación que vincula la absorbancia de la solución, a determinada longitud de onda, con el pH (ver deducción matemática en los párrafos siguientes):

$$A_T = C \cdot \{b + (a - b) \cdot [K_a / (K_a + 10^{(-X)})]\} \quad (\text{Ecuación 6.1})$$

Donde  $A_T$  es la absorbancia de la solución a una longitud de onda determinada; a y b son los coeficientes de absorción molar, a dicha longitud de onda, de las formas alcalina y ácida respectivamente;  $K_a$  es la constante de ionización del compuesto y x el pH.

La Ecuación 6.4 permite plantear la absorbancia total de la solución ( $A_T$ ), a una determinada longitud de onda, como una función del pH. Considerando que las únicas especies que absorben luz en la región del espectro analizada son las formas ácida y alcalina de la molécula cuya  $K_a$  se quiere averiguar, pueden plantearse las siguientes ecuaciones:

$$A_{HA} = \epsilon_{HA} \cdot [\text{HA}] \quad (\text{Ecuación 6.2})$$

$$A_{A^-} = \epsilon_{A^-} \cdot [A^-] \quad (\text{Ecuación 6.3})$$

$$A_T = A_{HA} + A_{A^-} = \epsilon_{HA} \cdot [HA] + \epsilon_{A^-} \cdot [A^-] \quad (\text{Ecuación 6.4})$$

Donde  $A_{HA}$  y  $A_{A^-}$  son las absorbancias de las formas ácida y alcalina respectivamente,  $\epsilon_{HA}$  y  $\epsilon_{A^-}$  son los coeficientes de absorción molar de las formas ácida y alcalina, respectivamente y, por último,  $[HA]$  y  $[A^-]$  son las correspondientes concentraciones molares.

La  $K_a$  para el equilibrio representado en la Ecuación 6.1 viene dada por la siguiente expresión:

$$K_a = [H^+] \cdot [A^-] / [HA] \quad (\text{Ecuación 6.5})$$

Definiendo la concentración total (C) como la sumatoria de las concentraciones de las dos formas ácido-base:

$$C = [HA] + [A^-] \quad (\text{Ecuación 6.6})$$

despejando  $[HA]$  de la Ecuación 6.6 y reemplazándola en la Ecuación 6.4, se obtiene:

$$A_T = \epsilon_{HA} \cdot (C - [A^-]) + \epsilon_{A^-} \cdot [A^-] \quad (\text{Ecuación 6.7})$$

despejando  $[HA]$  de Ecuación 6.6, reemplazándolo en Ecuación 6.5 y luego despejando  $[A^-]$  se obtiene una expresión que relaciona  $[A^-]$  y C.

$$[A^-] = C \cdot K_a / (K_a + [H^+]) \quad (\text{Ecuación 6.8})$$

Reemplazando la Ecuación 6.8 en la Ecuación 6.7, se obtiene:

$$A_T = \epsilon_{HA} \cdot (C - C \cdot K_a / (K_a + [H^+])) + \epsilon_{A^-} \cdot C \cdot K_a / (K_a + [H^+]) \quad (\text{Ecuación 6.9})$$

reordenando los términos se obtiene:

$$A_T = C [\epsilon_{HA} + (\epsilon_{A^-} - \epsilon_{HA}) \cdot K_a / (K_a + 10^{-\text{pH}})] \quad (\text{Ecuación 6.10})$$

reemplazando en la Ecuación 6.10  $\epsilon_{HA}$  por a,  $\epsilon_{A^-}$  por b y pH por X, se llega a la Ecuación 6.1.

En el presente trabajo de tesis, el valor de  $K_a$  de Tyr<sub>2</sub> se determinó mediante la técnica de titulación espectrofotométrica. Para ello, la solución de Tyr<sub>2</sub> aislada (Capítulo 9), se llevó a pH 10,0 y se calculó su concentración a partir de la Ecuación de Lambert-Beer (*Sección 5.2.1*). Luego, la solución madre se dividió en dos fracciones, una de las cuales se mantuvo a pH 10,0 y la otra se llevó a pH 3,0 mediante el agregado de pequeños volúmenes de solución acuosas de HCl (2 M). El ajuste final de pH se realizó agregando pequeños volúmenes de las soluciones de HCl o NaOH.

Se realizó una mezcla de ambas soluciones en proporciones definidas, para ir ajustando el pH a un valor deseado y luego, se tomó el espectro de absorción de la solución. Repitiendo este procedimiento, mezclando las soluciones en proporciones diferentes, se

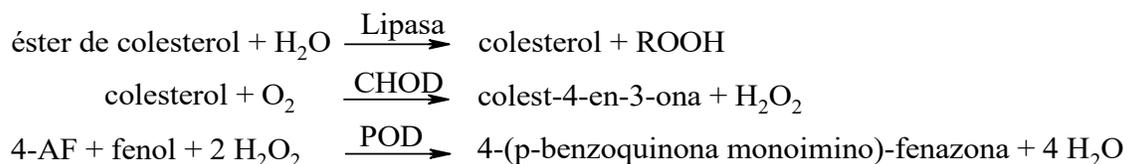
prepararon sucesivas soluciones de pH diferentes, y se registró el espectro de absorción para cada una. De esta manera, mediante la mezcla de las soluciones madres de distinto pH en distintas proporciones, se logra modificar el pH de la solución en un amplio intervalo, sin modificar la concentración de la sustancia cuya  $K_a$  se quiere determinar.

En todos los casos, se empleó como blanco una solución de agua (mili Q) y se registraron los espectros entre 200 y 500 nm. Se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Posteriormente, se graficaron los espectros de absorción obtenidos y se realizaron gráficos de absorbancia en función del pH a distintas longitudes de onda, las cuales se escogieron dentro de las zonas de mayor cambio de absorbancia. Sobre la base de estos resultados experimentales, se realizó el ajuste no lineal empleando la Ecuación 6.1 (estos cálculos se realizaron con el programa informático *SigmaPlot*, versión 10.0), que permitió obtener los valores de los parámetros a, b y  $K_a$ .

### 6.1.2. Técnicas colorimétricas

#### 6.1.2.1. Determinación colorimétrica de $H_2O_2$

Uno de los métodos más utilizados y difundidos para la determinación del colesterol en sangre, se basa en un conjunto de reacciones (Esquema 6.1), en el cual el colesterol se libera de sus ésteres y luego se oxida para dar una cetona y  $H_2O_2$ . Finalmente, el  $H_2O_2$  se hace reaccionar con 4-aminofenazona (4-AF) y fenol para dar una quinona coloreada (4-(p-benzoquinona monoimino)-fenazona) que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 505 nm.



**Esquema 6.1.** Secuencia de reacciones que permiten cuantificar la cantidad de colesterol en una muestra. CHOD, lipasa y POD representan a las enzimas colesterol oxidasa, lipasa fungal y peroxidasa, respectivamente.

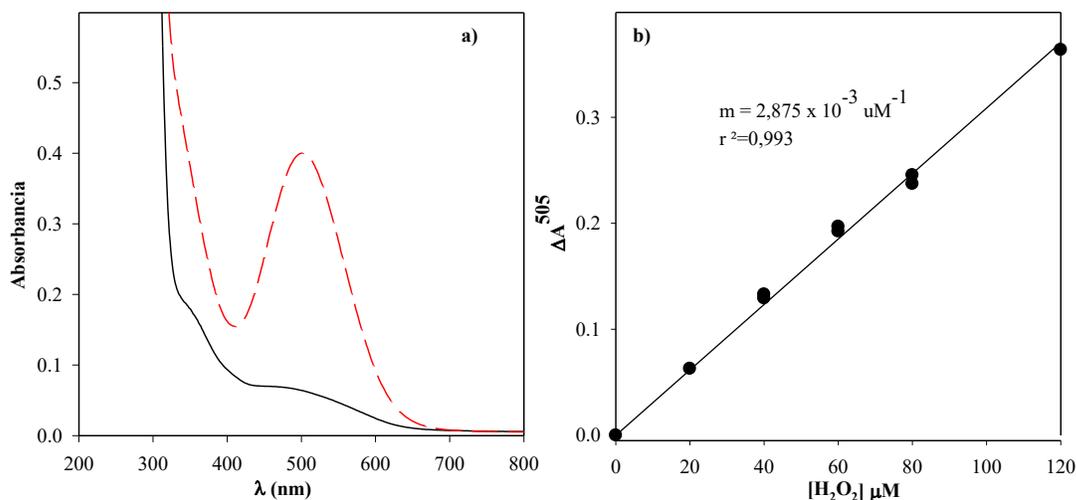
Esta última reacción se utiliza para medir  $H_2O_2$  en solución. Por lo tanto, se modificó el método de determinación de colesterol para la cuantificación de  $H_2O_2$  generada en los procesos fotoquímicos estudiados. Para ello, se agrega el reactivo comercial a la muestra que

contiene  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la cantidad de quinona coloreada obtenida se la compara con la de una curva de calibración llevada a cabo con solución patrón de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las otras dos enzimas no interfieren dado que son específicas para los sustratos que se indican. Es importante aclarar que se realizaron controles aplicando este método a soluciones no irradiadas para descartar la existencia de reacciones inespecíficas.

Para estudiar la posible generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se utilizó un kit comercial “COLESTAT” enzimático provisto por laboratorios Wiener (Argentina). El reactivo para la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se prepara colocando 50 partes de agua milli Q, 5 partes del reactivo (4-AF) y 5 partes del reactivo fenol, y luego se lleva esta solución a 100 partes con agua. Luego, se agrega a la mezcla 2 partes de la enzima previamente homogenizada por inversión (sin agitar, para evitar la formación de espuma). Las cantidades y concentraciones de los componentes son los siguientes: 1,25 mM de 4-AF, 2,75 mM fenol, lipasa  $\geq 6000$  U/ l, CHOD  $\geq 60$  U/ l, POD  $\geq 400$ , pH 7,4  $\pm 0,1$ . Una vez preparado el reactivo de trabajo, se puede almacenar en frasco de vidrio color caramelo y conservar en refrigerador, presentando una estabilidad de aproximadamente 1 mes a partir del momento de su preparación. Los reactivos provistos son estables en refrigerador (2 - 10 °C) hasta la fecha de vencimiento indicada por el fabricante.

Para el análisis de las muestras irradiadas se utilizaron 0,5 mL de muestra irradiada y 0,6 mL del reactivo. Después de adicionar la muestra al reactivo, se deja durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y luego, se miden las absorbancias a 505 nm de las soluciones. Los valores de absorbancia a 505 nm ( $A^{505}$ ) obtenidos tanto para las muestras estudiadas como las correspondientes a las soluciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  preparadas para realizar la curva de calibración, fueron corregidos por el valor de absorbancia a la misma longitud de onda del blanco de reacción. Para el caso de las soluciones irradiadas, el blanco se preparó mezclando el reactivo colorimétrico de trabajo con la solución antes del inicio de la irradiación (en idénticas proporciones a las usadas para la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a los distintos tiempos de reacción). Para construir la curva de calibración, se prepararon soluciones acuosas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de distinta concentración y luego se tomaron muestras de 0,5 mL y se las hizo reaccionar con 0,6 mL del reactivo de trabajo. El blanco se prepara mezclando el reactivo con  $\text{H}_2\text{O}$ . Se las incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se midió la  $\Delta A^{505}$  ( $\Delta A_{\text{muestra}}^{505} - \Delta A_{\text{blanco}}^{505}$ ) (Figura 6.1.a). Se graficó  $\Delta A^{505}$  en función de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (M) y se obtuvo una relación lineal (valores de absorbancia hasta 0,7). De la curva

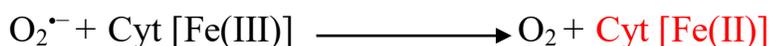
de calibración ( $\Delta A^{505}$  vs.  $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ) (Figura 6.1.b) se obtuvo el valor de la pendiente ( $m$ ), la cual se utilizó para transformar los valores de  $\Delta A^{505}$  de las muestras estudiadas en valores de concentración molar de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

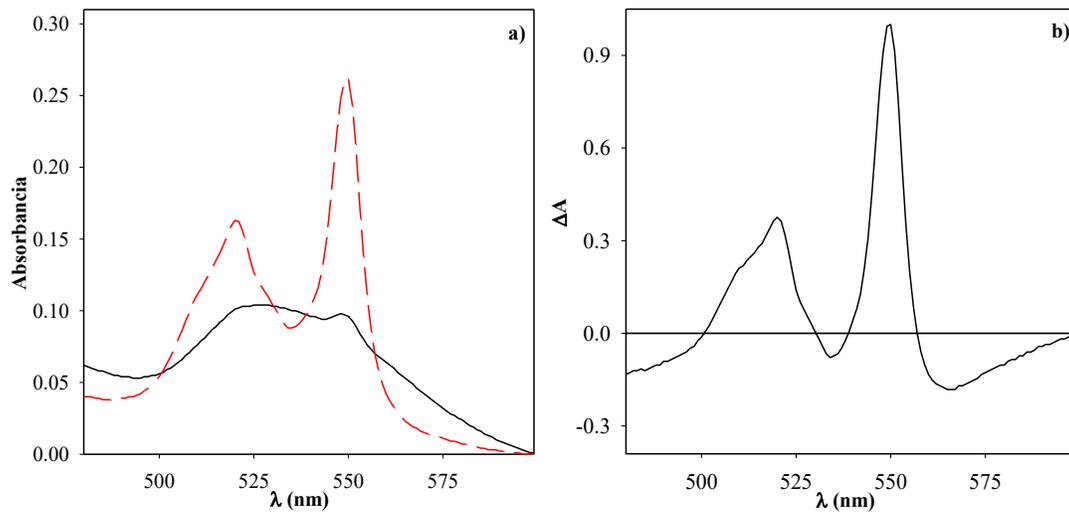


**Figura 6.1.a.** Espectro de absorción del complejo coloreado correspondiente a una solución de  $[\text{H}_2\text{O}_2]=1,2 \times 10^{-4}$  M (línea discontinua) y el correspondiente al blanco (línea sólida). **b)** Curva de calibración ( $\Delta A^{505}$  vs.  $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ).

#### 6.1.2.2. Detección de anión superóxido por Citocromo *c*

Para investigar la formación del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a partir de ciertas reacciones fotoquímicas, se utilizó el *método de reducción del Citocromo c (Cyt) inhibible por Superóxido Dismutasa (SOD)*.<sup>4</sup> Durante este procedimiento, Cyt captura un electrón del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y se reduce de ferricitocromo *c* ( $\text{Fe}^{+3}$ ) a ferrocitocromo *c* ( $\text{Fe}^{+2}$ ), modificándose el espectro de absorción de manera característica, pues aparece una nueva banda con un máximo centrado a 550 nm (Figura 6.2.a). A partir de estos espectros se obtiene un espectro diferencia típico que se encuentra publicado en literatura (Figura 6.2.b).<sup>5</sup> En aquellos sistemas en los cuales se observa reducción del Cyt, se repite el ensayo en exactamente las mismas condiciones experimentales pero agregando SOD. Esta enzima es capaz de dismutar el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ , eliminando el radical que reduce al Cyt, e inhibiendo así la reacción.<sup>6</sup> Por lo tanto, se confirma la existencia de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  solo si se observa la inhibición o disminución de la reducción del Cyt en presencia de SOD.





**Figura 6.2.a.** Espectros de absorción de Cyt c oxidado (línea sólida) y reducido (línea discontinua) y **b)** espectro diferencia típico entre las formas reducida y oxidada del Cyt.

Los experimentos se realizaron irradiando soluciones aireadas de Tyr<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) en presencia de 14  $\mu$ M de Cyt, a pH ácido y alcalino. Se registraron los espectros de absorción a distintos intervalos de tiempo y luego se graficó la absorbancia a 550 nm ( $A^{550}$ ) en función del tiempo de irradiación. Para confirmar que el  $O_2^{\cdot-}$  era el responsable de la reducción del Cyt se agregó SOD (200 U/mL). De este modo, el ensayo es muy útil para determinar reacciones de transferencia de electrones generadas a partir de  $O_2^{\cdot-}$  (en soluciones aireadas).<sup>7,8</sup>

### 6.1.2.3. Medida de actividad hemolítica de $\alpha$ -HlyA

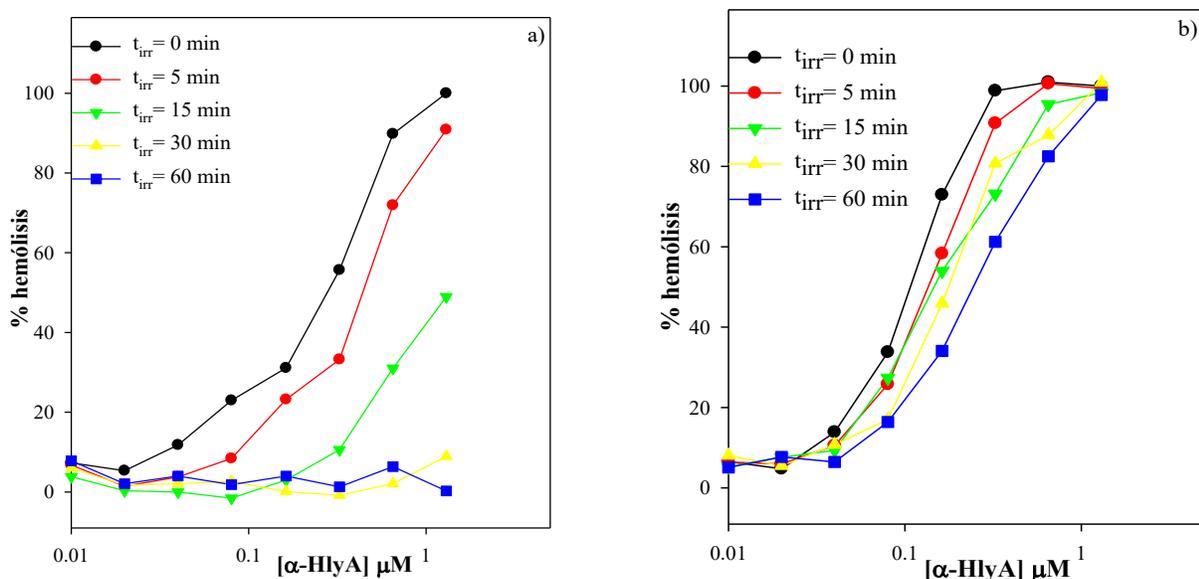
Para las medidas de actividad hemolítica de  $\alpha$ -HlyA, se realizaron ensayos con sangre humana heparinizada obtenida por punción venosa, siguiendo el protocolo aprobado por el Comité de bioética y ética de la investigación (COBIMED) de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Se tomó una alícuota de sangre humana y se centrifugó a 3500 rpm para separar los eritrocitos del plasma y otras células sanguíneas. Los eritrocitos se lavaron con buffer Tris (20 mM Tris, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH= 7,4) hasta obtener un sobrenadante libre de hemoglobina. Luego, se preparó una solución 4% v/v de eritrocitos en mismo buffer. Los ensayos se realizaron en placas de hemólisis por dilución seriada de 100  $\mu$ l de las soluciones de toxina y Ptr irradiadas en 100  $\mu$ l de buffer Tris. Se añadieron 100  $\mu$ l de la solución 4% v/v de eritrocitos en cada pocillo de manera que el volumen final de todos los pocillos fuera de 200  $\mu$ l. La cinética

de hemólisis se determinó por medidas de disminución de la turbidez en función del tiempo a 37°C. La lectura de densidad óptica a 595 nm se realizó en un Detector Multimode DTX 880 de Beckman Coulter. Como controles, se utilizaron agua y buffer Tris.

El porcentaje de hemólisis a los 10 y 30 minutos después de agregados los eritrocitos, se calculó siguiendo la Ecuación 6.11,

$$\% \text{ hemólisis} = 100 \times (\text{DO}_{\text{GR}} - \text{DO}_x) / (\text{DO}_{\text{GR}} - \text{DO}_{100}) \quad (\text{Ecuación 6.11})$$

Donde  $\text{DO}_{100}$  corresponde al 100% de hemólisis (valor obtenido con agua destilada);  $\text{DO}_{\text{GR}}$  corresponde a la muestra de eritrocitos con buffer y  $\text{DO}_x$  al valor de la muestra tratada con distintas concentraciones de toxina (Figura 6.3).



**Figura 6.3.** Porcentaje de hemólisis, medido por dispersión de luz, en función de la concentración de  $\alpha$ -HlyA a distintos tiempos de irradiación en presencia (a) y ausencia (b) de Ptr. Datos calculados a los 30 min de agregados los glóbulos rojos. Condiciones irradiación:  $[\alpha\text{-HlyA}]_0$ : 1,75  $\mu\text{M}$ ,  $[\text{Ptr}]_0$ : 70  $\mu\text{M}$ , pH: 7,3,  $\lambda_{\text{irr}}$ = 350 nm.

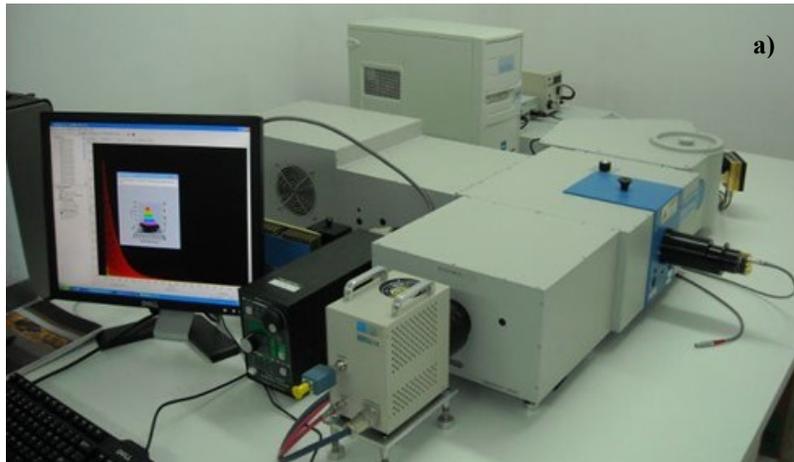
## 6.2. Espectroscopía de emisión

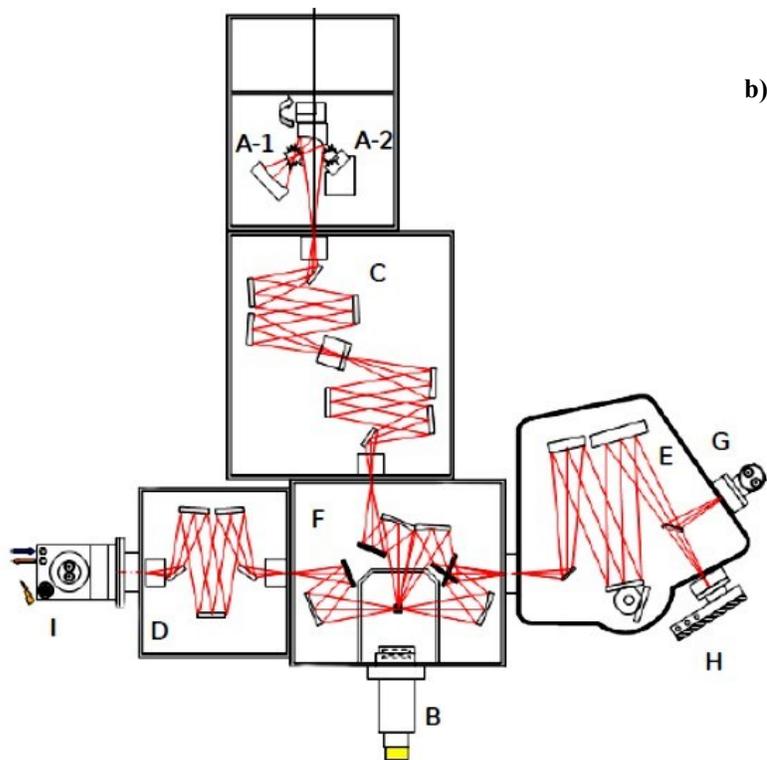
### 6.2.1. Descripción del equipo

Se realizaron medidas de emisión de fluorescencia, tanto en modo estacionario como con resolución temporal, y de emisión de fosforescencia de  $^1\text{O}_2$  a temperatura ambiente en la región del infrarrojo cercano (NIR) con un espectrofluorómetro FluoroLog-3, Horiba Jobin Yvon (Equipo I, Figura 6.4.a). El equipo emplea la técnica de recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente (TCSPC, *Time-Correlated Single Photon Counting*). En la Figura

6.4.b se muestran los distintos componentes del equipo, los cuales se pueden dividir de la siguiente manera:

- ✓ **Fuentes de excitación:** (A-1) lámpara de Xenón estacionaria (CW 450W), (A-2) lámpara de Xenón pulsada (UV *xenon flash tube*) y (B) LEDs pulsados (NanoLEDs de 340 y 460 nm y SpectraLED de 370 y 560 nm).
- ✓ **Monocromadores:** (C) de excitación (330 nm *blaze grating*), (D) de emisión en la región del NIR (1000 nm *blaze grating*) y (E) de emisión para el UV-Visible (iHR320, con dos redes de difracción, 330 y 500 nm *blaze*).
- ✓ **Detectores:** (F) diodo de referencia para monitorear la intensidad de la lámpara de Xe después de pasar por el monocromador C, (G) R-928 para medidas estacionarias en el UV-Visible (entre 240 - 850 nm), (H) TBX-04 para medidas rápidas en el UV-Visible (entre 182 - 650 nm) e (I) Hamamatsu H10330-45 para medidas en el NIR (entre 950 - 1700 nm).





**Figura 6.4.a.** Espectrofluorómetro FluoroLog-3, Horiba Jobin Yvon (Equipo I). **b)** Esquema con la descripción de las partes que componen el espectrofluorómetro Fluoro Log-3: (A-1) lámpara de Xe estacionaria (CW 450W), (A-2) lámpara de Xe pulsada, (B) LED, (C) monocromador de excitación, (D) monocromador de emisión en la región del NIR, (E) monocromador de emisión UV-Visible, (F) detector de referencia, (G) detector R-928, (H) detector TBX-04 e (I) detector Hamamatsu H10330-45.

En la Figura 6.4.b se muestra el esquema del equipo, el cual presenta una configuración en forma de "T". Cuenta con tres monocromadores, uno de excitación y dos de emisión, con tres detectores diferentes que permiten registrar la emisión en un amplio rango espectral y trabajar en distintas escalas de tiempo.

Para los estudios de la formación de aductos fluorescentes entre Ptr y proteínas, realizados en la Universidad Politécnica de Valencia, se utilizó un espectrofluorómetro *Photon Technology International (PTI) LPS-220B* (Equipo II). En la sección de resultados nos referiremos a los espectrofluorómetros utilizados como “Equipo I” o “Equipo II”.

### 6.2.2. Emisión en estado estacionario

Como se mencionó en el Capítulo 1, cuando una molécula absorbe radiación pasa a un estado electrónico excitado. Si la pérdida de este exceso de energía ocurre de forma radiativa, se observa la emisión del compuesto. Si la emisión de radiación ocurre sin cambio en la multiplicidad de espín de los estados electrónicos, se observa el fenómeno conocido como emisión de fluorescencia. Si la transición se da entre estados de diferente multiplicidad, se observa emisión de fosforescencia. Este fenómeno queda representado en un espectro de emisión, donde se registra la intensidad de emisión en función de la longitud de onda. Esta propiedad se ve fuertemente afectada tanto por la estructura química de la molécula como por el solvente en el que se encuentra disuelta.<sup>9</sup>

Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron utilizando la lámpara de Xe estacionaria (A-1, Figura 6.4.b). La longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) se seleccionó haciendo pasar el haz de luz proveniente de la lámpara a través de un monocromador (C, Figura 6.4.b). Esta radiación alcanza una de las caras de la celda de cuarzo (1 o 0,4 cm), donde se encuentra la solución de la muestra en estudio. Tras la absorción de la luz la muestra emite radiación en todas las direcciones, pero sólo la luz emitida de forma perpendicular a la fuente de excitación es capaz de alcanzar el monocromador de emisión (E, Figura 6.4.b). A la salida de dicho monocromador se encuentra el detector R-928 (G, Figura 6.4.b), que mide la radiación emitida a una determinada longitud de onda ( $\lambda_{em}$ ). El espectro de emisión se construye excitando a la muestra con una  $\lambda_{exc}$  fija y registrando la señal en un determinado rango de longitudes de onda de emisión. Todos los espectros de emisión se corrigieron automáticamente por la respuesta del fototubo y del monocromador de emisión. El espectro de excitación se construye fijando el monocromador de emisión (E, Figura 6.4.b) a una  $\lambda_{em}$  fija, donde se sabe que la muestra emite y registrando la señal en un determinado rango de longitudes de onda de excitación. Al igual que los espectros de emisión, se registraron utilizando la lámpara de Xe estacionaria (A-1, Figura 6.4.b).

En algunos casos, tras el registro de los espectros de emisión, se calcularon los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ). El rendimiento cuántico de un proceso fotofísico hace referencia a la eficiencia de un proceso en términos de cantidad de energía lumínica absorbida. El  $\Phi_F$  se puede expresar en términos de número de moléculas fluorescentes con respecto al número de fotones absorbidos (Ecuación 6.12).<sup>9</sup>

$$\Phi_F = \frac{n^\circ \text{ de moléculas fluorescentes por unidad de tiempo y volumen}}{n^\circ \text{ de fotones absorbidos por unidad de tiempo y volumen}} \quad (\text{Ecuación 6.12})$$

Como el número de fotones absorbidos es proporcional a la intensidad de la radiación absorbida ( $I_A$ ) y el número de fotones emitidos por fluorescencia es proporcional a la intensidad de radiación fluorescente ( $I_F$ ), la ecuación anterior se puede reescribir como sigue:

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A} \quad (\text{Ecuación 6.13})$$

El  $\Phi_F$  de una especie molecular se puede determinar de forma experimental (Ecuación 6.14). Para ello es necesario comparar la intensidad de emisión de la muestra con la intensidad de emisión de una referencia cuyo  $\Phi_F$  sea conocido. Como muestra de referencia (ref) se utilizó quinina bisulfato (QBS) 0,5 M en  $H_2SO_4$ , la cual tiene un  $\Phi_F$  de 0,546.<sup>10</sup> La intensidad de emisión ( $I$ ) se corresponde con el área del espectro de emisión corregido. Es necesario que los espectros de emisión de la muestra y de la referencia se midan exactamente en las mismas condiciones, es decir, misma longitud de onda de excitación, celda, ancho de rendija y temperatura.

$$\Phi_F = \left[ \frac{(A I n)^2}{(A I_{ref} n_{ref})^2} \right] \Phi_{ref} \quad (\text{Ecuación 6.14})$$

Donde  $A$  y  $A_{ref}$  son las absorbancias de la muestra y la referencia;  $I$  e  $I_{ref}$  son las intensidades de emisión de la muestra y la referencia; y  $n$  y  $n_{ref}$  son el índice de refracción del solvente de la muestra y la referencia, respectivamente.

Si la absorbancia de la muestra y la referencia son iguales a la longitud de onda de excitación, el factor  $(A_{ref}/A)$  puede ser simplificado. Si no se consigue tener la misma absorbancia, ese factor sirve para corregir la diferencia de fotones absorbidos entre ambas soluciones. Para evitar problemas de filtro interno, se trabajó con soluciones diluidas con absorbancia igual o menor que 0,10.

#### 6.2.2.1. Titulación Espectrofluorométrica

La titulación espectrofluorométrica se basa en el análisis de la variación de la intensidad de emisión de fluorescencia ( $I_F$ ) de una solución de la sustancia en estudio cuando se cambia el pH de la misma sin cambiar su concentración. Los resultados registrados se ajustaron con la Ecuación 6.15 para obtener el valor de  $K_a$ . Haciendo consideraciones análogas a las de la *Sección*

6.1.1 (titulación espectrofotométrica) puede deducirse la siguiente expresión que relaciona la intensidad total de fluorescencia como una función del pH:

$$I_F = C. \{I_b + (I_a - I_b). [K_a / (K_a + 10^{(-X)})]\} \quad (\text{Ecuación 6.15})$$

Donde  $I_a$  e  $I_b$  son las intensidades de fluorescencia de la forma alcalina y de la forma ácida respectivamente,  $K_a$  es la constante de disociación,  $x$  es el pH.

### 6.2.3. Emisión resuelta en el tiempo

En las técnicas resueltas en el tiempo se genera una cierta población de moléculas en estados electrónicamente excitados mediante un pulso de radiación electromagnética. Luego de dicho pulso, se estudia alguna propiedad del sistema como una función del tiempo. Para medir el tiempo de vida de fluorescencia ( $\tau_F$ ) de una molécula se debe excitar a la misma con un pulso de luz muy corto y de una longitud de onda determinada, y posteriormente registrar la disminución de la emisión en función del tiempo. La velocidad de este decaimiento se puede expresar con la Ecuación 6.16,<sup>9</sup>

$$\frac{\partial(N^*)}{\partial t} = -k_e N^* \quad (\text{Ecuación 6.16})$$

Donde  $N^*$  es la cantidad de moléculas en el estado excitado singlete y  $k_e$  es la constante de velocidad de emisión espontánea, que se corresponde con la sumatoria de todas las vías de decaimiento del singlete. La integral definida de la Ecuación 6.16 entre cero y un tiempo “ $t$ ”, da como resultado la ecuación Ecuación 6.17:

$$N_t^* = N_0^* \exp(-k_e t) \quad (\text{Ecuación 6.17})$$

donde  $N_t^*$  y  $N_0^*$  son el número de moléculas excitadas a un tiempo “ $t$ ” y a un tiempo “cero” respectivamente. Como la intensidad de fluorescencia es proporcional al número de moléculas en estado excitado, se espera un decaimiento exponencial. Se define el  $\tau_F$  (Ecuación 6.18) como el tiempo necesario para que la intensidad de fluorescencia se reduzca en un factor de  $1/e$  de su valor inicial.

$$\tau_F = \frac{1}{k_F} \quad (\text{Ecuación 6.18})$$

Estas medidas se realizaron utilizando como fuente de excitación NanoLEDs con un máximo de emisión de 341 y 295 nm, dependiendo de las muestras. Los fotones emitidos por la muestra pasan a través del monocromador de emisión a una  $\lambda_{em}$  fija (E, Figura 6.4) hasta llegar al detector TBX-04 (H, Figura 6.4), que se encuentra trabajando en el modo TCSPC. El principio de la técnica TCSPC es la detección de fotones individuales y la medición de sus tiempos de llegada al detector con respecto a una señal de referencia que es, por lo general, la fuente de excitación. TCSPC es un método estadístico, y por lo tanto, necesita una fuente de luz pulsada con alta tasa de repetición (como por ejemplo, un LED) para poder acumular un número suficiente de fotones que alcancen el detector, y así, poder generar una buena precisión de los datos. Por razones estadísticas, es imposible asegurar la detección de un único fotón cada vez. Por otra parte, la incidencia de múltiples fotones en el detector también afectará a la estadística y generará medidas erróneas. Para asegurar que se registren los fotones de forma individual, es necesario mantener baja la tasa de emisión en comparación con la tasa de excitación ( $\leq 2\%$ ). El equipo construye un histograma de la distribución de los fotones en el tiempo, lo que es equivalente al decaimiento de fluorescencia.

Para determinar los parámetros cinéticos a partir del decaimiento de fluorescencia hay que tener en cuenta la respuesta temporal del instrumento. Para ello, se registra el perfil temporal de la fuente de excitación (*prompt*) utilizando una muestra que genere dispersión de la luz, colocando el monocromador de emisión a la misma longitud de onda que la fuente de excitación y manteniendo el resto de parámetros instrumentales igual que los utilizados en las medidas de la muestra en estudio. Esta respuesta instrumental corresponde a una función  $P(t)$ . El programa utilizado para el análisis de los resultados (*DAS6*, Horiba Jobin Yvon), combina los datos de la señal de la muestra ( $F(t)$ ) y  $P(t)$  mediante el método estadístico de convolución de mínimos cuadrados al calcular una función  $i(t)$ , que se ajusta a los datos del decaimiento (Ecuación 6.19, donde  $\otimes$  representa la convolución entre las funciones  $P(t)$  y  $i(t)$ ). Un buen ajuste genera un valor cercano a 1 del parámetro estadístico *chi* cuadrado ( $\chi^2$ ). El método de cálculo del programa permite el uso de funciones multiexponenciales de hasta 5 componentes, siendo monoexponenciales para los casos en los que hay una única especie emisora.

$$F(t) = P(t) \otimes i(t) \quad (\text{Ecuación 6.19})$$

### 6.2.3.1. Espectros de emisión con resolución temporal

Los espectros de emisión con resolución temporal (TRES) consisten en el registro de los decaimientos de la señal de emisión de fluorescencia en función del tiempo para un rango de  $\lambda_{em}$ , a una  $\lambda_{exc}$  fija y durante un tiempo de análisis determinado. Así, se genera una matriz de datos con tres variables: intensidad de emisión (cuentas), tiempo de decaimiento y longitud de onda de emisión.

Se utilizaron los NanoLEDs de 341 y 295 nm (Horiba Jobin Yvon) como fuente de excitación, el monocromador de emisión E (Figura 6.4) y el detector TBX-04 (H, Figura 6.4), que se encuentra trabajando en el modo TCSPC. El uso de este método permite discriminar especies con  $\tau_F$  diferentes, por lo que se pueden resolver sistemas de mezclas de fluoróforos que emiten en la misma región espectral pero con diferentes  $\tau_F$ . El análisis de la matriz global de datos se realizó con el programa del equipo (DAS6), que permite descomponer el espectro de emisión registrando en estado estacionario de una mezcla de fluoróforos como la suma de los espectros individuales obtenidos en el modo TRES y asociarlos con los  $\tau_F$  de cada especie en particular. En este método, al igual que en la sección anterior, los parámetros cinéticos de la señal se calculan mediante la convolución aplicando la Ecuación 6.19 para cada señal de decaimiento registrada en el rango de  $\lambda_{em}$  seleccionado en el espectro TRES. En este caso,  $I(t)$  se corresponde a la Ecuación 6.20,

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (\text{Ecuación 6.20})$$

Donde  $\alpha_i$  es el factor pre-exponencial y  $\tau_i$  es el tiempo de vida de cada especie. Los  $\tau_F$  calculados son valores promedio de todos los decaimientos registrados a cada  $\lambda_{em}$ , mientras que  $\alpha_i$  varía con  $\lambda_{em}$ , lo cual permite construir el espectro de emisión asociado a un determinado  $\tau_F$ .

### 6.2.4. Oxígeno molecular singlete ( $^1O_2$ )

El  $^1O_2$  es el estado excitado de menor energía del oxígeno molecular y es un agente fuertemente oxidante. El  $^1O_2$  se genera fotoquímicamente mediante procesos de transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada, conocida como fotosensibilizador, al  $O_2$ .<sup>11</sup> El sensibilizador ( $^1Sens$ ) absorbe radiación y se genera un estado electrónico excitado singlete ( $^1Sens^*$ ) (Reacción 6.2). Tras un cruce de sistemas se forma el estado electrónico excitado triplete ( $^3Sens^*$ ) de mayor tiempo de vida (Reacción 6.2).  $^3Sens^*$  puede transferir su exceso de energía hacia el oxígeno molecular ( $^3O_2$ ) disuelto en el medio, generando  $^1O_2$  y recuperando el  $^1Sens$  (Reacción 6.3). La desactivación de  $^1O_2$  puede ocurrir a través de diferentes vías. Las

Reacciones 6.4 y 6.5 muestran cómo el  $^1\text{O}_2$  puede desactivarse de forma no radiativa transfiriendo su exceso de energía al solvente o de forma radiativa, con la consecuente emisión de luz. En presencia de un desactivador de estados excitados (Q), puede darse tanto la desactivación química (Reacción 6.6) como la física (Reacción 6.7).



La detección de esta especie reactiva de oxígeno se fundamenta en la medida de su luminiscencia característica, con una  $\lambda_{\text{máx}}$  a 1270 nm, cuando se irradia de forma continua una solución que contiene  $^1\text{O}_2$ .<sup>12,13</sup> Como se mencionó en la *Sección 5.3.3*, en estos experimentos se trabaja en  $\text{D}_2\text{O}$  debido a que el tiempo de vida del  $^1\text{O}_2$  aumenta un orden de magnitud con respecto al mismo en  $\text{H}_2\text{O}$ . Esto incrementa considerablemente la sensibilidad del método obteniendo señales lumínicas superiores. Para la realización de las medidas de detección de  $^1\text{O}_2$  se utilizó como fuente de excitación la lámpara de Xe estacionaria (A-1, Figura 6.4), el monocromador de emisión de la región NIR (D, Figura 6.4) y el detector Hamamatsu H10330-45 (I, Figura 6.4).

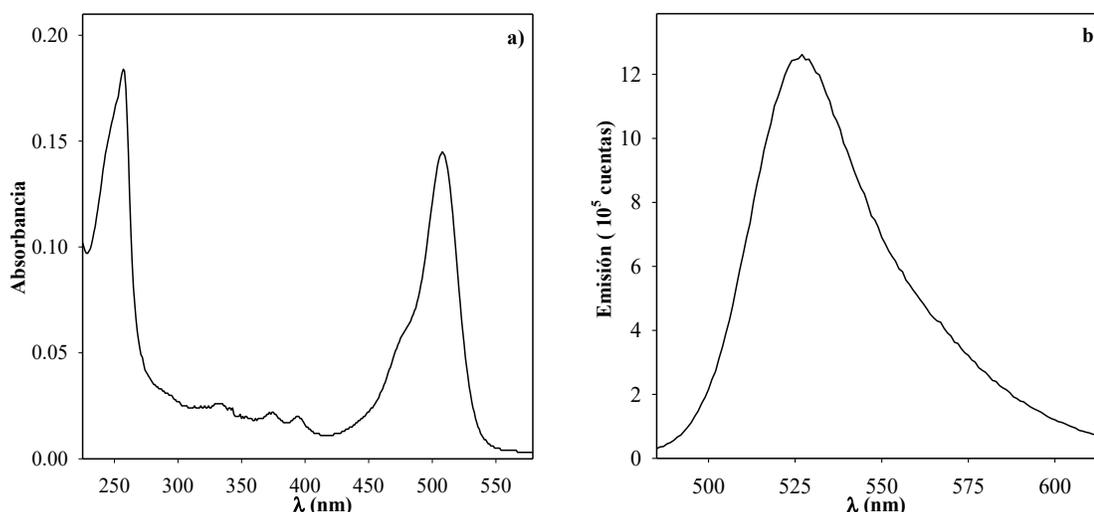
#### 6.2.4.1. Rendimiento cuántico de generación de $^1\text{O}_2$

El rendimiento cuántico de generación de  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_\Delta$ ) se puede definir como la cantidad de moléculas de  $^1\text{O}_2$  generadas por cada cuanto de luz absorbido por el fotosensibilizador.

$$[ ^1\text{O}_2 ] = \frac{\Phi_\Delta I_A}{kd + (kq + kr) [\text{Sens}]} \quad (\text{Ecuación 6.21})$$

En la Ecuación 6.21,  $I_A$  es la intensidad de radiación absorbida por el fotosensibilizador, y el producto de  $\Phi_\Delta$  con dicha intensidad hace referencia a la velocidad de generación de  $^1\text{O}_2$  (Reacciones 6.2 y 6.3). La contribución de la Reacción 6.5 se puede despreciar debido a que  $k_e$  es mucho menor que  $k_d$ . Si se considera que el propio sensibilizador puede actuar como una especie desactivadora de estados excitados, se deben tener en cuenta las Reacciones 6.6 y 6.7, donde se ha sustituido “Q” por “Sens”.

Para la determinación del  $\Phi_\Delta$  de Tyr<sub>2</sub> se recurrió a un método químico, utilizando una sonda fluorescente denominada SOSG, por sus siglas en inglés *Singlet Oxygen Sensor Green*. Se utilizó este método porque Tyr<sub>2</sub> se consume durante la detección de la emisión del  $^1\text{O}_2$  en la región del NIR. El método de detección consiste en un sistema de dos componentes: una molécula unida un cromóforo emisor. Previo a la reacción con  $^1\text{O}_2$ , la emisión del cromóforo se encuentra desactivada por una transferencia de electrones desde la molécula unida adyacente. Luego de la reacción, se forma un endoperóxido (SOSG-EP), el cual deja de ser un donador de electrones eficiente y por lo tanto, el cromóforo emite.<sup>14,15,16</sup> Si bien la estructura real de SOSG no ha sido divulgada, por similitud de su espectro de absorción con otras sondas, se asume que está compuesto por una fluoresceína unida a un derivado de dimetilantraceno.<sup>16</sup> El espectro de absorción de SOSG presentan dos bandas principales, una centrada a 258 nm y la otra a 507 nm (Figura 6.5.a).<sup>14</sup> Al excitar la banda de menor energía, se obtiene un espectro de emisión con un máximo en 525 nm (Figura 6.5.b). Cabe aclarar que SOSG produce  $^1\text{O}_2$  cuando se expone a radiación UV o visible, con un  $\Phi_\Delta$  de  $0,006 \pm 0,002$ , al excitar a 355 nm en una mezcla  $\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ .<sup>11</sup>



**Figura 6.5.** Espectros de absorción (a) y de emisión (b) de soluciones acuosas alcalinas de SOSG (0,63 mg/L).  $\lambda_{exc}=470$  nm, pH= 9,5.

Se utilizó Ptr como fotosensibilizador de referencia de  $^1O_2$  ( $\Phi_{\Delta, Ptr} = 0,30$ )<sup>17</sup> y a partir de la Ecuación 6.22, se pudo calcular el  $\Phi_{\Delta}$  de Tyr<sub>2</sub>:

$$\Phi_{\Delta, Tyr_2} = \frac{\left(\frac{d[SOSG-EP]}{dt}\right)_{0, Tyr_2}}{\left(\frac{d[SOSG-EP]}{dt}\right)_{0, Ptr}} \Phi_{\Delta, Ptr} \quad (\text{Ecuación 6.22})$$

donde ( $[d[SOSG-EP]/dt]_{0, Tyr_2}$ ) y ( $[d[SOSG-EP]/dt]_{0, Ptr}$ ) son las velocidades iniciales de producción de SOSG-EP de soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> y Ptr, respectivamente y  $\Phi_{\Delta, Ptr}$  es el rendimiento cuántico de generación de  $^1O_2$  por Ptr. Se corrigieron los espectros de emisión obtenidos tanto para Tyr<sub>2</sub> como para Ptr al substrar la emisión promedio de SOSG en agua, obtenida para los distintos tiempos de irradiación.

### 6.3. Fotólisis de destello láser

La técnica de fotólisis de destello láser (LFP, por sus siglas en inglés *Laser Flash Photolysis*) es una técnica con resolución temporal que se utiliza para la iniciación y el estudio de procesos fotoquímicos. Los experimentos de LFP permiten la observación directa de especies transitorias para su estudio espectroscópico y cinético. Por lo general, se aplica un pulso de luz intenso y de corta duración para formar una concentración suficiente de la especie transitoria de interés y así poder observar sus propiedades espectroscópicas.<sup>18</sup>

#### 6.3.1. Fundamento

En las diferentes etapas que se dan en los experimentos de LFP se observan distintas transiciones entre los estados excitados (Figura 6.6). Estas transiciones son las responsables de la variación de la intensidad de la absorbancia. Inicialmente, la molécula se encuentra en su estado de mínima energía, es decir, en el estado fundamental ( $S_0$ ). Tras la excitación con el pulso del láser, se genera una alta población de especies en el estado excitado ( $S_1$ ). A continuación, una parte de esa población sufre un ISC, generando los estados excitados triplete ( $T_1$ ). Las moléculas en estado  $T_1$  también pueden absorber radiación, es decir, presentan un espectro de absorción ( $T_1 \rightarrow T_n$ ) diferente al de las moléculas en el estado fundamental ( $S_0 \rightarrow S_n$ ). Por lo general, los sistemas de LFP son espectrómetros de haz simple pero se comportan como instrumentos de

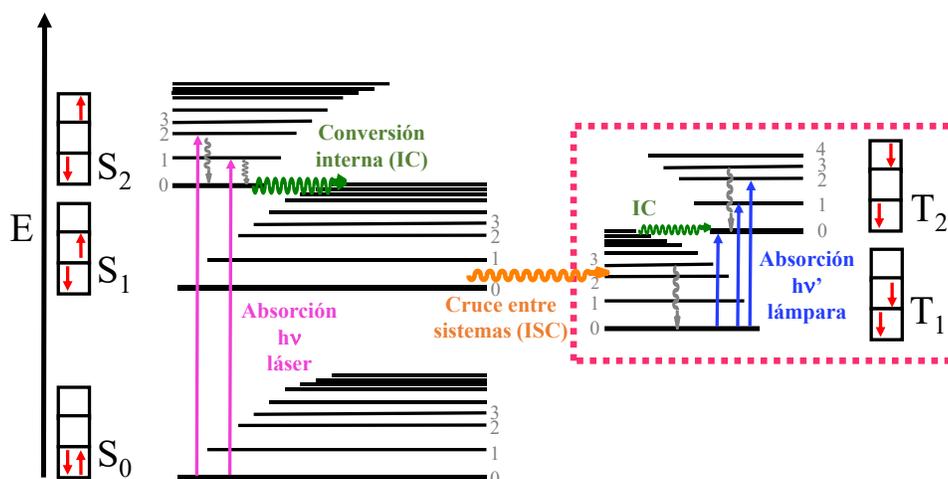
doble haz. El haz de referencia se separa del haz de la muestra en el tiempo, en lugar de en el espacio. De este modo, la señal de referencia se adquiere antes de la excitación con el láser y se denomina  $P_0$ .  $P_t$  es la señal luego de un tiempo “t”. La variación de la absorbancia a un tiempo “t”, después del pulso del láser, vendrá dada por la siguiente ecuación:

$$\Delta A = -\log\left(\frac{P_t}{P_0}\right) \quad (\text{Ecuación 6.23})$$

En un sistema simple, donde solo se genera el estado triplete, la relación entre  $\Delta A$  y la concentración está dada por la Ecuación 6.24:

$$\Delta A = -\log\left(\frac{P_t}{P_0}\right) = \Delta\varepsilon C_T l \quad (\text{Ecuación 6.24})$$

Donde  $\Delta\varepsilon$  es la diferencia entre los coeficientes de absorción de los estados triplete y fundamental,  $C_T$  es la concentración del transiente a un tiempo “t” y  $l$  es el camino óptico.

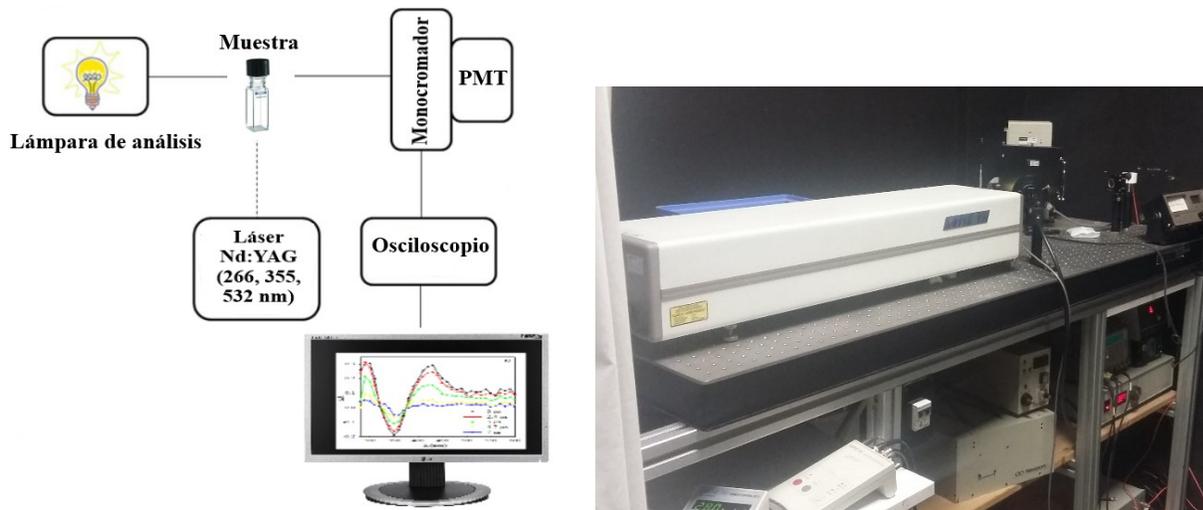


**Figura 6.6.** Diagrama de Jablonski modificado. El recuadro punteado resalta la transición triplete-triplete que tiene lugar durante los experimentos de LFP.

### 6.3.2. Descripción del equipo

Los experimentos de LFP se realizaron con un equipo Lotis TII (Figura 6.7) acoplado a un osciloscopio para la adquisición de las señales. El equipo cuenta con un láser de Nd:YAG, cuyo haz de salida fundamental de 1064 nm se triplica generando tres armónicos. En todos los experimentos se excitó con el tercer armónico a 355 nm. La duración del pulso de láser fue de ~10 ns y una energía de 21 mJ/pulso. Los haces de luz del láser y de la lámpara de análisis se disponen a 90°, tal y como se ve en el Figura 6.7. La lámpara de análisis es una lámpara de Xe de 150 W libre de ozono, cuyo haz se enfoca en un monocromador tras atravesar la muestra. Por

último, el haz llega al fotomultiplicador para registrar la señal. Las señales se adquirieron como el promedio de 3 pulsos con el osciloscopio y se transfirieron a una computadora para su posterior análisis.



**Figura 6.7.** Esquema y fotografía del equipo LFP utilizado en este trabajo.

### 6.3.3. Decaimientos y espectros de especies transitorias

Para los ensayos se utilizaron celdas de fluorescencia de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se prepararon mezclas acuosas de Ptr y los compuestos de estudio con una absorbancia para Ptr de 0,4 a la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc} = 355$  nm). En todos los casos se trabajó a pH 5,5-6,0 y en condiciones anaeróbicas para el caso de Tyr libre, luego de burbujear durante 20 minutos  $N_2$ . Se registraron los espectros de absorbancia antes y después de cada medida para controlar que no hubiera fotodegradación de la muestra ni cambios de pH como consecuencia del burbujeo.

Se realizaron dos tipos de medidas. En una de ellas se realizaba un registro de la señal en función del tiempo a una longitud de onda determinada (decaimiento), mientras que en la otra, se registraba la señal en función del tiempo para un determinado rango de longitudes de onda con el fin de construir el espectro de absorbancia de la especie transitoria. Para el estudio de la desactivación del estado excitado triplete de Ptr ( $^3Ptr^*$ ), se preparó una solución madre de Ptr y se le agregaron de a microlitros el sustrato (Tyr o HSA), obteniéndose mezclas con diferentes concentraciones del sustrato. Para los estudios cinéticos de especies radicalarias, se utilizaron mezclas que contenían Ptr y el sustrato (Tyr o DABCO), las cuales fueron burbujeadas previamente con  $N_2$  durante 20 minutos. Se registraron los decaimientos de la señal luego del disparo del láser, a distintas  $\lambda$ , comprendidas entre 280 y 600 nm (en intervalos constantes de 10

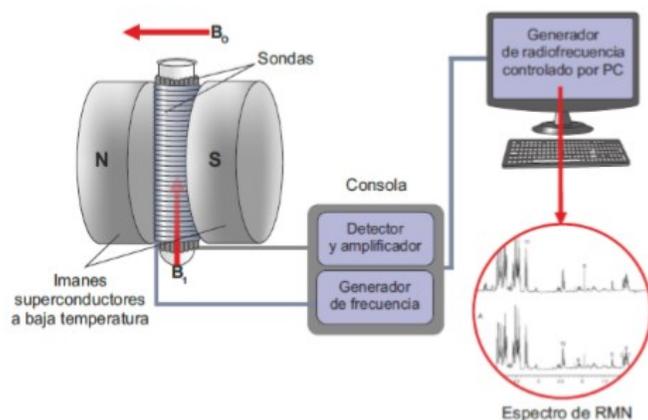
nm). Se registró en forma rutinaria un promedio de 3 señales para aumentar la relación señal-ruido y se utilizaron escalas de tiempo diferentes para analizar las diferentes especies transitorias.

#### 6.4. Resonancia magnética nuclear

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) se utiliza principalmente para identificar y analizar compuestos orgánicos. Esta técnica sólo sirve para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos), como por ejemplo de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ . Estos núcleos poseen un espín y son activos magnéticamente, por lo cual poseen un movimiento de rotación sobre su eje, comportándose como pequeños imanes. En ausencia de campo magnético estos espines se orientan al azar, pero al aplicar un campo, los núcleos con espines positivos se orientan en dirección del campo (con mínima energía, espín  $\alpha$ ), mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético (en estado de mayor energía, espín  $\beta$ ). La diferencia  $\Delta E$  entre estos dos estados de energía depende de la fuerza del campo magnético aplicado ( $B_0$ ): a mayor campo, mayor diferencia de energía entre los dos estados.

Cuando una muestra es irradiada con radiación electromagnética de radiofrecuencia apropiada, es decir la energía aplicada es exactamente igual a la energía existente entre los dos estados de energía, los núcleos absorben la radiación y pasan del estado de menor al de mayor energía. Así, los núcleos están en resonancia con el campo aplicado. Luego, debe restablecerse la condición de equilibrio entre los niveles de energía, es decir debe producirse la relajación. Este fenómeno es detectado por el equipo y las señales son registradas en un gráfico de frecuencias vs. intensidad, llamado transformada de Fourier (FT-RMN).

Los núcleos se encuentran rodeados de electrones que se mueven generando un campo magnético inducido que se opone al campo magnético externo. De esta manera, el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo aplicado y, por lo tanto, se dice que el núcleo está protegido o apantallado. Esto hace que los protones con entornos electrónicos diferentes, se encuentran desigualmente protegidos o apantallados, resuenen a distintas frecuencias, y por lo tanto, tengan distintos desplazamientos químicos (con unidades de  $\delta$  ó partes por millón (ppm)). Como resultado se obtiene un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos genera una señal de RMN, según el distinto apantallamiento de los núcleos (Figura 6.8).



**Figura 6.8.** Representación esquemática de un espectrómetro de RMN. Extraído de referencia 19.

Es difícil medir con exactitud el campo magnético al que un protón absorbe y distinguir protones individuales, ya que las absorciones varían muy poco. Por lo tanto, se utiliza un compuesto de referencia y se determina la diferencia de intensidades de campo magnético necesario para la resonancia de los protones de la muestra y de la referencia. Para esto se utiliza tetrametilsilano (TMS,  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ ), donde al ser el silicio menos electronegativo que el carbono, los metilos del TMS están fuertemente apantallados. De esta manera, estos protones resuenan a mayores campos que el resto de los protones unidos a carbono u otro elemento y así las señales de RMN aparecen a campos más bajos. Generalmente se utiliza la escala  $\delta$  (delta) para el desplazamiento químico, en la que la absorción del TMS se define como  $0.00 \delta$ . La mayoría de los protones absorben a menores campos y la escala  $\delta$  aumenta hacia campos menores. Las señales de H varían entre  $0$  y  $12 \delta$ . Por otro lado, el intervalo de frecuencias de resonancia de los carbonos presentes en compuestos orgánicos es mucho mayor que la de los protones. Abarca la zona entre  $0$  - $200 \delta$ , medidos frente a la referencia TMS.

Uno de los problemas que se plantea en la espectroscopía de RMN es la presencia de núcleos con baja abundancia natural o con valores de constante giromagnéticas ( $\gamma$ ) poco favorables. Los valores de  $\gamma$  son importantes en espectroscopía RMN, ya que la sensibilidad de respuesta de un núcleo en el experimento depende de esta magnitud. Cuando  $\gamma$  es grande se dice que el núcleo es sensible (es decir, fácil de observar) y en caso contrario se dice que el núcleo es insensible.<sup>20</sup> Teniendo en cuenta que la intensidad es proporcional  $\gamma$  y que los núcleos de  $^{13}\text{C}$  poseen un valor de  $\gamma$  cuatro veces más chica que la correspondiente al protón, sus señales en los espectros son poco intensas. Por este motivo y por la baja concentración de nuestras soluciones

de Tyr<sub>2</sub>, no se pudo registrar el <sup>13</sup>C-RMN, por lo que se realizaron experimentos DEPT y espectros RMN bidimensionales con el fin de complementar el análisis. El experimento DEPT permite determinar las multiplicidades de un átomo de carbono, logrando diferenciar CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> y CH a partir de pulsos con distintos ángulos (45, 90 y 135°). Con respecto a los espectros bidimensionales, los espectros homonucleares COSY, por sus siglas en inglés *Correlated Spectroscopy*, correlacionan las frecuencias de los desplazamientos químicos entre núcleos mutuamente acoplados (J(H,H)). En los espectros heteronucleares J(C,H), las señales del <sup>13</sup>C se modulan con las frecuencias de los desplazamientos químicos de los protones con los que se acoplan. Se registró el espectro HSQC (por sus siglas en inglés, *Heteronuclear Single Quantum Correlation Experiments*), que permite detectar los protones unidos directamente a los carbonos (por un enlace J1), mientras que el espectro HMBC (por sus siglas en inglés, *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy*, permite detectar a los protones que se encuentran a 2 o más enlaces de distancia de los carbonos (J2 o más).

Se utilizó agua deuterada (D<sub>2</sub>O) como solvente para registrar los espectros: <sup>1</sup>H-RMN; <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, DEPT; HSQC y HMBC. Se disolvió el sólido de Tyr<sub>2</sub> obtenido luego de liofilizar las muestras aisladas (Capítulo 9) y se llevó a pH alcalino (pH ~ 10,5). Luego se colocaron 0,7 mL de la solución en un tubo de RMN de 5 mm de diámetro y se midieron los distintos espectros. Cabe destacar que al utilizar D<sub>2</sub>O como solvente, solo se detectan los protones no intercambiables con D (deuterio), es decir los unidos a C (no así, los unidos a N u O). Se utilizó un espectrómetro Bruker AV (400 MHz), equipado con una sonda BBI. Se utilizó la señal del solvente (D<sub>2</sub>O) como referencia para determinar los desplazamientos (δ).

### **Bibliografía**

- <sup>1</sup>A.H. Thomas, “*Fotoquímica del ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa*” Tesis Doctoral, 2001.
- <sup>2</sup>D.A. Skoog; Leary, “*Análisis instrumental*”, 4ta Ed. McGraw Hill, 1997.
- <sup>3</sup>G.W. Ewing, “*Instrumentales de análisis químico*”, Ed. Mc Graw Hill, 1978.
- <sup>4</sup>D. E. Moore, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **43**, 175-180, 1998.
- <sup>5</sup>R. Kuciel, *et.al*, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **32**, 183-186, 2004.
- <sup>6</sup>J. M. McCord, *et.al*, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6056-6063, 1969.
- <sup>7</sup>S. D. Picker, *et.al*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **228**, 155-158, 1984.

- <sup>8</sup> T. W. Kirby, *et.al*, *Analytical Biochemistry*, **127**, 435-440, 1982.
- <sup>9</sup> J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, Chapter 3, 2006.
- <sup>10</sup> S. R. Meech, D. Phillips, *J. Photochem.*, **23**, 193-217, 1983.
- <sup>11</sup> C. Foote, *Photochem.Photobiol.*, **54**, 659-659, 1991.
- <sup>12</sup> A.A. Krasnovsky Jr, *Biophysics*, **24**, 769, 1979.
- <sup>13</sup> A.U. Kahn, *Chem. Phys. Lett.*, **72**, 112, 1980.
- <sup>14</sup> A. Gollmer, *et.al*, *Photochem Photobiol.*, **87**, 671-679, 2011.
- <sup>15</sup> S. Kim, *et.al*, *J. Phys. Chem. B*, **117**(45), 13985-13992, 2013.
- <sup>16</sup> X. Ragás, *et.al*, *Chem. Commun.*, 2920-2922, 2009.
- <sup>17</sup> C. Lorente, A. H. Thomas, *Acc. Chem. Res.*, **39** (6), 395-402, 2006.
- <sup>18</sup> J. Bourdelande, *et.al*, *Glosario de términos usados en fotoquímica*, 1999.
- <sup>19</sup> B. Córscico, “*Análisis estructural y funcional de Macromoléculas*”, Edulp, Capítulo 4, 2014.
- <sup>20</sup> J.J. Giménez Martínez; J.M. Expósito López, “*RMN para orgánicos*”, Universidad de Almería, 1998.

# CAPÍTULO 7

## TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

En este capítulo, se detallan las diferentes técnicas cromatográficas empleadas en el análisis de las soluciones irradiadas. Las distintas técnicas incluyeron: i) cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de arreglo de diodos (PDA) y un detector de fluorescencia (FL), ii) cromatografía líquida de rápida resolución (FLPC) acoplada a un detector de luz dispersa y iii) cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (UPLC-MS).

### 7.1. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica que se utiliza para separar componentes de una mezcla basándose en distintos tipos de interacciones químicas o físicas generadas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica (fase estacionaria). La muestra pasa a través de la columna mediante el bombeo de la fase móvil a alta presión, ya que la fase estacionaria está compuesta por partículas pequeñas densamente empaquetadas, que ofrecen gran resistencia al flujo de la fase móvil. El tiempo que un compuesto tarda en ser eluido de la columna se conoce como tiempo de retención ( $t_{ret}$ ), el cual depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. Se denomina cromatograma a la gráfica de la señal en función del tiempo de corrida. El valor de la señal viene dado en unidades arbitrarias (u.a). Existe una gran variedad de propiedades que se pueden registrar tras la separación de los componentes de la muestra, como por ejemplo, la absorbancia, la fluorescencia, el índice de refracción, dispersión de luz, etc. En este trabajo de tesis doctoral se utilizó esta técnica para obtener los perfiles de concentración, tanto de reactivos como de productos, y para realizar la identificación de los productos generados durante las reacciones fotoquímicas. También se utilizó para el aislamiento de Tyr<sub>2</sub> y de las fracciones proteicas de HSA y Ub.

Para estas medidas se empleó un HPLC *Shimadzu Prominence* LC-20A (Figura 7.1). Este equipo cuenta con un módulo de distribución de solventes (LC-20AT), un desgasificador en línea

(DGU-20A5), un módulo controlador (CBM-20), un inyector automático (SIL-20A HT), un horno (CTO-10AS-VP) y un colector (FRC-10A). Además, tiene acoplados dos sistemas de detección. El primero, es un detector espectrofotométrico UV-Visible de arreglo de diodos (PDA, SPD-M20A, *Shimadzu*) que permite monitorear todas las longitudes de onda entre 200 y 800 nm. El segundo, es un detector de emisión de fluorescencia (FL, RF-M20A) que permite fijar la longitud de onda de excitación entre 300 y 600 nm, y hacer un registro a dos longitudes de onda de emisión de forma simultánea en un rango comprendido entre 300 y 800 nm. El programa de adquisición de datos (*LC Solution*) permite registrar y analizar las señales obtenidas con ambos detectores, así como extraer los espectros de absorción de cada uno de los picos cromatográficos obtenidos con el detector PDA.



**Figura 7.1.** Fotografía del equipo *Shimadzu Prominence LC-20A*. A: computadora y *software* para el análisis de los datos (*LC Solution*), B: desgasificador, C: módulo de distribución de disolventes, D: módulo controlador, E: inyector automático, F: horno y columna, G: colector de muestras, H: detector UV/Vis (PDA), I: detector de fluorescencia (FL).

Para la síntesis, aislamiento y para el estudio de la fotodegradación de Tyr<sub>2</sub>, se trabajó con tres columnas de fase reversa:

1. Columna de fase reversa analítica Synergi 4  $\mu\text{m}$  POLAR-RP 80 Å (150 x 4,6 mm, Phenomenex). La fase estacionaria contiene grupos fenilo unidos mediante una función éter a las partículas con protección hidrofílica, que permiten maximizar la retención y la selectividad de los analitos polares y aromáticos. La principal ventaja de esta columna es su alta estabilidad con fases móviles acuosas. Se trabajó con un

método isocrático a un flujo de 0,6 mL/min con 100 % ácido fórmico 25 mM a pH 3,3.

2. Columna de fase reversa semipreparativa Synergi 4  $\mu\text{m}$  POLAR-RP 80 Å (250 x 10,0 mm, Phenomenex), la cual posee la misma fase estacionaria que la Synergi analítica, pero permite trabajar a flujos más altos y aumentar el volumen de inyección. Se trabajó con un método isocrático a un flujo de 2,5 mL/min con 100 % H<sub>2</sub>O a pH 3,0.
3. Columna Jupiter 4  $\mu\text{m}$  Proteo 90 Å (150 x 4,6 mm, Phenomenex), la cual posee una fase estacionaria de sílice de alta superficie, lo que proporciona alta eficiencia y una fase C12 ligada, que permite una excelente sensibilidad. Su principal ventaja se encuentra en que es una columna con mayor capacidad de pico y resolución para la separación de péptidos y proteínas, en mezclas acuosas y orgánicas. Se trabajó con un método isocrático a un flujo de 0,6 mL/min con 100 % acetato de amonio 1 y 10 mM a pH 6,0 y 6,4, respectivamente.

En los estudios con proteínas se trabajó con una columna de exclusión molecular BioSep-SEC-s2000 (sílice, 300 x 7,8 mm, 14,5  $\mu\text{m}$ , *Phenomenex*). La fase estacionaria cuenta con un gel de sílice con baja adsorción que permite una alta recuperación de la muestra. La fase móvil se modificó en función del objetivo del estudio. Se utilizó *buffer* TRIS 20 mM con NaCl 50 mM a pH 7,0 o fosfato diácido de potasio a pH 4,5 con un flujo de 0,6 mL/min. En algunos casos, para el aislamiento de distintas fracciones por HPLC, se utilizó como solvente de elución H<sub>2</sub>O con NaCl 50 mM a pH 7,0.

## 7.2. Cromatografía líquida de rápida resolución

La cromatografía líquida de rápida resolución (FLPC) posee el mismo principio de separación que el HPLC, sin embargo, el FLPC trabaja a presiones más bajas (un orden de magnitud menor). Esta técnica se empleó para el estudio de la oligomerización de HSA. Para ello, se utilizó una columna Superdex-200 (GE Healthcare) de exclusión molecular, equilibrada en el buffer TRIS 20 mM y NaCl 100 mM a pH 7,0. El FLPC utilizado consiste en la columna acoplada a un detector *Mini Dawn static light scattering* (LS, de Wyatt) y a un detector UV (Jasco UV 2075plus). El equipo *Mini Dawn* tiene un láser que emite luz a 690 nm e incide sobre la muestra que pasa por este módulo. La luz dispersada a 90° es redireccionada por fibra óptica a un módulo de dispersión de luz cuasi elástica (Wyatt). Las fluctuaciones temporales en la

intensidad de luz dispersada son registradas por este módulo y cuantificadas utilizando una función de correlación de segundo orden.<sup>1</sup> Las masas moleculares y la distribución de los radios hidrodinámicos fueron calculados utilizando el *software* ASTRA, aplicando la Ecuación 7.1.<sup>2</sup>

$$\frac{K^*c}{R(\theta,c)} = \frac{1}{M_w \cdot P(\theta)} + 2A_2c \quad (\text{Ecuación 7.1})$$

donde  $R(\theta)$  es el exceso de intensidad de luz dispersa en el ángulo  $\theta$ ,  $c$  es la concentración (g/mL),  $M_w$  es el peso molecular promedio,  $A_2$  es el segundo coeficiente del virial,  $P(\theta)$  es una función que describe la dependencia angular de la luz dispersa,  $K^*$  es un parámetro óptico definido como  $4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 / (\lambda_0^4 N_A)$ ;  $n$  es el índice de refracción del solvente,  $dn/dc$  es el aumento del índice de refracción,  $N_A$  es el número de Avogadro y  $\lambda_0$  es la longitud de onda de la luz dispersa.

### 7.3. Cromatografía líquida de ultra-rápida resolución con detección por espectrometría de masas

El fundamento de la cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) es el mismo que el de HPLC. La principal diferencia entre ambas técnicas, es que el UPLC presenta un nuevo diseño de columnas (con una nueva tecnología de partícula, de tamaño menor a 2  $\mu\text{m}$ ), de inyectores, de bombas y de detectores que permite trabajar a presiones muy elevadas. El resultado son picos cromatográficos más estrechos y más concentrados que los obtenidos con HPLC.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que permite generar iones de compuestos orgánicos o inorgánicos a partir de distintos métodos de ionización, la separación de los iones por su relación de masa-carga ( $m/z$ ) y la detección de los mismos tanto cualitativa como cuantitativamente por sus respectivas  $m/z$  y abundancia.<sup>2</sup> En primer lugar hay que ionizar las moléculas para obtener los iones en fase gaseosa. Estos iones son acelerados hacia un analizador y separados en función de su  $m/z$  mediante la aplicación de campos magnéticos o eléctricos. Cuando los iones llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, amplificada y enviada a una computadora para su posterior análisis.

La cromatografía líquida puede usarse para la separación de analitos polares con baja volatilidad antes del análisis por espectroscopía de masas. Usualmente, se emplean métodos de ionización que operen a presión atmosférica cuando se acopla un cromatógrafo líquido a un

espectrómetro de masas.<sup>2</sup> Este último tiene que ser capaz de volatilizar los compuestos, generar los correspondientes iones, separarlos en función de su relación  $m/z$  y finalmente, detectarlos. El equipo cuenta con diferentes partes: el sistema de entrada que volatiliza las muestras e introduce una pequeña cantidad de las mismas en el equipo y la fuente de ionización, que convierte los componentes de la muestra en iones. Durante este trabajo de tesis se utilizó un equipo que cuenta con una cámara de ionización *electrospray* (ESI). En esta técnica de ionización a presión atmosférica, la solución de la muestra pasa a través de un electrodo de punta al que se le aplica campo eléctrico, que lleva a que tanto el analito como el solvente pasen al estado gaseoso, creando gotas cargadas con la misma polaridad. La nube de macrogotas cargadas, sufren una disminución de su volumen con la evaporación del solvente, aumentando la concentración de carga en la superficie de la gota. Cuando la repulsión coulombica supera la tensión superficial de la gota, explota generando gotas de menor tamaño (explosión de Raleigh). Este proceso de evaporación del solvente con la consecuente disminución de volumen y aumento de carga hasta generar la explosión de la gota se repite hasta obtener el analito puro cargado. Para poder detectar estos iones de forma individual, es necesario separarlos con un analizador de masas. En este caso se contó con un analizador cuadrupolo (Q) acoplado a un de tiempo de vuelo (Tof), ofreciendo una gran precisión en las medidas de masa. El cuadrupolo consiste en cuatro electrodos de barra con forma cilíndrica o hiperbólica, dispuestos en configuración cuadrada. Los iones de la fuente son acelerados por un potencial e introducidos en el espacio entre las barras. Cada par de barras opuestas se conectan a un polo positivo y a un polo negativo y se aplica un potencial de voltaje variable compuesto por una componente de corriente directa y otra de corriente alterna. Esto hace que los iones dentro de un intervalo limitado de valores de  $m/z$ , circulen con una trayectoria rectilínea (en el eje  $z$ ) y lleguen al detector. Este analizador actúa como un filtro de iones. El analizador Tof se basa en que los iones acelerados por un campo eléctrico adquieren distintas velocidades en función del valor de su relación  $m/z$ , y por lo tanto, tardan distinto tiempo en recorrer una distancia determinada. Este analizador presenta una alta sensibilidad y es capaz de detectar un valor  $m/z$  con incertidumbre en el cuarto decimal.

La técnica de MS puede ser utilizada en tándem, es decir, con una segunda etapa de análisis dentro del mismo experimento. Esto permite estudiar selectivamente iones específicos en una mezcla compleja para obtener información estructural sobre ese ion. Acoplando dos analizadores, separados por una cámara de colisiones se puede obtener más información de la molécula. El

primer analizador se usa para seleccionar el ion de interés. Este ion se hace pasar luego hacia la cámara de colisiones, la cual se encuentra presurizada con un gas inerte. La colisión del ion con los átomos en la cámara puede inducir la disociación del ion. El ion original se le llama “ion precursor” y a los iones disociados se les conoce como “iones producidos”. Estos iones producidos luego se analizan en el segundo espectrómetro de masas dando lugar a un espectro de masas de iones producidos del ion original. Los espectros MS/MS proporcionan información estructural mediante el establecimiento de relaciones entre los iones precursores y sus fragmentos producidos por las colisiones.

En este trabajo se utilizó un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS), Xevo G2QTof (*Waters*), que se encuentra acoplado a un UPLC (*Acquity, Waters*) (Figura 7.2). El espectrómetro de masas operó tanto en modo negativo (ESI<sup>-</sup>) como en modo positivo (ESI<sup>+</sup>), sin embargo, se obtuvo mejor resolución de los datos con ESI<sup>-</sup>, por lo que se continuo operando en este modo. El análisis de los resultados se realizó con el programa Masslynx 4.1 (*Waters*). Este equipo, además de los detectores de MS en tándem, posee acoplado un detector UV-vis (*Acquity TUV*) que trabaja a una longitud de onda fija. Los cromatogramas obtenidos se corresponden a gráficas de absorbancia en función del tiempo de corrida. A su vez, con el detector de MS, se puede generar dos tipos de cromatogramas de intensidad de la señal detectada en función del tipo de corrida: TIC (por sus siglas en inglés, “*Total Ion Chromatogram*”), correspondiente a la suma de las intensidades de todo el rango de masas detectadas; y XIC (“*Extracted Ion Chromatogram*”), correspondiente a la intensidad de un valor de  $m/z$  fijo.

Para asignar una fórmula química a las señales obtenidas, se calcula la masa correspondiente a dicha fórmula utilizando el programa *Chem.Sketch* (como [M-H]<sup>-</sup> al operar con ESI<sup>-</sup>) o utilizando la página [www.chemcalc.org](http://www.chemcalc.org). Luego, se la compara con la masa observada y se calcula el error (ppm), el cual debe estar comprendido entre  $\pm 5$  ppm. Para calcular el error se utilizó la Ecuación 7.2:

$$\Delta m = m_{exp} - m_{cal} \quad (\text{en Da})$$

$$\Delta m = \frac{m_{exp} - m_{cal}}{m_{cal}} \times 10^6 \quad (\text{en ppm}) \quad (\text{Ecuación 7.2})$$

Donde  $m_{exp}$  es el valor de masa obtenida y  $m_{cal}$  es la masa calculada.<sup>3</sup>

Para el estudio de Tyr<sub>2</sub> y sus fotoproductos, se utilizó una columna Acquity UPLC BEH Phenyl (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm, *Waters*) con un método isocrático a un flujo de 0,2 mL/min con 99 % ácido fórmico ((0,1 % v/v) y 1 % ACN.



**Figura 7.2.** Fotografía del equipo UPLC-QToF-MS.

### 7.3.1. Nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

El analizador convencional ESI se redujo a un analizador que trabaja a flujo más bajo, del orden nanolitros (nL/min), por lo que se denomina nano-ESI. Las operaciones con flujos más bajos mejoran los límites de detección de esta técnica.<sup>4,5</sup> Una explicación de este fenómeno es que, al disminuir el flujo de líquido, la relación entre el volumen de líquido que entra en contacto con la superficie de la punta del capilar y el volumen total de líquido que fluye a través del capilar por unidad de tiempo, aumenta. Con el aumento de esta relación, aumenta la carga suministrada al líquido. Con esta técnica, se han logrado detectar concentraciones de proteínas del orden del sub-femtomolar.<sup>6</sup> La combinación del uso de flujos bajos y de capilares chicos, aumenta la eficiencia de ionización y resulta en una mayor sensibilidad. En general, es más difícil ionizar soluciones acuosas por *electrospray* que aquellas que contienen solventes orgánicos como metanol o ACN. Nano-ESI permite trabajar con solventes acuosos polares, incluso con agua pura, tanto en modo positivo como negativo, y tolera mayores concentraciones de sales presentes en los *buffers*. Con respecto al uso de capilares con puntas más estrechas, con diámetros entre 1-4  $\mu\text{M}$ , permite generar gotas más chicas, de 200 nm de diámetro, a diferencia de las generadas con el ESI convencional, que poseen un diámetro de 1-2  $\mu\text{M}$ .

El nano-ESI se puede acoplar a un HPLC, utilizando nano-columnas (nano LC-MS). Por lo tanto, las muestras de Ub se analizaron con un nanoLC-MS (*Thermo Scientific QExactive Mass Spectrometer*) acoplado a un nanoHPLC EASY-nLC 1000 (*Thermo Scientific*). Se utilizó

una columna de fase reversa C18 (*Easy-Spray Column PepMap RSLC (P/N ES801)*, 2  $\mu\text{m}$ , 100A, 50  $\mu\text{m}$  x 150 mm), que permite la separación de proteínas con alta resolución. Se trabajó a un flujo de 300 nL/min y el solvente B varió desde 7 % (5 min) a 35% (120 min). Como solvente A se utilizó ácido fórmico (0,1%) en agua y como solvente B ácido fórmico (0,1%) en ACN. El equipo de masas consta con una celda HCD (por sus siglas en inglés, *High Collision Dissociation Cell*) para los experimentos de MS/MS (fragmentación) y un analizador *Orbitrap (Q-Exactive-Thermo Scientific Germany)*. Para la ionización por electrospray se utilizó un voltaje de 3,5 kV (*Thermo Scientific, EASY-SPRAY*). Para la adquisición de datos se utilizó el programa *XCalibur 3.0.63 (Thermo Scientific)*. El rango de masas analizado estuvo comprendido entre 400-2000  $m/z$ , con una resolución de 70000 a 400  $m/z$  y las doce señales más intensas de iones en cada ciclo, se aislaron secuencialmente, se fragmentaron en la cámara HCD y se midieron en el analizador Orbitrap.

#### 7.4. Columnas *Sephadex*

Para la purificación de las proteínas, se emplearon columnas de *sephadex (disposable PD10 desalting columns sephadex G25, Figura 7.3)*. Estas columnas desechables pre-envasadas contienen partículas de *Sephadex G25* (85 – 260  $\mu\text{M}$ ). Están diseñadas para purificar de forma rápida y sencilla moléculas de alto peso molecular (> 5000  $M_r$ ). Se basan en los principios de cromatografía de exclusión molecular, es decir, las moléculas con un tamaño mayor que los poros de la matriz de *sephadex* atraviesan rápidamente la columna y eluyen primero, mientras que las de menor tamaño, penetran en los poros y salen más tarde. En este trabajo de tesis se utilizaron para separar las distintas proteínas (HSA, Ub y  $\alpha$ -HlyA), intactas o modificadas, de Ptr.



**Figura 7.3.** Columnas de sephadex (PD10)

El modo de uso de las columnas de *sephadex* se detalla a continuación:

- 1) Cortar la parte inferior, retirar la tapa superior y colocar las columnas en el soporte. Dejar que gotee el exceso de líquido.
- 2) Equilibrar la columna con 25 mL del solvente de elución, en nuestro caso H<sub>2</sub>O. Desechar el líquido en la bandeja de descarte.
- 3) Desnaturalizar las muestras con ClG 3 M y cuando no quede solución en la columna, agregar 2,5 mL de muestra desnaturalizada. Dejar que se introduzca completamente en la columna y descartar el líquido que gotee durante el proceso.
- 4) Eluir con 3,5 mL del solvente de elución y recoger en un frasco toda la solución que salga de la columna, hasta que no quede líquido en la parte superior.

### **Bibliografía**

<sup>1</sup> M. Aivaliotis, *et.al*, *Biochim Biophys Acta*, **1615**, 69-76, 2003.

<sup>2</sup> E. Folta-Stogniew, K. R. Williams, *J. Biomol. Tech.*, **10** (2), 51-63, 1999.

<sup>3</sup> A.G. Brenton, A.R. Godfrey, *J.Am.Soc.Mass.Spectrom.*, **21**, 1821-1835, 2010.

<sup>4</sup> J.H. Gross, “*Mass Spectrometry, a textbook*”, Second edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2011.

<sup>5</sup> K. Hiraoka, “*Fundamentals of Mass Spectrometry*”, Springer New York Heidelberg Dordrecht, 2013.

<sup>6</sup> Y. Sakai, *et.al*, *SurfInterface Anal*, **43**, 1605, 2011.



# CAPÍTULO 8

## OTRAS TÉCNICAS

En este capítulo, se detallan otras técnicas utilizadas para el análisis de las soluciones proteicas expuestas a radiación UV-A. Las técnicas empleados incluyeron: i) electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), ii) dicroísmo circular (CD) y iii) espectroscopía de masas (MALDI-TOF).

### 8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

#### 8.1.1. Fundamento

Una técnica importante para la separación de proteínas se basa en el desplazamiento de las proteínas cargadas en un campo eléctrico, proceso denominado electroforesis. La electroforesis de proteínas se lleva a cabo generalmente en geles formados por el polímero entrecruzado poliacrilamida. El gel de poliacrilamida actúa como un tamiz molecular, retrasando la migración de las proteínas en una forma proporcional a su cociente carga/masa. La migración también puede estar afectada por la forma de la proteína. La fuerza que mueve la macromolécula es el potencial eléctrico (E) y la movilidad electroforética de la molécula ( $\mu$ ), es el cociente entre la velocidad de la partícula (V), y el potencial eléctrico. A su vez, la movilidad electroforética también es igual a la carga neta de la molécula (Z) dividida por el coeficiente de fricción (f), que refleja en parte la forma de la proteína. Se puede plantear entonces la Ecuación 8.1 y concluir que el desplazamiento de una proteína en un gel durante una electroforesis es función de su tamaño y de su forma.<sup>1</sup>

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f} \quad (\text{Ecuación 8.1})$$

La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) es la técnica electroforética más ampliamente utilizada en proteínas, en la cual las muestras sufren desnaturización por la acción de diferentes agentes desnaturizantes. Los más utilizados son el  $\beta$ -mercaptoetanol, un agente reductor utilizado para romper los enlaces disulfuro inter e

intracatenarios y el SDS, un anión que se une a las proteínas por absorción no específica, que desnaturaliza por completo a las mismas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria de estas macromoléculas. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa. La unión de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos aminoácidos), haciendo que los complejos proteínas-SDS se muevan hacia el ánodo. La migración de los derivados proteína-SDS hacia al ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular ( $\log PM$ ). La relación carga/masa es aproximadamente igual para todas las proteínas de la muestra por lo que la separación está dada exclusivamente en función de la masa. El SDS-PAGE se emplea para estimar el peso molecular de las proteínas, para esto se compara con un patrón constituido por proteínas de peso molecular conocido. En este trabajo se utilizó el marcador de peso molecular *Broad-Range* provisto por Genbiotech (Figura 8.1).

Para realizar la electroforesis se utilizó una cuba *Miniprotean II system* (Figura 8.1) y una fuente de alimentación *PowerPAC Basic* de BioRad.



**Figura 8.1.** Sistema de electroforesis. A: Cuba de electroforesis vertical de acrílico y peines con 5 a 15 pocillos. B: Placas de vidrio planas y placas de vidrio con espaciadores de 1 mm de grosor. C: Guías para el cargado de las muestras (*simple loading guide*). D: Soporte para el armado del gel. Marcador de peso molecular utilizado, *Broad-Range* (2 kDa- 220 kDa).

### 8.1.2. Procedimiento experimental

Para la preparación del gel separador o *resolving*, cuya concentración de acrilamida varió entre 10 y 20% según el experimento, se agregaron los reactivos en el siguiente orden: H<sub>2</sub>O, Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8), Acrilamida/Bis-acrilamida 30%/0,8% (pH < 7), SDS (10% p/v), Persulfato de amonio (APS) (10%p/v) y TEMED (2,8 µl). Esta mezcla se agitó suavemente con movimientos circulares con el fin de favorecer la homogenización. Luego, la misma fue colocada entre las placas de vidrio contenidas en el soporte del equipo e inmediatamente se agregó un volumen pequeño de isopropanol al 50%. El agregado del mismo se realiza con el fin de minimizar la exposición al O<sub>2</sub>, pues la presencia de O<sub>2</sub> desfavorece la gelificación y facilita la formación de burbujas. Una vez que se logra la gelificación, se descarta el isopropanol y se elimina los restos de este utilizando papel secante.

Posteriormente, se procede a la preparación del gel *stacking* al 4%, los reactivos se agregaron en el siguiente orden: H<sub>2</sub>O, Tris-HCl (1 M; pH 6,8), Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0,8%; pH < 7), SDS (10% p/v), Persulfato de amonio (10% p/v) y TEMED. De esta manera, la mezcla se agrega entre las placas de vidrio, sobre el gel *resolving* y se coloca el peine en el extremo superior del soporte. Una vez que el gel solidificó, el peine es retirado suavemente dejando formadas las calles donde luego se siembran las muestras. A continuación, se coloca el gel en la cuba de electroforesis y se sumerge en buffer de corrida Tris-Glicina (Tris-base 25 mM, Glicina 200 mM, SDS 0,1% p/v, pH 8,3). Por cada 24 µl de muestra se adicionó 6 µl de *buffer* muestra 5X Laemmli (Tris-Hcl (0,3 M; pH 6,8), SDS (10 % p/v), Glicerol (50 % v/v), Azul de bromofenol (0,1 % v/v), b-mercaptoetanol (5%v/v)). Una vez agregado el *buffer* muestra, las muestras se hierven durante 5 minutos y se centrifugan a alta velocidad durante 30 segundos. Posteriormente se siembra un volumen de muestra entre 10- 20 µl en cada calle, según el caso, utilizando una jeringa Hamilton. Este volumen de muestra corresponde a una cantidad de proteína del orden de 10 µg. En los casos en los que se utilizó el marcador de peso molecular el volumen sembrado fue de 10 µl. El voltaje aplicado en la corrida y el tiempo de corrida fue variando según cada experimento.

Una vez finalizada la corrida, el gel es sometido a tinción, para esto se coloca durante una hora en solución de Azul de Coomasie (Azul de Coomasie G-250 0,2% p/v, ácido acético 10% v/v, Etanol 50% v/v). Finalmente se procede a desteñir el gel, para esto el gel se sumerge durante varias horas en una solución acuosa de ácido acético 10% v/v y metanol 45 % v/v. De esta manera, las proteínas se detectan como bandas azules contra un fondo claro. Posteriormente, los

geles son escaneados con el fin de poder cuantificar por fotodensitometría la cantidad de proteína en cada una de las bandas, para esto se utiliza el *software ImageJ 1.45s*.

Para los geles de  $\alpha$ -HlyA se realizó una segunda tinción, con el fin de aumentar la sensibilidad para la detección de productos. Para ello, se decoloró totalmente a los geles previamente coloreados con Coomassie y se realizó la tinción con  $\text{AgNO}_3$ . Se comienza lavando durante 30 minutos el gel con una solución de etanol (30 %), AcH (10 %) y  $\text{H}_2\text{O}$  (Milli-Q). Luego, se lava durante 20 minutos con  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q y se agrega una solución de tiosulfito de sodio 2 mM durante 2 minutos, para eliminar el *background*. Se vuelve a lavar el gel con  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q durante 5 minutos por duplicado y se deja tiñendo durante 30 minutos con la solución de tinte (AgNO<sub>3</sub> (0,2 %); Formol (0,8 %);  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q). Se enjuaga con  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q y se agrega durante 10 minutos la solución de revelado ( $\text{Na}_2\text{CO}_2$  (0,75 g); Formol; Tiosulfato de sodio;  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q). Finalmente, se detiene la reacción con 10 mL de ácido acético y se deja el gel en agua. Se utilizó como marcador de peso molecular al *Kaleidoscope* provisto por *Bio-Rad*.

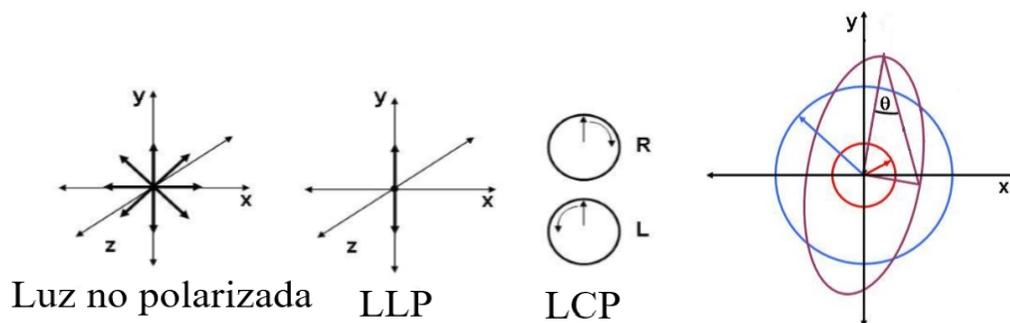
## 8.2. Dicroísmo Circular

La técnica de dicroísmo circular (CD) ha sido ampliamente utilizada para investigar aspectos de la conformación de péptidos y proteínas. Fundamentalmente, CD se utiliza para estimar el contenido global de estructura secundaria y detectar cambios conformacionales.

La luz presenta una naturaleza dual de onda-partícula. Como onda electromagnética se la describe por la variación sinusoidal en el tiempo y a lo largo de la dirección de propagación de un campo eléctrico (E). En la luz natural (no polarizada), el vector E oscila en todos los planos posibles que incluyen la dirección de propagación de la onda (Figura 8.2).<sup>2</sup> Por el contrario, si se selecciona un único plano de oscilación, obtendremos luz linealmente polarizada (LLP). Existe otra clase de luz polarizada en la que el vector E rota a lo largo de la dirección de propagación. Esta última luz se denomina circularmente polarizada (LCP) y existirán dos formas opuestas no superponibles de acuerdo con su sentido de giro: derecha e izquierda (R y L, por sus iniciales en inglés). Un haz de luz linealmente polarizado en que uno de los componentes de LCP (R o L) es absorbido diferencialmente por la muestra resultará en un haz de luz elípticamente polarizado (LEP) (Figura 8.2).

La absorción diferencial por parte de una molécula asimétrica (en nuestro caso, la cadena polipeptídica) de dos haces de luz circularmente polarizados de sentido opuesto (L y R), ambos

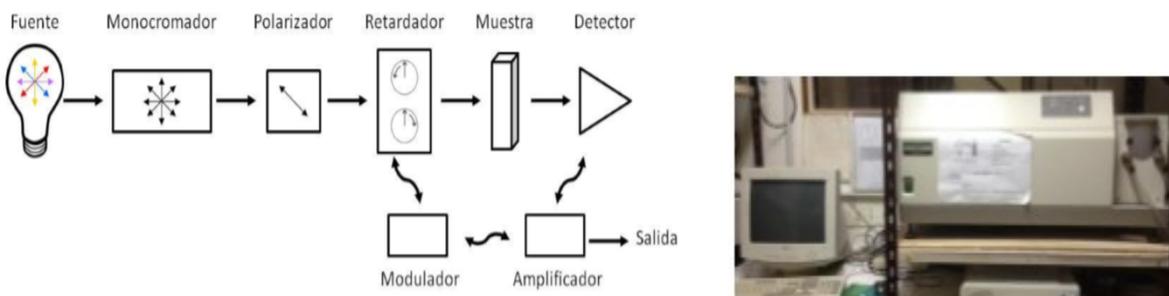
componentes de la luz polarizada plana, se define como dicroísmo circular (CD, por sus siglas en inglés, *Circular Dichroism*). Este efecto ocurre cuando el cromóforo es quiral, es decir, que ocurre una transición ópticamente activa debido a que su estructura es intrínsecamente asimétrica; está unido covalentemente a un centro quiral o está localizado en un entorno asimétrico. La magnitud del fenómeno puede cuantificarse de dos modos equivalentes. Uno es a partir de la medida del ángulo theta ( $\theta$ ) llamado elipticidad, representado como el ángulo definido entre el cateto mayor y la hipotenusa del triángulo rectángulo interior a la elipse (Figura 8.2). Alternativamente, la medida de CD puede definirse como la magnitud  $\Delta\epsilon = (\epsilon_R - \epsilon_L)$  denominado coeficiente de extinción diferencial, derivado precisamente de la versión diferencial de la ley de Lambert -Beer:  $\Delta A = \Delta\epsilon \cdot c \cdot l$ . Esta ley se puede expresar como:  $\theta = [\theta] \cdot c \cdot l$ . La medida del ángulo  $\theta$  a cada longitud de onda se denomina espectro CD.



**Figura 8.2.** Naturaleza de la luz polarizada. Extraído referencia 3.

En la Figura 8.3 se observa un diagrama en bloques del instrumento donde se representa en primer lugar la fuente de luz, generalmente una lámpara de Xe, que emite luz intensa en un rango amplio 200-900 nm. Luego, se selecciona luz de cada longitud de onda por pasaje a través de un monocromador (prisma o red de difracción). A continuación, la luz atraviesa un polarizador lineal (que entrega LLP), antes de incidir sobre el retardador oscilante de  $\frac{1}{4} \lambda$  (modulador fotoelástico o celda de Pockels). La luz que emerge de este dispositivo resulta en LCP de sentido izquierdo o derecho (dependiendo del voltaje aplicado a la celda de Pockels), la cual incide sobre la muestra, pudiendo ser absorbidas de manera diferencial. Un fotodetector eficiente y muy sensible (tubo fotomultiplicador PMT) registra como una señal eléctrica la luz que le llega en función del tiempo. Esta señal incluirá un componente de naturaleza alterna (CA) que será procesado por el amplificador. Así la magnitud de la señal CA será función de la diferencia entre las intensidades transmitidas de los haces R y L y la fase será sensible al signo de la señal de CD

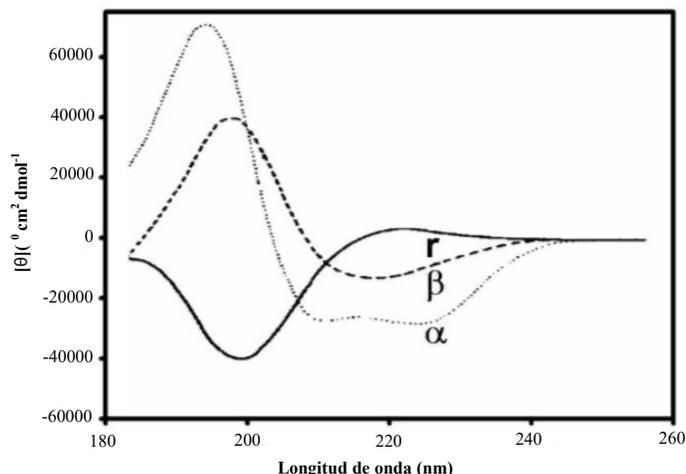
(positivo o negativo). Finalmente, la salida será la medida de la elipticidad  $\theta$  (en milirados, o su equivalente  $\Delta A$ ).<sup>3</sup>



**Figura 8.3.** Componentes de un espectropolarímetro y fotografía del equipo Jasco J-810 utilizado.

El espectro de CD en la región UV cercano (250-340 nm) es característico de cada proteína y refleja mayoritariamente las contribuciones de las cadenas laterales aromáticas (puentes disulfuro) ubicadas en ambientes estructurados. Las características espectrales en esta última región reflejarán aspectos de la estructura terciaria de la proteína. Las cadenas laterales de los residuos aromáticos (Trp, Tyr, Phe, His) incluyen cromóforos planos (ópticamente inactivos), que son causantes de bandas de CD en el rango 250-290 nm por su ubicación en el ambiente químico asimétrico dado por la estructura terciaria compacta, característica del estado nativo de la proteína. Sumado a estas contribuciones se encuentra el residuo de cistina (el dímero de cisteína) que aporta bandas débiles centradas a  $\sim 280$  nm cuyo signo depende de la quiralidad del puente disulfuro. Varios factores influyen sobre la intensidad de las bandas asignadas a los residuos aromáticos: (i) la rigidez de la proteína, siendo menor la intensidad cuanto mayor es la movilidad; (ii) las interacciones entre los grupos aromáticos, que se torna muy importante a distancias menores que 1 nm; y (iii) el número de grupos aromáticos.<sup>3</sup> Por otro lado, el espectro de CD en la región UV lejano (180-250 nm) informa sobre la estructura secundaria, donde el principal cromóforo que contribuye a la señal en esta región es el enlace peptídico. Este grupo funcional presenta dos transiciones:  $n\pi^*$ , débil, ancha y centrada en aproximadamente 210 nm y otra  $\pi\pi^*$ , que es intensa y está centrada en aproximadamente 190 nm. La interacción entre los planos representados por los enlaces peptídicos dependerá de su disposición relativa, que será diferente (y quiral) de acuerdo con el tipo de estructura secundaria que adopte la cadena, por ejemplo el sentido derecho de la hélice  $\alpha$  o la casi completa inversión de los planos en una hebra  $\beta$ . En forma característica, la presencia de dos mínimos a 208 y 222 nm y de un máximo a  $\sim 190$

nm da cuenta de la existencia de estructura  $\alpha$  helicoidal. En cambio, un único mínimo a  $\sim 215$  nm y un máximo cercano a  $\sim 195$  nm dan indicio de contenido preponderante de hoja  $\beta$  (Figura 8.4).<sup>3</sup>



**Figura 8.4.** Espectros típicos para las estructuras secundarias  $\alpha$  y  $\beta$ . También se muestra una cadena desordenada. Extraído de referencia 3.

En este trabajo de tesis se utilizó un espectropolarímetro Jasco J-810 (*Spectronic Instrument Inc.*) para evaluar la elipticidad de las muestras de HSA. Los espectros en el UV lejano se registraron en una celda de cuarzo de 0,1 cm de camino óptico, en el rango de longitudes de onda de 200 nm a 250 nm. Los espectros en el UV cercano se registraron utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico, en el rango de longitudes de onda de 250 nm a 320 nm. La velocidad de medición fue de 20 nm/min. El promedio de tres espectros independientes fue utilizado para calcular la elipticidad molar promedio ( $[\theta]$ ). La elipticidad molar se calculó con la Ecuación 8.2, expresada en  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ .

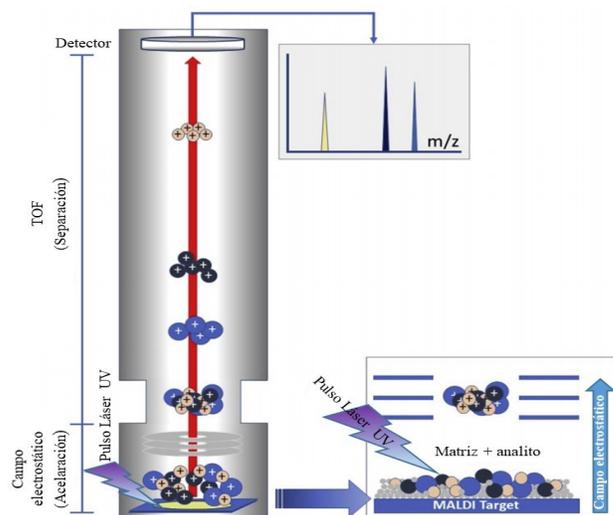
$$[\theta] = \frac{(\theta \cdot 100 \cdot Mr)}{(c \cdot l \cdot NA)} \quad (\text{Ecuación 8.2})$$

Donde  $[\theta]$  está expresada en  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ,  $\theta$  es la elipticidad medida experimentalmente en milideg,  $Mr$  es la masa molecular de la proteína,  $c$  es la concentración de proteína en mg/mL,  $l$  es el paso óptico de la celda, y  $NA$  es el número total de aminoácidos de la proteína.

### 8.3. Espectrometría de masas

Otra técnica de ionización utilizada ampliamente al igual que ESI (*Sección 7.3*), es la denominada MALDI, por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*. Los experimentos MALDI se basan en la irradiación, con un pulso corto de láser UV (en general de

337 o 355 nm), en la superficie de una muestra sólida y seca, constituida por la mezcla de la matriz utilizada (moléculas orgánicas que actúan como fotosensibilizadores y absorben a la  $\lambda_{exc}$ ) y el analito. Una vez que la matriz absorbe los fotones y pasa a un estado excitado, ocurre la desorción-ablación de la muestra sólida y la ionización, en condiciones de vacío en el espectrómetro de masas. Los iones en la fase gaseosa son acelerados hacia el analizador por un campo electrostático y luego, se separa a los iones según su  $m/z$  y se lleva a cabo su detección (Figura 8.5). MALDI es más sensible que otras técnicas de ionización láser, ya que el número de moléculas de la matriz se encuentran en exceso con respecto a las moléculas del analito, por lo que al estar estas últimas separadas, se previene la formación de *clusters* de la muestra. A su vez, la matriz minimiza el daño en la muestra, debido a que absorbe la energía incidente del láser. Además, teniendo en cuenta que la ionización es independiente de la absorción y del tamaño de la muestra a analizar, MALDI permite la desorción e ionización de analitos con masas molecular mayores a 100000 Da. Es una técnica que se utiliza para polímeros sintéticos y biológicos, ya que los espectros MALDI incluyen, principalmente, iones moleculares monocargados y al ser una técnica suave, no induce fragmentación. Sin embargo, pueden ocurrir la formación de algunos iones multicargados y algunos pocos fragmentos. Esta cámara de ionización suele estar acoplada a un analizador TOF, ya que permite analizar iones dentro de un gran rango de masas, lo cual habilita el estudio de los iones de alta masa generados por MALDI.<sup>4,5</sup>



**Figura 8.5.** Esquema y componentes de un UV-MALDI-TOF. Extraído de referencia 6.

Para las medidas de MALDI-TOF realizadas en este trabajo de tesis, se utilizaron dos equipos operados en modo positivo lineal: un espectrómetro de masas *Ultraflex Daltonics TOF/TOF (Bruker)* (Equipo I) y un 5800 MALDI TOF-TOF (*ABSciex*) (Equipo II).

Para el Equipo I se utilizó una mezcla de péptidos y proteínas comerciales externa para calibrar el equipo (bradicinina (1-7) (757,39916), angiotensina II (1046,54180), angiotensina I (1296,684), insulina (5734,52000) y citocromo C (12360,97400). Se utilizaron dos matrices MALDI fotoquímicamente estables y recomendadas para su uso con proteínas: CHCA ( *$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid*, 1mg/mL en MeCN: TFA 0,1% 50:50 (v/v)) y SA (*sinapinic acid*, 1 mg/mL en MeCN: TFA 0,1% 50:50 (v/v)). Se utilizó para la preparación de la muestra el método sándwich directamente sobre el porta muestras, el cual consiste en colocar una gota de la solución de la matriz (0,5  $\mu$ L), una gota del analito y otra gota de la matriz (x2), esperando a que se seque en cada etapa a temperatura ambiente. La desorción/ionización se obtuvo utilizando un láser Nd:YAG (355 nm), ajustando la potencia para asegurar tener una fragmentación mínima. Los espectros se obtuvieron y analizaron utilizando los programas *FlexControl* y *FlexAnalysis*, respectivamente.

El Equipo II se calibró utilizando 1  $\mu$ L de una mezcla de calibración TOF-TOF comercial (*ABSciex*), en un rango de masas entre 250-3000 *m/z*. Las muestras (50  $\mu$ L) se evaporaron y diluyeron en 8  $\mu$ L 70% ACN + 0,1% TFA y se analizaron en 10 mg/mL SA (*Bruker*) en 0,1% TFA-ACN/H<sub>2</sub>O (7:3, v/v)). Se agregó 1  $\mu$ L directamente al porta muestras y se dejó secar a temperatura ambiente. Los datos se analizaron utilizando el *software MASCOT*.

### **Bibliografía**

- <sup>1</sup>D.L. Nelson, M.M. Cox, “*Lehninger: Principios de Bioquímica*”, Quinta Edición, Ediciones Omega, Barcelona, 2009.
- <sup>2</sup>G.G. Hammes, “*Spectroscopy for the Biological Science*”, Wiley-Interscience, Hoboken (NJ), 2005.
- <sup>3</sup>B. Córscico, “*Análisis estructural y funcional de Macromoléculas*”, Edulp, Capítulo 4, 2014.
- <sup>4</sup>K. Hiraoka, “*Fundamentals of Mass Spectrometry*”, Springer New York Heidelberg Dordrecht, Capítulo 9, 2013.

<sup>5</sup> E. Hoffmann, V. Stroobant, “*Mass Spectrometry Principles and Applications*”, Tercera Edición, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, Capítulo 1, 2007.

<sup>6</sup> T.Y. Hou, *et.al*, *J. Food Drug Anal.*, **27**, 404-414, 2019.

## **OBJETIVOS**



El objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar la formación de dímeros de tirosina (Tyr<sub>2</sub>) en las reacciones fotosensibilizadas por pterinas en medio acuoso y bajo irradiación UV-A, usando distintos sustratos proteicos (moléculas blanco), poniendo énfasis en la investigación de la naturaleza de los cambios químicos generados y en los mecanismos de reacción involucrados. Para ello se trabajó con pterina (Ptr), que es el compuesto modelo no sustituido de las pterinas oxidadas. Como sustratos se emplearon tirosina libre (Tyr), Ubiquitina (Ub), Albúmina de suero Humano (HSA) y  $\alpha$ -hemolisina de *E.Coli* ( $\alpha$ -HlyA).

A continuación se detallan los objetivos específicos que han dirigido el desarrollo de la tesis:

- ✓ Desarrollar un método de síntesis, sencillo y económico, de Tyr<sub>2</sub> a partir de la fotosensibilización de Tyr por Ptr.
- ✓ Evaluar las propiedades fotofísicas, estabilidad fotoquímica, la generación de especies reactivas de oxígeno y la capacidad fotosensibilizadora de Tyr<sub>2</sub>.
- ✓ Investigar la generación fotoinducida de Tyr<sub>2</sub> en proteínas globulares modelos (Ub y HSA) como consecuencia del proceso fotosensibilizado. Estudiar las modificaciones estructurales que sufren las proteínas como consecuencia de la formación de los mismos.
- ✓ Identificar otros aminoácidos que sufren cambios químicos como consecuencia del proceso fotosensibilizado. Caracterizar los productos de reacción.
- ✓ Evaluar la capacidad de Ptr para fotoinactivar a  $\alpha$ -HlyA y estudiar su oligomerización como consecuencia del proceso fotosensibilizado.



# **RESULTADOS**

## **PARTE I**



# CAPÍTULO 9

## SÍNTESIS, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE DÍMEROS DE TIROSINA

Se ha reportado que el *cross-linking* en las proteínas puede ser mediado por dímeros de tirosina (Tyr<sub>2</sub>), los cuales pueden ser generados por diferentes mecanismos, entre ellos, los procesos fotosensibilizados. En los últimos años se ha tenido un especial interés en detectar la formación de Tyr<sub>2</sub>, ya que esta modificación en particular se asocia con situaciones patológicas y anormales.<sup>1</sup> Si bien existen distintos métodos de síntesis de Tyr<sub>2</sub> utilizando distintos agentes oxidantes,<sup>2,3,4</sup> el más empleado es el método enzimático en el cual la tirosina (Tyr) es oxidada por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en una reacción catalizada por la enzima peroxidasa.<sup>5,6,7</sup> Este presenta una importante desventaja pues involucra muchos pasos para el aislamiento del producto puro. Teniendo en cuenta que cuando Tyr libre es expuesta a radiación UV-A en presencia de pterina (Ptr), se generan distintos productos de oxidación, donde uno de ellos se ha sugerido que es Tyr<sub>2</sub><sup>8</sup>, en este capítulo se buscó identificar este compuesto, buscar condiciones que favorezcan su formación y llevar a cabo su aislamiento y purificación para obtener soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub>. Es decir, en este capítulo se describe el desarrollo de un método de obtención de Tyr<sub>2</sub> a partir de la oxidación de Tyr fotosensibilizada por Ptr.

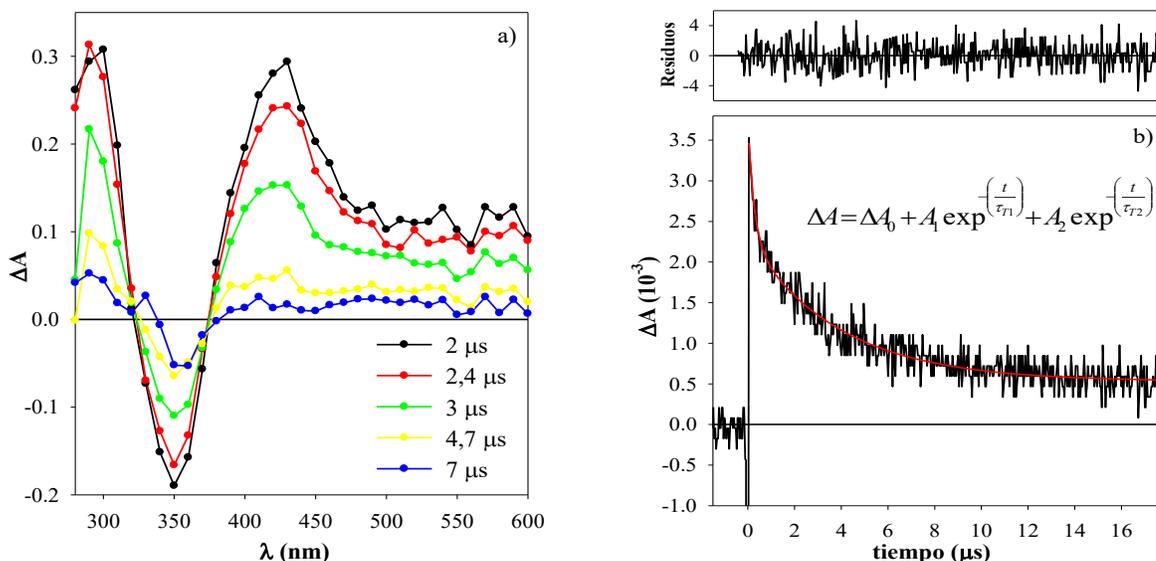
### 9.1. Formación del radical Tyr

Como se detalla en la *Sección 4.3*, el mecanismo de fotosensibilización de Tyr por Ptr es de Tipo I. Se ha propuesto que luego de la excitación del fotosensibilizador y la formación de su estado triplete excitado (<sup>3</sup>Ptr\*), ocurre la transferencia de un electrón desde Tyr a <sup>3</sup>Ptr\* para formar el radical catión de Tyr (Tyr<sup>•+</sup>) y el radical anión de Ptr (Ptr<sup>•-</sup>).<sup>8,9</sup> Uno de los objetivos de

este trabajo de tesis fue detectar estas especies radicalarias. Para ello, se prepararon soluciones acuosas de Ptr y Tyr en condiciones anaeróbicas y se realizaron distintos estudios utilizando la técnica de LFP (*Sección 6.3*).

Como primer paso, se registró el espectro de absorción del transiente de Ptr a pH 5,0 con una concentración de 75  $\mu\text{M}$  (absorbancia de 0,42 a 355 nm). Cabe destacar que Ptr es relativamente fotoestable, por lo que las muestras se pudieron exponer a muchos destellos del láser sin necesidad de cambiar la solución. Esto se verificó al no observar cambios en los espectros de absorción UV de las muestras antes y después de ser irradiadas. El espectro que se muestra en la Figura 9.1.a se construyó a partir de los decaimientos registrados entre 280-600 nm cada 10 nm utilizando una escala de 10  $\mu\text{s}$  (1  $\mu\text{s}/\text{div}$ ). Como se puede observar, existen especies transitorias con un máximo intenso en 430 nm y otro a 300 nm (Figura 9.1.a).

Como se mencionó en la *Sección 3.1*, Ptr en el estado fundamental y en su forma neutra se encuentra en su forma tautomérica lactama. Sin embargo, bajo irradiación, se producen dos especies excitadas tripletes tautoméricas, que decaen simultáneamente. Concretamente se observa con decaimiento biexponencial formado por un componente corto ( $\tau_{T1}$ ) y otro largo ( $\tau_{T2}$ ) correspondientes a las especies tautoméricas lactama y lactima, respectivamente. Al analizar el decaimiento se observó un comportamiento biexponencial en todo el rango del espectro de absorción del transiente. En la Figura 9.1.b, se presenta el decaimiento ( $\lambda_{\text{ana}} = 430 \text{ nm}$ ) con el correspondiente ajuste biexponencial y la distribución de residuos, donde se obtuvieron valores de 0,27 ( $\pm 0,09$ )  $\mu\text{s}$  y 3,9 ( $\pm 0,2$ )  $\mu\text{s}$  para  $\tau_{T1}$  y  $\tau_{T2}$ , respectivamente. Tanto el espectro transiente como los tiempos de vida se corresponden con los resultados previamente reportados para el triplete de Ptr.<sup>10</sup>



**Figura 9.1.a.** Espectro de absorción diferencia del transiente de una solución de Ptr saturada con  $N_2$  (escala: 1  $\mu s/div$ ) y **b)** dependencia de  $\Delta A$  con el tiempo y distribución de los residuos del ajuste de la señal con una función biexponencial (escala: 4  $\mu s/div$ ). pH= 5,0,  $\lambda_{exc}$ = 355 nm,  $A_{355nm}$  = 0,42, [Ptr] = 75  $\mu M$ .

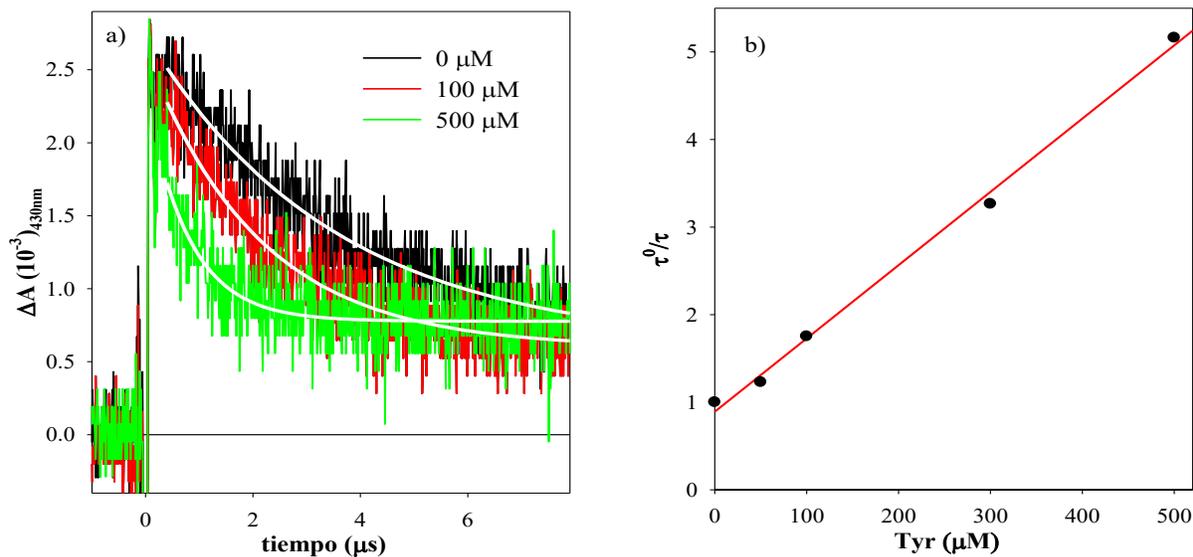
Teniendo en cuenta que se ha confirmado la participación del  ${}^3Ptr^*$ , correspondiente a la forma tautomérica lactima, en procesos fotosensibilizados con diferentes sustratos,<sup>10,11,12</sup> se realizaron experimentos para estudiar la interacción del  ${}^3Ptr^*$  con Tyr. Para ello, se prepararon soluciones acuosas que contenían una concentración constante de Ptr (75  $\mu M$ ) y concentraciones crecientes de Tyr (0-500  $\mu M$ ) a pH 5,0. Se burbujó durante 20 minutos cada mezcla con  $N_2$  para eliminar el  $O_2$  del medio y luego, se registraron los decaimientos a 430 nm para cada concentración de Tyr (Figura 9.2.a). Se procesaron las señales para determinar los tiempos de vida del estado triplete ( $\tau_{T2}$ ) correspondientes a cada concentración. A partir del análisis de Stern-Volmer (Figura 9.2.b) ( $\tau^0/\tau_T$  vs concentración de Tyr), aplicando la Ecuación 9.1, se calcularon los valores de las pendientes que corresponde a la constante de desactivación total de  ${}^3Ptr^*$  por Tyr ( $K_{sv} = \tau_T^0 k_q$ ).

$$\frac{\tau_T^0}{\tau_T} = 1 + \tau_T^0 k_q [Tyr] \quad (\text{Ecuación 9.1})$$

Donde:

- $\tau_T$  y  $\tau_T^0$  son los tiempos de vida del triplete en presencia y ausencia de Tyr (en seg)
- [Tyr]: concentración molar de tirosina

-  $k_q$  es la constante biomolecular de desactivación



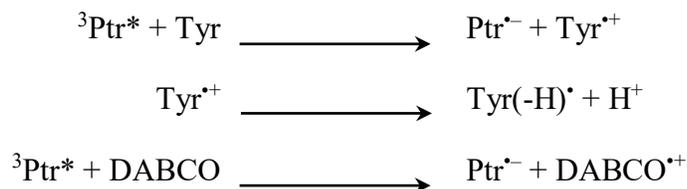
**Figura 9.2.a.** Decaimientos de  ${}^3\text{Ptr}^*$  registrados a partir de la evolución temporal a  $\Delta A_{430\text{ nm}}$ , justo después del pulso de láser en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de Tyr (escala: 1  $\mu\text{s}/\text{div}$ ). **b)** Gráfica de Stern-Volmer para la desactivación de  ${}^3\text{Ptr}^*$  por Tyr.  $\text{pH}= 5,0$ ,  $\lambda_{\text{exc}}= 355\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ana}}= 430\text{ nm}$ ,  $A_{355\text{nm}} = 0,42$ ,  $[\text{Ptr}] = 75\ \mu\text{M}$ .

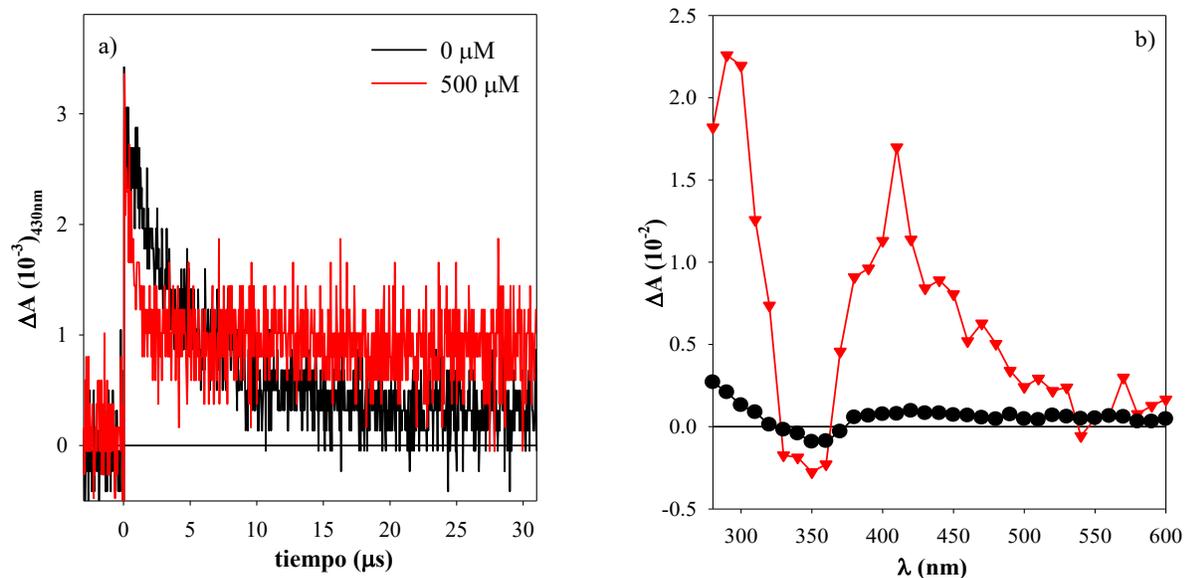
Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 9.2.b, donde se puede observar que el agregado creciente de Tyr tiene efecto sobre el  $\tau_{T2}$ . Se obtuvo un comportamiento lineal, por lo que a partir de la pendiente de la gráfica se pudo calcular el valor de  $k_q$ , obteniéndose un valor de  $2 \times 10^9\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$ , que es del orden difusional. No se pudo realizar el mismo análisis para  $\tau_{T1}$ , ya que con el equipo utilizado para las medidas no se logra detectar cambios en el valor de  $\tau_{T1}$  fuera del error experimental. Esto era esperable, teniendo en cuenta el error relativo alto en la determinación del mismo y el valor bajo de  $\tau_{T1}$ , ya que asumiendo una  $k_q$  del orden difusional, se necesitaría una concentración de *quencher* muy elevada para tener un descenso significativo.

Para la detección de las especies radicalarias, se registraron los espectros de absorción transiente de soluciones de Ptr en ausencia y presencia de Tyr (500  $\mu\text{M}$ ) a tiempos mayores a 10  $\mu\text{s}$ , después del pulso de láser. En estas condiciones ya no existen estados tripletes de Ptr y las señales que pudieran registrarse corresponderán a especies de tiempo de vida larga, tales como radicales. En la Figura 9.3.a se observan los decaimientos registrados a 430 nm de una

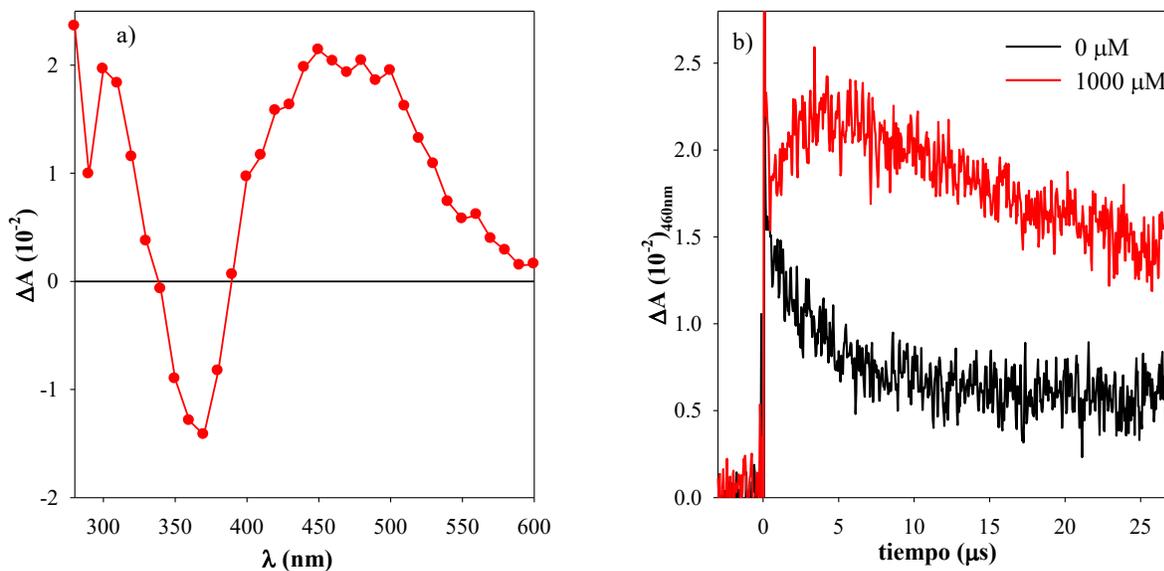
solución de Ptr en ausencia y presencia de 500  $\mu\text{M}$  de Tyr en una escala total de 40  $\mu\text{s}$ , donde se puede ver que la señal en ausencia de Tyr llega a cero, luego de 10  $\mu\text{s}$ . En las soluciones de Ptr en ausencia de Tyr, no se pudieron registrar espectros (Figura 9.3.b), lo cual era esperable para un sistema en el que no se forman radicales en concentraciones significativas ni se forman productos de reacción. Al analizar los espectros obtenidos para la solución de Ptr en presencia de 500  $\mu\text{M}$  de Tyr (Figura 9.3.b), se puede ver la formación de una banda que posee un pico agudo centrado en 410 nm, el cual, según lo reportado en literatura,<sup>13</sup> se puede asignar al radical tirosina neutro ( $\text{Tyr}(-\text{H})^\bullet$ ) que se obtiene de la rápida deprotonación de  $\text{Tyr}^{\bullet+}$ . Sin embargo, en la zona entre 450-500 nm, se observa una señal que no se puede asignar al  $\text{Tyr}(-\text{H})^\bullet$ .

Para profundizar en el análisis, teniendo en cuenta el mecanismo radicalario propuesto, se evaluó si la señal observada en la zona entre 450-500 nm se podría corresponder con  $\text{Ptr}^{\bullet-}$ . Para ello, se prepararon soluciones de Ptr en presencia de distintas concentraciones de un agente reductor denominado DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano). A partir de estudios de LFP, se pudo observar que el  $^3\text{Ptr}^*$  es desactivado eficientemente en presencia de DABCO, dando lugar a la formación de una nueva banda (Figura 9.4.a), la cual coincide con la absorción observada en el rango de 450-500 nm en presencia de Tyr (Figura 9.3.b). En la Figura 9.4.b se observa la formación del radical  $\text{Ptr}^{\bullet-}$ , en presencia de 1000  $\mu\text{M}$  de DABCO, registrando la evolución temporal a  $\Delta 460$  nm, 15  $\mu\text{s}$  después del pulso del láser.





**Figura 9.3.a.** Decaimientos de  $^3\text{Ptr}^*$  registrados a partir de la evolución temporal a  $\Delta A_{430\text{ nm}}$ , justo después del pulso de láser en ausencia y presencia de 500  $\mu\text{M}$  de Tyr (escala: 4  $\mu\text{s}/\text{div}$ ). **b)** Espectro de absorción diferencia del transiente de soluciones acuosas de Ptr en  $\text{N}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ) a pH 5,0, en ausencia ( $\bullet$ ) y presencia de Tyr (500  $\mu\text{M}$ ) ( $\blacktriangledown$ ), 15  $\mu\text{s}$  después del pulso de láser.



**Figura 9.4.a.** Espectro de absorción diferencia del transiente de soluciones acuosas de Ptr (75  $\mu\text{M}$ ) en  $\text{N}_2$  a pH 5,0, en presencia de 1000  $\mu\text{M}$  de DABCO (5,4  $\mu\text{s}$  después del pulso de láser) y **b)**  $\Delta A$  a 460 nm con 0  $\mu\text{M}$  (línea negra) y 1000  $\mu\text{M}$  de DABCO.

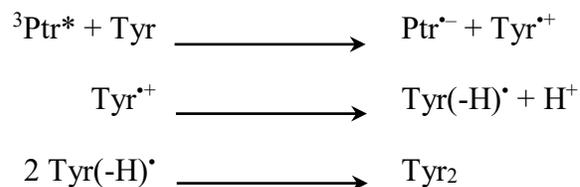
Para evaluar la factibilidad termodinámica de la transferencia de electrones entre Tyr y  $^3\text{Ptr}^*$ , se utilizó la ecuación de energía de Gibbs para la transferencia de un electrón fotoinducida (Ecuación 9.2):

$$\Delta G = E^\circ(\text{Tyr}^{*+}/\text{Tyr}) - E^\circ(\text{Ptr}/\text{Ptr}^{\cdot-}) - E_T(\text{Ptr}) \quad (\text{Ecuación 9.2})$$

Donde:

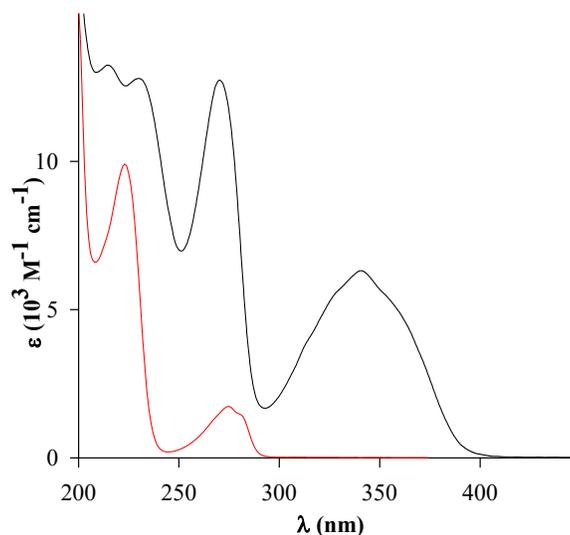
- $E^\circ(\text{Tyr}^{*+}/\text{Tyr})$  es el potencial de reducción de  $\text{Tyr}^{*+}$  (0,93 V contra NHE)<sup>14</sup>
- $E^\circ(\text{Ptr}/\text{Ptr}^{\cdot-})$  el potencial de reducción de Ptr (-0,55 V contra NHE)<sup>15</sup>
- $E_T(\text{Ptr})$  es la energía de  $^3\text{Ptr}^*$  (2,52 eV)<sup>15</sup>

Se obtuvo un valor de  $\Delta G = -1,04$  eV, indicando que la transferencia fotoinducida de electrones entre Tyr y  $^3\text{Ptr}^*$  es factible, generando de esta manera  $\text{Tyr}(-\text{H})^\cdot$  que puede reaccionar con otro radical y dimerizar para formar  $\text{Tyr}_2$ .



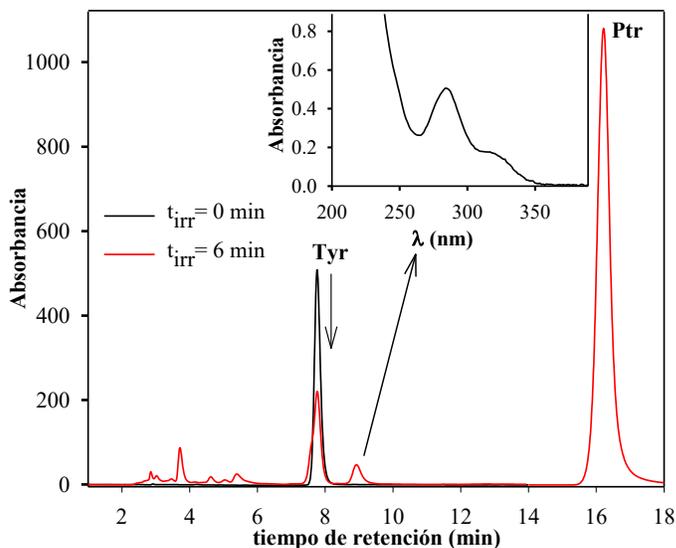
## 9.2. Aislamiento del producto compatible con $\text{Tyr}_2$

El objetivo fue averiguar si en efecto  $\text{Tyr}_2$  es uno de los productos de la oxidación fotosensibilizada de Tyr por Ptr. Para ello, se prepararon soluciones acuosas aireadas de Ptr y Tyr y se expusieron a irradiación (*Sistema de Irradiación I, Sección 5.4.1*). Luego, se identificó al producto compatible con  $\text{Tyr}_2$  y se llevó a cabo su aislamiento. Los experimentos se llevaron a cabo en el rango de pH 5,5 – 6,0, donde Ptr está presente en 99% en su forma ácida ( $pK_a$  7,9).<sup>16</sup> Bajo estas condiciones experimentales sólo Ptr absorbe radiación (Figura 9.5). Las muestras se irradiaron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico por diferentes períodos de tiempo y se analizaron por HPLC-PDA y HPLC-FL (*Sección 7.1*).



**Figura 9.5.** Espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas de Ptr (línea negra) y Tyr (línea roja).  $[Ptr]_0 = 100 \mu\text{M}$ ;  $[Tyr]_0 = 100 \mu\text{M}$ ;  $\text{pH} = 5,5$ .

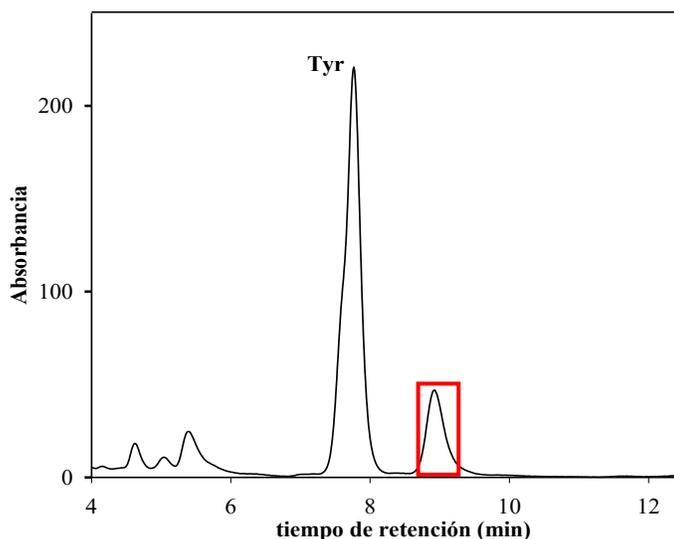
El primer paso fue reproducir las condiciones experimentales utilizadas previamente por Castaño y colaboradores,<sup>8</sup> donde ya se había encontrado un producto cuyo espectro de absorción coincidía con el de Tyr<sub>2</sub>. Para ello, se preparó una solución mezcla de Tyr (100  $\mu\text{M}$ ) y Ptr (100  $\mu\text{M}$ ) a  $\text{pH} 5,5$  y se irradió durante 6 minutos. Posteriormente, se analizó por HPLC utilizando como fase móvil acetato de amonio ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) 10 mM a  $\text{pH} 6,8$  y una columna analítica C12, con fase estacionaria de sílice de alta superficie (*Sección 7.1*). En los cromatogramas registrados a 280 nm se observó el consumo del pico correspondiente a la Tyr en función del tiempo de irradiación (Figura 9.6), mientras que el pico correspondiente a Ptr se mantiene constante en los tiempos estudiados. A su vez, aparecen distintos picos en la muestra irradiada, uno de los cuales presenta un espectro de absorción que coincide con el de Tyr<sub>2</sub> al  $\text{pH}$  de trabajo ( $t_{\text{ret}} = 9,08 \text{ min}$ ) (Inset Figura 9.6).



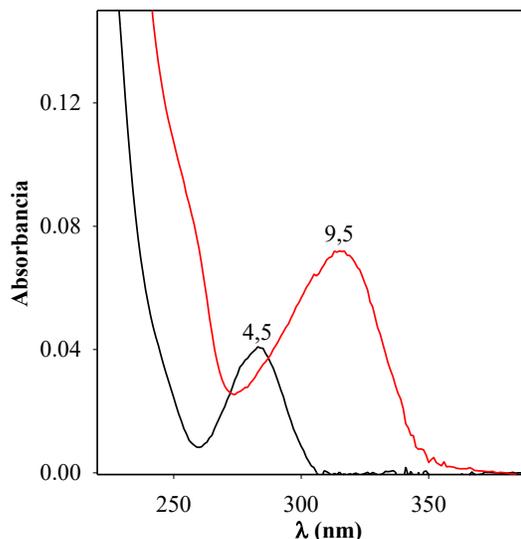
**Figura 9.6.** Cromatogramas registrados con HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}} = 280 \text{ nm}$ ) antes y después de 6 min de irradiación, para una solución de Ptr y Tyr equilibradas con aire. Inset: espectro absorción del producto con  $t_{\text{ret}} = 9,08 \text{ min}$ . Condiciones de irradiación:  $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$ ;  $[\text{Tyr}]_0 = 100 \mu\text{M}$ ;  $\text{pH} = 5,5$ ;  $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$ . Condiciones cromatográficas: 100%  $\text{NH}_4\text{Ac}$  10 mM;  $\text{pH} 6,8$ ; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 50 \mu\text{L}$ ; columna C12 (Jupiter Proteo 90A).

Se continuó con la etapa de aislamiento del producto compatible con  $\text{Tyr}_2$  a partir de las corridas de HPLC, al recolectar la fase móvil luego de que la muestra atraviesa por el detector PDA. En la Figura 9.7 se observa el rango de recolección empleado para el aislamiento. Teniendo en cuenta el flujo utilizado en las corridas cromatográficas y el rango de recolección, se obtuvo un volumen del producto de aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  por corrida. Al comparar la absorbancia a 280 nm del pico correspondiente a Tyr con el del producto, se puede ver que el producto compatible con  $\text{Tyr}_2$  posee baja absorbancia y teniendo en cuenta que Tyr posee un coeficiente de extinción molar bajo ( $\epsilon_{\text{Tyr}}^{274} = 1400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), se puede inferir que se encuentra a baja concentración.

Como se mencionó en la *Sección 2.2.4.2*,  $\text{Tyr}_2$  presenta un equilibrio ácido-base con un  $\text{p}K_a$  de 7,3,<sup>17</sup> con una banda de absorción centrada en 315 nm para soluciones alcalinas y una banda centrada en 283 nm para soluciones ácidas. Por lo tanto, se midieron los espectros de absorbancia de las soluciones aisladas a distintos valores de pH. Como se puede ver en la Figura 9.8, tanto los espectros de absorción como los puntos isobésticos corresponden con lo reportado, es decir, que el producto aislado presenta características espectroscópicas compatibles con las de  $\text{Tyr}_2$ .<sup>18</sup>



**Figura 9.7.** Cromatogramas registrados con HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}} = 280 \text{ nm}$ ) de una solución acuosa aireada de Ptr y Tyr irradiada durante 6 min. Condiciones de irradiación:  $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$ ;  $[\text{Tyr}]_0 = 100 \mu\text{M}$ ;  $\text{pH} = 5,5$ ;  $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$ . Condiciones cromatográficas: 100%  $\text{NH}_4\text{Ac}$  10 mM;  $\text{pH} 6,8$ ; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 50 \mu\text{L}$ ; columna C12 (Jupiter Proteo 90A).

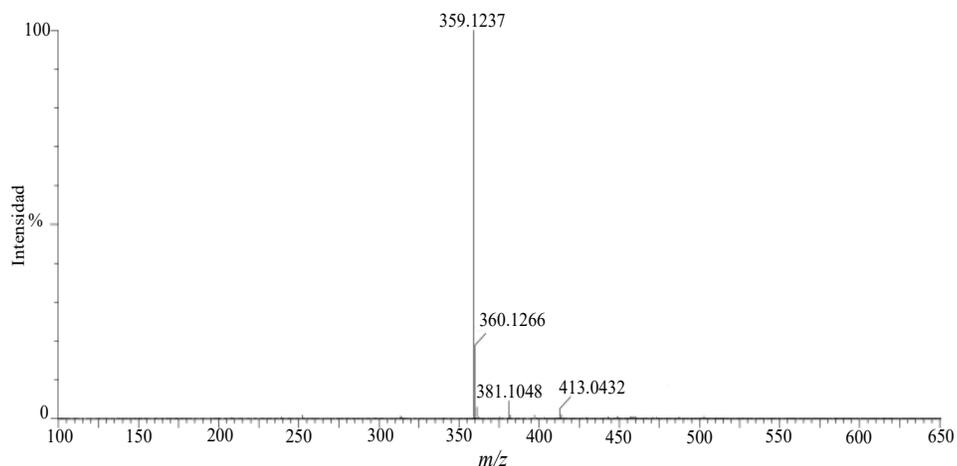


**Figura 9.8.** Espectro de absorción de soluciones acuosas aisladas del producto compatible con Tyr<sub>2</sub> a diferentes valores de pH, indicados sobre cada espectro.

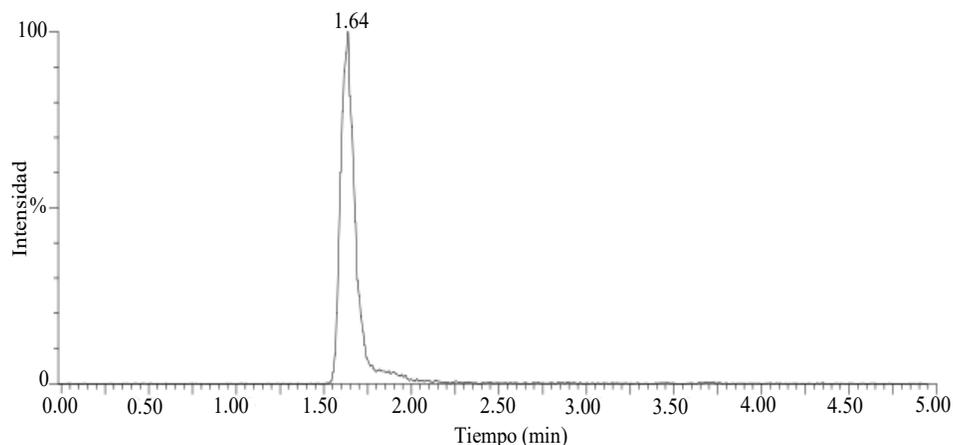
Con el fin de concentrar la muestra aislada, se eliminó el solvente mediante el proceso de liofilización (*Sección 5.2.1*) y luego, se resuspendió en un volumen de agua menor. Se realizaron controles tanto de absorbancia como por HPLC de las muestras concentradas y se pudo confirmar que el producto es estable y que no se degrada durante este proceso.

### 9.3. Identificación de Tyr<sub>2</sub>

Con el fin de identificar al producto aislado, las muestras obtenidas previamente por HPLC, se analizaron por UPLC acoplado a un espectrómetro de masas, utilizando el equipo descrito en la *Sección 7.3*. Como se puede ver en la Figura 9.9, en el espectro de masas se observa un único pico correspondiente al valor  $m/z$  de 359,1237 (modo ESI<sup>-</sup>), el cual se corresponde a  $[\text{2Tyr-2H-H}]^-$ , que coincide con la masa de Tyr<sub>2</sub>. A su vez, se registró el cromatograma de masas XIC para la masa 359,1237 Da (Figura 9.10), donde se observó un único pico. Este resultado sugiere que en las muestras aisladas hay un único compuesto con la masa correspondiente a Tyr<sub>2</sub>, es decir, se descarta la presencia de varios isómeros.



**Figura 9.9.** Espectro de masa obtenido de soluciones acuosas aisladas de Tyr<sub>2</sub>, modo ESI.



**Figura 9.10.** Cromatograma de masas XIC obtenido con el detector fijo en  $m/z$  de 359,1237 (modo ESI).

Para confirmar que mediante el método de síntesis empleado obtenemos a Tyr<sub>2</sub>, se recurrió al estudio por RMN (*Sección 6.4*). Debido a que esta técnica requiere una alta concentración de analito, fue necesario concentrar la muestra mediante el método de liofilización (*Sección 5.2.1*). Luego, se utilizó D<sub>2</sub>O para resuspender el sólido obtenido, ya que fue el solvente que permitió disolver la mayor cantidad de muestra. Se comenzó registrando los espectros <sup>1</sup>H-RMN de Tyr<sub>2</sub> en medio ácido (Figura 9.11), en el cual se pudieron observar seis protones aromáticos agrupados en dos dobletes y un singlete que integran 2:2:2, indicando una simetría en la zona aromática de Tyr<sub>2</sub> y otros tres grupos de señales en la zona alifática, que de nuevo integran 2:2:2. Este espectro se corresponde con el

reportado previamente.<sup>2</sup> Sin embargo, para caracterizar completamente a Tyr<sub>2</sub>, se registraron los espectros <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, DEPT, HSQC y HMBC en medio alcalino, utilizando D<sub>2</sub>O como solvente (Figuras 9.12-9.16). Como se puede observar en la Figura 9.12, en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz) de una solución aislada de Tyr<sub>2</sub> a pH alcalino hay dos grupos de señales: entre 2,5 y 3,5 ppm se encuentran los protones alifáticos que integran un total de 6 H, y entre 6,5 y 7,5 los protones aromáticos que integran otros 6 protones. Estas señales se observan a distintos campos ( $\delta$ , ppm), en detalle:  $\delta = 7.31$  (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.17 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.04 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.99 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.74 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 3.45 (dd,  $J = 8.0, 4.8$  Hz, 1H), 3.39 (dd,  $J = 8.0, 5.3$  Hz, 1H), 3.01 (dd,  $J = 13.2, 4.8$  Hz, 1H), 2.92 (dd,  $J = 13.6, 5.3$  Hz, 1H), 2.74 (dd,  $J = 13.2, 8.0$  Hz, 1H), 2.69 (dd,  $J = 13.6, 8.0$  Hz, 1H). Al comparar los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de Tyr<sub>2</sub> en medio ácido y básico (Figuras 9.11 y 9.12), se puede ver que las señales correspondientes a los protones aromáticos se desdoblan en solución alcalina, con respecto a lo observado en la solución ácida. Este comportamiento se debe a que en medio alcalino Tyr<sub>2</sub> se encuentra en su forma deprotonada.

Por otro lado, si bien no se logró alcanzar la concentración necesaria para realizar el espectro de <sup>13</sup>C-RMN, se logró identificar los carbonos mediante el análisis de los espectros bidimensionales. En particular, en base a los experimentos de <sup>135</sup>DEPT y HSQC, se identificaron las señales de CH y CH<sub>2</sub>, mientras que los carbonos cuaternarios se identificaron en base al HMBC. En detalle:  $\delta$  (ppm): 40.1 (CH<sub>2</sub>), 40.3 (CH<sub>2</sub>), 57.6 (2XCH), 119.0 (CH), 121.9 (CH), 129.6 (CH), 129.7 (CH), 129.8 (CH), 131.5 (CH), 152.9 (2XC), 156.9 (2xC), 182.6 (2XC). Cabe aclarar que a pesar de las ampliaciones realizadas en los espectros obtenidos no se pudieron asignar con seguridad dos señales de carbonos cuaternarios. Sin embargo, a partir de estos resultados, se pudo confirmar que el producto aislado es el o,o'- Tyr<sub>2</sub>.

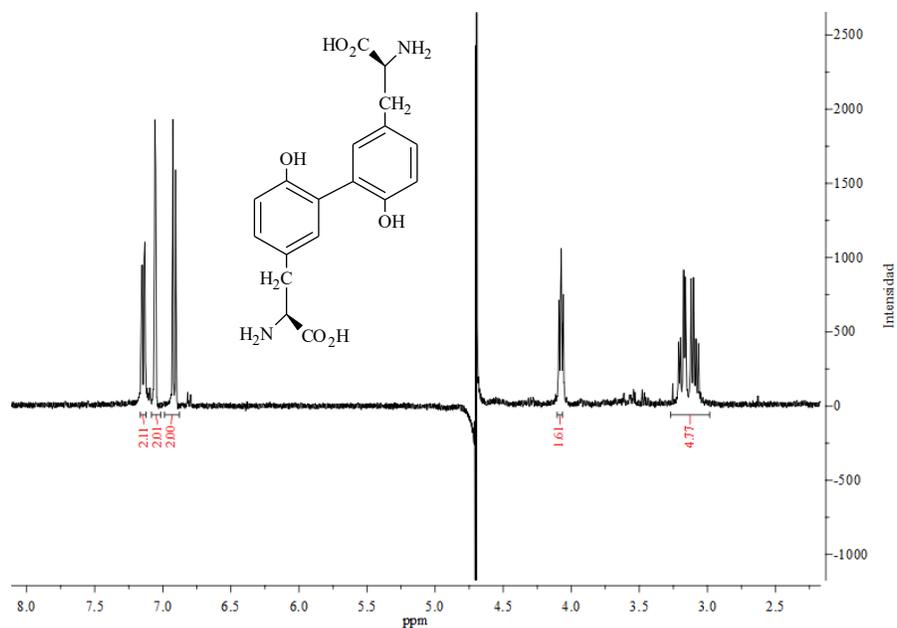


Figura 9.11.  $^1\text{H}$  NMR de Tyr<sub>2</sub> en medio ácido, suprimiendo la señal del solvente ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

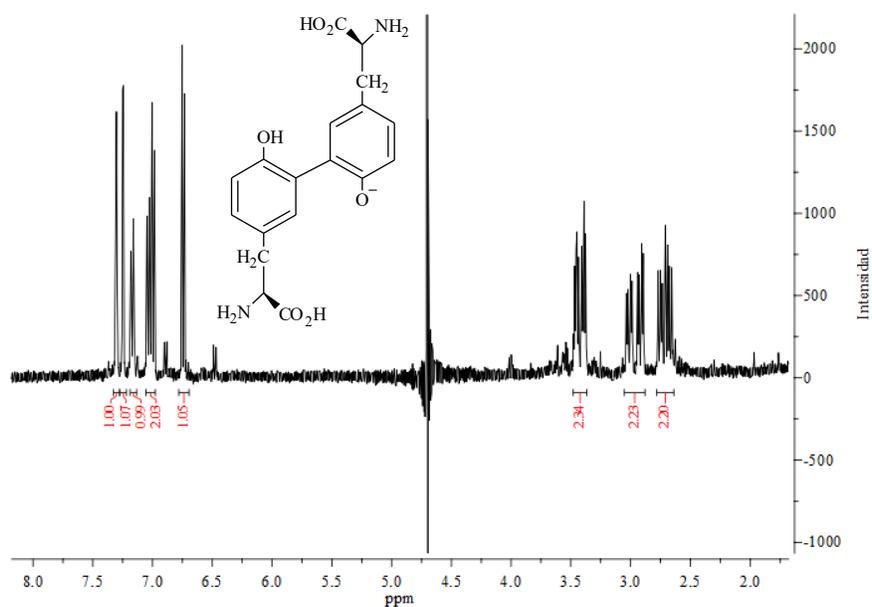


Figura 9.12.  $^1\text{H}$  NMR de Tyr<sub>2</sub> en medio básico, suprimiendo la señal del solvente ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Inset: estructura molecular de Tyr<sub>2</sub>.

RESULTADOS

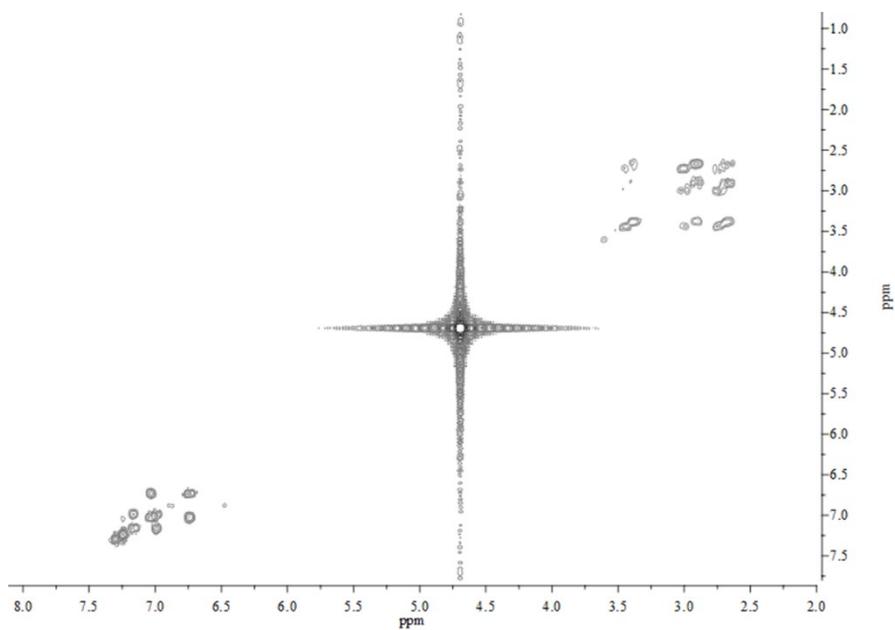


Figura 9.13. COSY de Tyr<sub>2</sub> en medio básico (D<sub>2</sub>O).

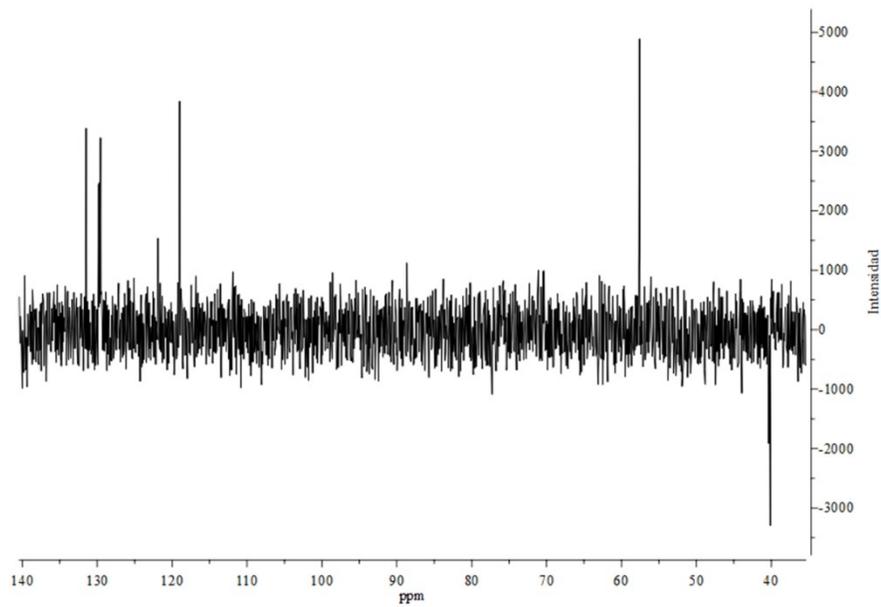


Figura 9.14. <sup>135</sup>DEPT de Tyr<sub>2</sub> en medio básico (D<sub>2</sub>O).

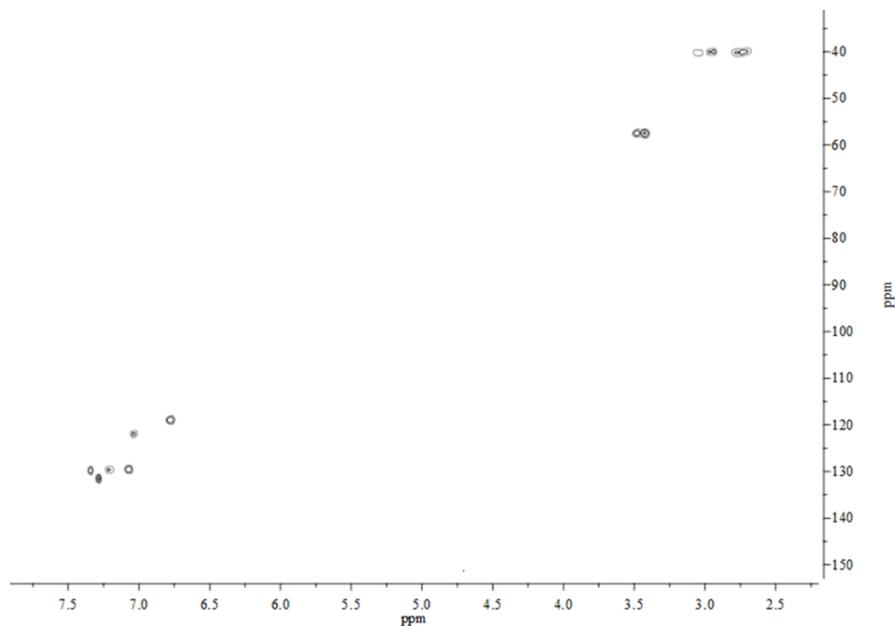


Figura 9.15. HSQC Tyr<sub>2</sub> en medio básico (D<sub>2</sub>O).

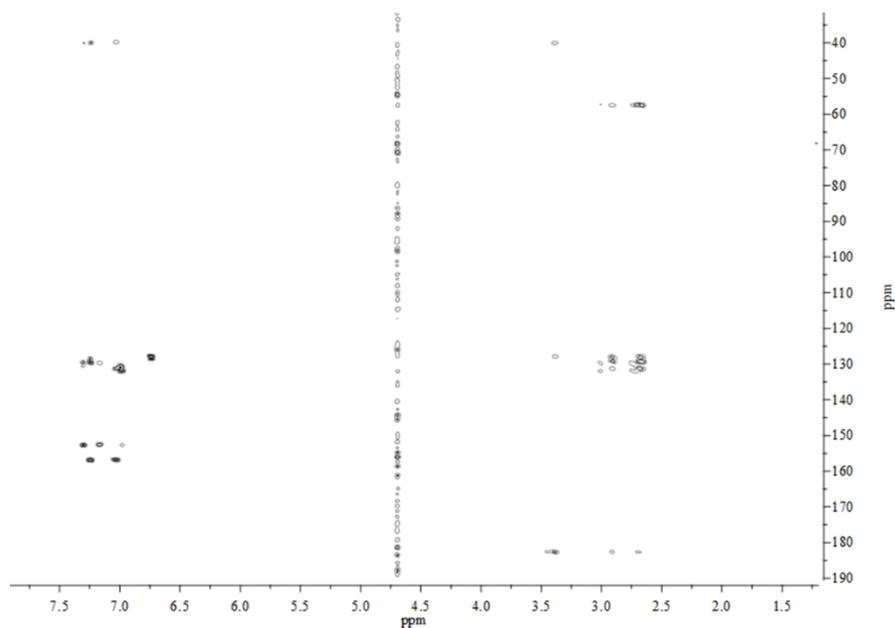
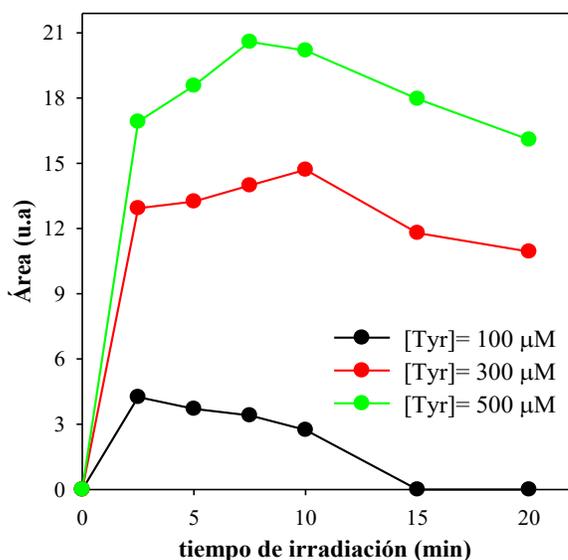


Figura 9.16. HMBC Tyr<sub>2</sub> en medio básico (D<sub>2</sub>O).

#### 9.4. Preparación de soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub>

Habiendo identificado de forma unívoca a Tyr<sub>2</sub>, se procedió a optimizar las condiciones de la reacción para mejorar la eficiencia de la reacción fotoquímica. Se utilizaron distintas mezclas de reacción y se irradiaron durante distintos períodos de tiempo (*Sistema de*

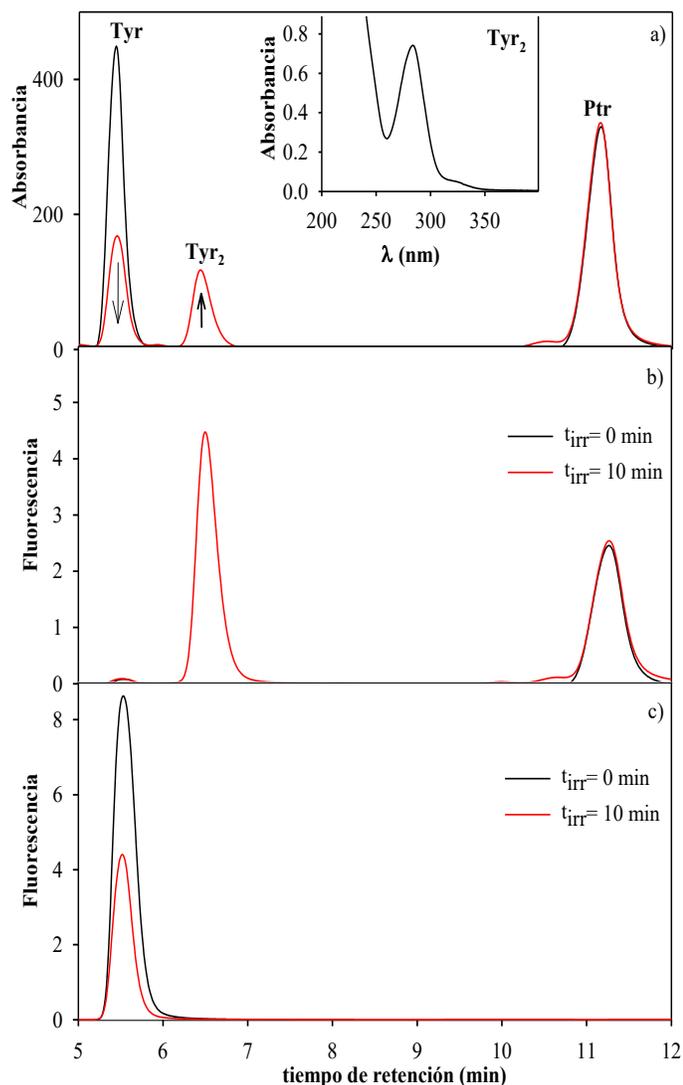
*Irradiación I, Sección 5.4.1*). Se prepararon soluciones acuosas de Tyr y Ptr a pH 5,5 variando las concentraciones del aminoácido (100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$ ), manteniendo fija la concentración del fotosensibilizador, debido a que su baja solubilidad no permite aumentar demasiado la concentración en la mezcla de reacción. Se realizó el análisis utilizando el HPLC-PDA y se cuantificó la formación de Tyr<sub>2</sub> a 280 nm. Como se puede observar en la Figura 9.17, la mejor condición para la generación de Tyr<sub>2</sub> es la relación 5:1 entre la concentración de Tyr y Ptr y el tiempo de irradiación óptimo es entre 8 y 10 minutos de irradiación, ya que se alcanza un máximo en la generación de Tyr<sub>2</sub> y luego, comienza a caer. Este comportamiento podría deberse tanto a un proceso fotosensibilizado como a una degradación por absorción directa. Sin embargo, considerando que la solución se encuentra pH 5,5 y que se excita a 350 nm donde la forma ácida de Tyr<sub>2</sub> no absorbe, el consumo de Tyr<sub>2</sub> se puede adjudicar a un daño fotosensibilizado por Ptr.



**Figura 9.17.** Cinética de formación de Tyr<sub>2</sub> a distintas concentraciones iniciales de Tyr. Condiciones de irradiación:  $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$ ;  $[\text{Tyr}]_0 = \text{variable}$ ; pH = 5,5;  $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$ . Condiciones cromatográficas: 100%  $\text{NH}_4\text{Ac}$  10 mM; pH 6,8; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 150 \mu\text{L}$ ; columna C12 (Jupiter Proteo 90A).

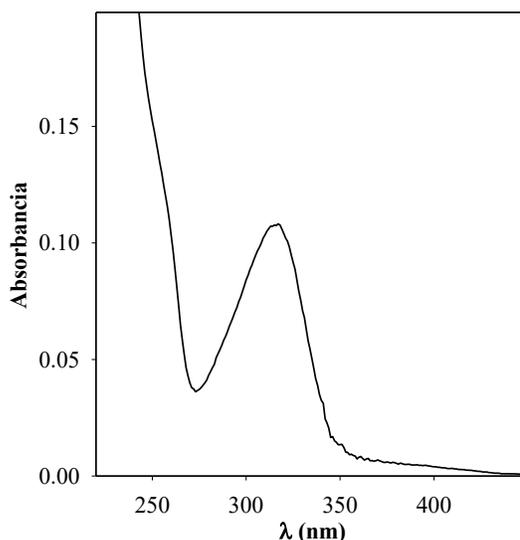
Una vez que se encontraron las condiciones óptimas en la relación de concentraciones de los reactivos y tiempo de irradiación, se buscó mejorar las corridas cromatográficas ya que en las condiciones utilizadas inicialmente (Figura 9.6), se trabajó a un pH de 6,8, el cual es muy cercano al valor del  $\text{pK}_a$  de Tyr<sub>2</sub>. En consecuencia, hay una contribución de las dos

formas ácido-base de Tyr<sub>2</sub> y mínimos cambios en el valor de pH producen diferencias en la concentración relativa de cada una de ellas, produciendo variaciones en el tiempo de retención y en el épsilon del producto, lo cual genera, a su vez, cambios en la intensidad de los picos cromatográficos. Por lo tanto, se llevó el pH a 6,0 y se bajó la concentración del buffer de 10 mM a 1 mM de manera de separar a Tyr<sub>2</sub> en condiciones lo más cercanas posible al agua. Se lograron separar correctamente los picos de Tyr, Ptr y Tyr<sub>2</sub> con ambas modificaciones (Figura 9.18.a) y se observó el cambio en el espectro de absorción de Tyr<sub>2</sub>: por un lado, se vio el aumento de la banda centrada en 283 nm, correspondiente a la forma ácida de Tyr<sub>2</sub> y por el otro, la disminución de la intensidad de la banda centrada a 315 nm, correspondiente a la forma alcalina (Inset Figura 9.18.a).



**Figura 9.18.** Cromatogramas registrados con el HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}}=280$  nm, **a**) y con el HPLC-FL ( $\lambda_{\text{exc}}=280$  nm/ $\lambda_{\text{em}}=405$  nm, **b**) y ( $\lambda_{\text{exc}}=275$  nm/ $\lambda_{\text{em}}=300$  nm, **c**) antes y después de 10 min de irradiación para una solución de Ptr y Tyr equilibrada con aire. Inset: espectro absorción de Tyr<sub>2</sub> a pH 6,0. Condiciones de irradiación: [Ptr]<sub>0</sub> = 100  $\mu\text{M}$ ; [Tyr]<sub>0</sub> = 500  $\mu\text{M}$ ; pH = 5,5. Condiciones de corrida: 100% NH<sub>4</sub>Ac 1 mM; pH 6,0; 0,6 mL/min; vol<sub>iny</sub>= 100  $\mu\text{L}$ ; columna C12 (Jupiter Proteo 90A).

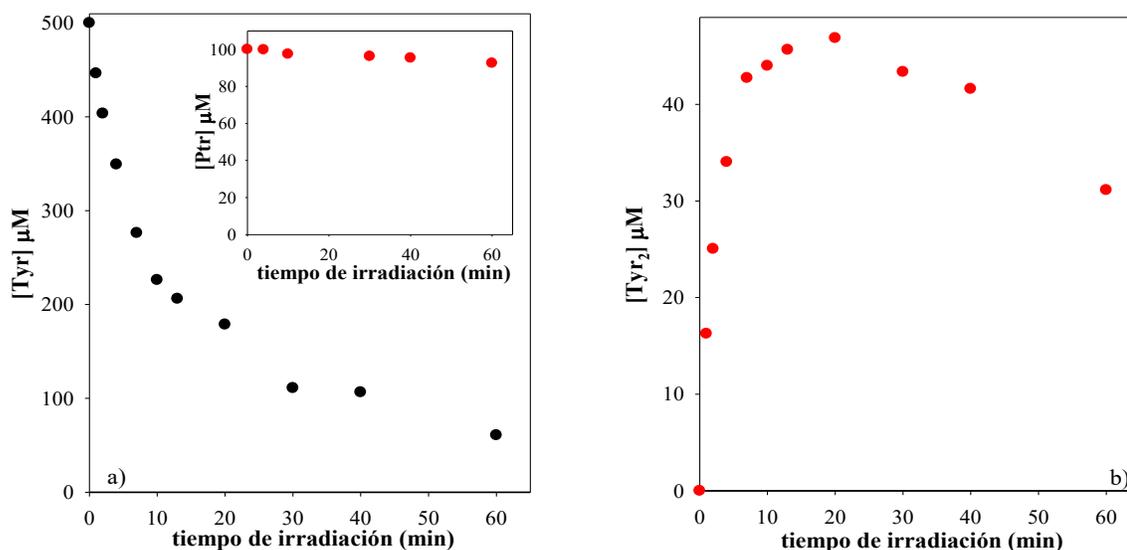
Se llevó a cabo el aislamiento de Tyr<sub>2</sub> en estas condiciones y se registró el espectro de absorción a pH alcalino (Figura 9.19). Luego, utilizando la ecuación de Lambert-Beer (Ecuación 5.1, *Sección 5.2.1*) y el valor reportado para el coeficiente de extinción molar a 315 nm para la forma alcalina de Tyr<sub>2</sub> ( $\epsilon_{\text{Tyr}_2}^{315} = (8380 \pm 30) \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),<sup>18</sup> se determinó la concentración de la muestras aisladas, obteniéndose un valor de 12  $\mu\text{M}$ .



**Figura 9.19.** Espectro de absorción de soluciones acuosas aisladas de [Tyr<sub>2</sub>] = 12  $\mu\text{M}$  a pH 9,5.

Se registraron los cromatogramas de las soluciones irradiadas de Tyr y Ptr utilizando el detector HPLC-FL (*Sección 7.1*), ya que permite ganar especificidad y sensibilidad. Se utilizaron dos condiciones distintas de excitación/emisión para registrar los cromatogramas:  $\lambda_{\text{exc}}= 280$  nm/ $\lambda_{\text{em}}= 405$  nm y  $\lambda_{\text{exc}}= 275$  nm / $\lambda_{\text{em}}= 300$  nm, para Tyr<sub>2</sub> y Tyr respectivamente. En la Figura 9.18.b se puede ver la aparición de un pico, luego de 10 minutos de irradiación, con un tiempo de retención compatible con el de Tyr<sub>2</sub>. En este cromatograma también se observa al pico correspondiente a Ptr, ya que también emite en estas condiciones. A su vez, en la Figura 9.18.c, se muestra el consumo del pico correspondiente a Tyr con el tiempo de

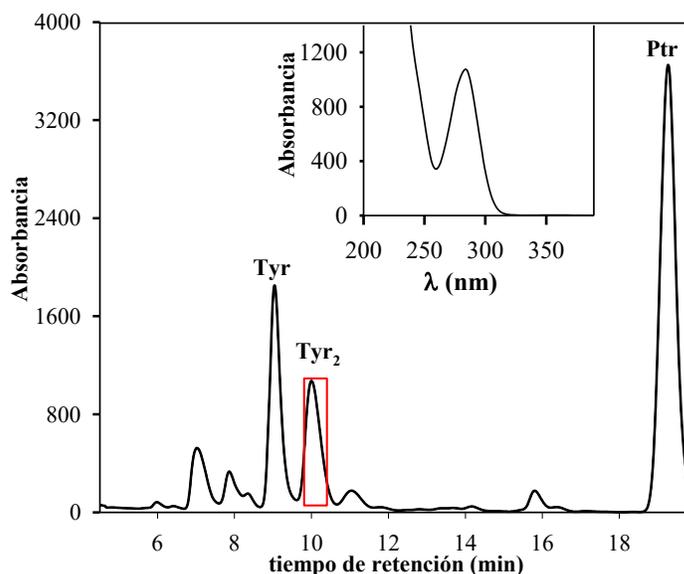
irradiación. A partir de soluciones de concentración conocida de Tyr<sub>2</sub>, Tyr y Ptr, se realizaron curvas de calibración en las mismas condiciones de corrida. Luego, al graficar la concentración de los reactivos en función del tiempo de irradiación (Figura 9.20.a), se observa el descenso de la concentración de Tyr, mientras que el fotosensibilizador se mantiene constante en los tiempos de irradiación estudiados (Inset Figura 9.20.a). La formación de Tyr<sub>2</sub> en función del tiempo de irradiación se muestra en la Figura 9.20.b.



**Figura 9.20.** a. Evolución de la concentración de Tyr ( $\lambda_{exc}=275/\lambda_{em}=300$  nm) y b) Tyr<sub>2</sub> ( $\lambda_{exc}=280/\lambda_{em}=405$  nm) en función del tiempo de irradiación. Inset: evolución de la concentración de Ptr con el tiempo de irradiación ( $\lambda_{ana}=340$  nm).

Si bien se logró favorecer la formación de Tyr<sub>2</sub> y se optimizaron las condiciones, el siguiente objetivo fue aislar las soluciones en agua y aumentar su concentración. Sin embargo, la columna analítica empleada hasta el momento no permitía realizar las corridas utilizando agua como solvente de corrida, ya que los picos de Tyr y Tyr<sub>2</sub> no se logran resolver. Además, el volumen de inyección no puede superar el 10% del volumen de la columna, es decir que, en la columna C12 utilizada no se puede inyectar más de 250 μl, lo cual era una limitación para el método. Por lo tanto, se decidió utilizar una columna semipreparativa Synergi Polar RP, que posee una alta estabilidad con fases móviles acuosas (Sección 7.1) y que permite aumentar el volumen de inyección. Se preparó la mezcla de

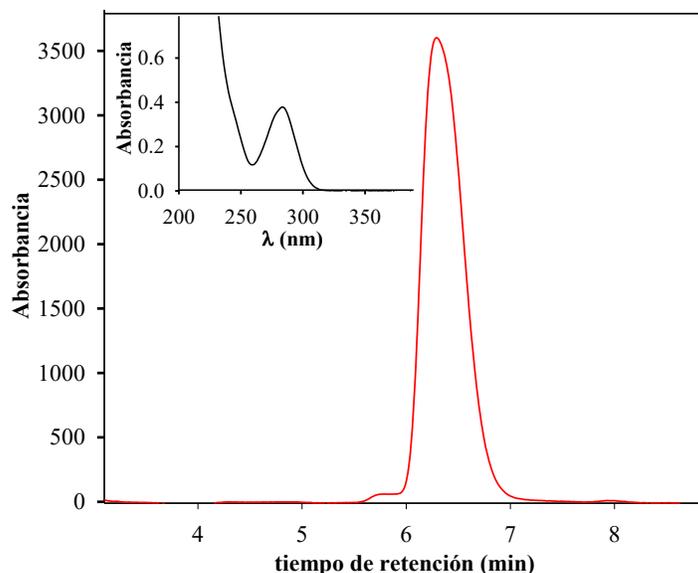
reacción de Tyr y Ptr en relación 5:1 a pH 5,5 y se corrió usando H<sub>2</sub>O a pH 3,0 como solvente de corrida, donde se lograron separar correctamente a los reactivos y a Tyr<sub>2</sub> (Figura 9.21). Se trabajó a un flujo de 2,5 mL/min y el volumen de inyección fue de 750  $\mu$ l. La etapa de aislamiento se realizó de la misma forma que en la *Sección 9.2*. En la Figura 9.21 se observa el rango de recolección empleado para el aislamiento y el espectro de absorción de Tyr<sub>2</sub>, donde se puede ver que al trabajar a un pH de 3,0, la banda centrada a 315 nm correspondiente a la forma alcalina desaparece (Inset Figura 9.21).



**Figura 9.21.** Cromatograma registrados con HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}}=280$  nm) para una solución de Ptr y Tyr equilibradas con aire. Inset: espectro absorción de Tyr<sub>2</sub> a pH 3,0. Condiciones de irradiación:  $[\text{Ptr}]_0 = 100$   $\mu$ M;  $[\text{Tyr}]_0 = 500$   $\mu$ M; pH = 5,5;  $\lambda_{\text{irr}} = 350$  nm. Condiciones cromatográficas: 100% H<sub>2</sub>O; pH 3,0; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 750$   $\mu$ L; columna semipreparativa Synergi Polar RP.

Para verificar la pureza de las muestras de Tyr<sub>2</sub> aisladas, por un lado, se inyectaron en una columna analítica Synergi RP (*Sección 7.1*) utilizando ácido fórmico (HCOOH) (25 mM a pH 3,3) como buffer de corrida (Figura 9.22), donde se observó la presencia de un único pico, cuyo espectro de absorción coincide con el de Tyr<sub>2</sub> en medio ácido. Por otro lado, la muestra aislada se llevó a pH 10,0, se registró el espectro de absorción y a partir de la ecuación de Lambert-Beer (Ecuación 5.1, *Sección 5.2.1*) se determinó la concentración de las muestras aisladas de Tyr<sub>2</sub>, obteniéndose un valor de 14  $\mu$ M. Si bien no se aumentó mucho la concentración con respecto a las soluciones de Tyr<sub>2</sub> aisladas con la columna analítica (12

$\mu\text{M}$ ), se aumentó el volumen obtenido por muestra aislada de 0,3 mL a 1,4 mL. Es decir, se aumentó la masa obtenida de 1,3  $\mu\text{g}$  a 7,1  $\mu\text{g}$  por muestra.



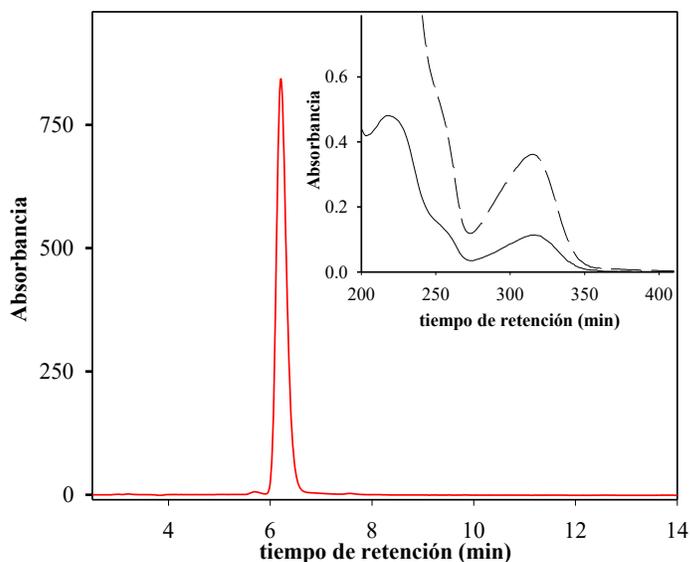
**Figura 9.22.** Cromatograma registrado con HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}}=280$  nm) para una muestra de Tyr<sub>2</sub> acuosa aislada equilibrada con aire. Inset: espectro absorción de Tyr<sub>2</sub> a pH 3,3.  $[\text{Tyr}_2]_0 = 14$   $\mu\text{M}$ . Condiciones cromatográficas: 100% HCOOH 25 mM; pH 3,3; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 150$   $\mu\text{L}$ ; columna analítica Synergi Polar RP.

Luego de medir la absorbancia de las soluciones aisladas de Tyr<sub>2</sub> en medio alcalino y de determinar su concentración, al conocer el volumen total obtenido en el aislamiento, se pudo calcular la masa de Tyr<sub>2</sub>. A su vez, si uno tiene en cuenta los moles de Tyr consumidos y la estequiometría de la reacción, a partir de la Ecuación 9.3, se pudo calcular un rendimiento del 19 ( $\pm 1\%$ ) para la reacción fotoquímica.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left( \frac{\text{moles de Tyr}_2 \text{ aislados} \times 2}{\text{moles de Tyr consumidos}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 9.3})$$

Una vez que se confirmó que las soluciones aisladas a partir de la columna semipreparativa utilizando H<sub>2</sub>O como solvente eran puras, se buscó concentrarlas para su posterior análisis con técnicas que requieren una masa de analito mayor. Para ello, se liofilizaron las soluciones de Tyr<sub>2</sub> para eliminar el solvente y luego, se resuspendieron en un volumen de agua menor. Se obtuvieron soluciones concentradas de hasta 180  $\mu\text{M}$ . A modo de ejemplo, en el Inset de la Figura 9.23, se muestra el espectro de absorción de una solución

acuosa de Tyr<sub>2</sub> 15  $\mu$ M antes y después de la liofilización. Como se puede ver, hay un aumento de la absorbancia a 315 nm al concentrar la solución y el espectro de absorción no se altera por este proceso. La solución final posee una concentración de 43  $\mu$ M. La muestra concentrada se analizó por HPLC-PDA, donde se verificó que la muestra de Tyr<sub>2</sub> no sufre daño en el proceso (Figura 9.23). Si uno calcula la masa inicial en los 11,0 mL de Tyr<sub>2</sub> (15  $\mu$ M) que se liofilizaron, se obtiene un valor de 59,5  $\mu$ g. Sin embargo, al resuspender el sólido resultante en 2,1 mL de agua, se obtuvo una solución de Tyr<sub>2</sub> 43  $\mu$ M, es decir, una masa de 32,5  $\mu$ g. Por lo tanto, si bien al liofilizar la solución se gana en concentración, se pierde masa en el proceso.



**Figura 9.23.** Cromatograma registrado con HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}}=280$  nm) para una muestra de Tyr<sub>2</sub> (43  $\mu$ M) acuosa concentrada luego del proceso de liofilización. Condiciones cromatográficas: 100% HCOOH 25 mM; pH 3,3; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}}=50$   $\mu$ L; columna analítica Synergi Polar RP. Inset: espectros de absorción de soluciones acuosas aisladas de Tyr<sub>2</sub> antes (línea continua) y después de la liofilización (línea discontinua) a pH=10,0.

## **Bibliografía**

- <sup>1</sup> D.A. Malencik, Anderson, S. R., *Biochemistry.*, **26**, 695-704, 1987
- <sup>2</sup> C.A. Hutton, O. Skaff, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 4895-4898, 2003.
- <sup>3</sup> H. Eickhoff, *et.al*, *Tetrahedron.*, **57**, 353-364, 2001.

- 
- <sup>4</sup> D. Lee, *et.al*, *Process Biochem.*, **43**, 999-1003, 2008.
- <sup>5</sup> A. J. Gross, *et.al*, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1611-1614, 1959.
- <sup>6</sup> S. O. Andersen, *et.al*, *Acta Physio. Scand.*, **66**, 1-81, 1966.
- <sup>7</sup> V. Malanik, *et.al*, *Prep. Biochem.*, **9**, 273-280, 1979.
- <sup>8</sup> C. Castaño, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **89**, 1448-1455, 2013.
- <sup>9</sup> A. H. Thomas, *et.al*, *J. Photochem Photobiol. B.*, **120**, 52-58, 2013.
- <sup>10</sup> M. P. Serrano, *et.al*, *ChemPhysChem.*, **16**, 2244-2252, 2015.
- <sup>11</sup> M.P. Serrano, Tesis doctoral; La Plata; 2014.
- <sup>12</sup> G. Petroselli, *et.al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 3001-3011, 2008.
- <sup>13</sup> R.V. Bensasson, *et.al*, Pergamon Press, Oxford, **chapter 4**, 93-120, 1983.
- <sup>14</sup> A. Harriman, *J. Phys. Chem.*, **91**, 6102-6106, 1987.
- <sup>15</sup> Q-H. Song, K. C. Hwang, *J. Photochem. Photobiol. A.*, **185**, 51-56, 2007.
- <sup>16</sup> V.D. Monópoli, *et.al*, *Int. J. Chem. Kinet*, **32**, 231-237, 2000.
- <sup>17</sup> S. O. Andersen, *Biochim. Biophys. Acta.*, **69**, 249-262, 1963.
- <sup>18</sup> D. A. Malencik, *et.al*, *Anal. Biochem.*, **242**, 202-213, 1966.



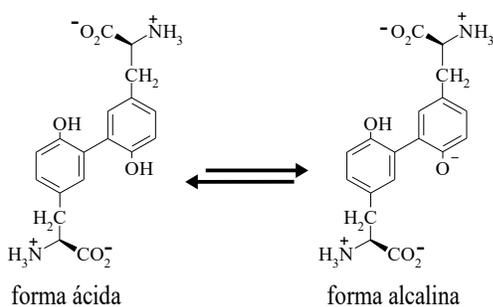
# CAPÍTULO 10

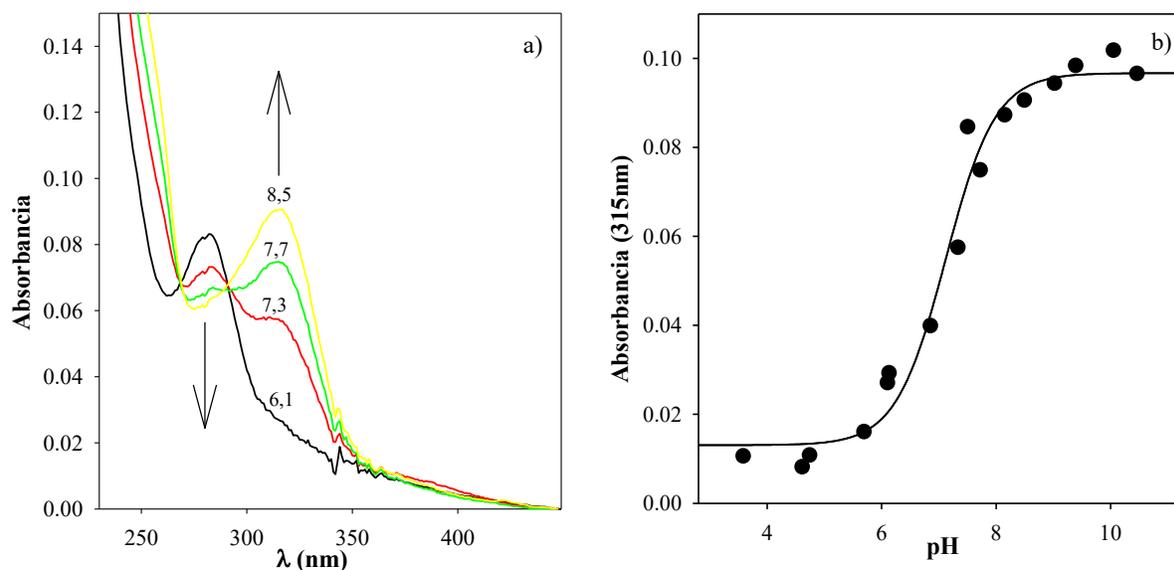
## PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE DÍMEROS DE TIROSINA

El objetivo de este capítulo fue estudiar las propiedades espectroscópicas de las soluciones acuosas puras de Tyr<sub>2</sub> aisladas por el método descripto previamente (Capítulo 9). Su caracterización fotofísica se realizó mediante el registro de los espectros de absorbancia, emisión y excitación, tiempo de vida de fluorescencia ( $\tau_F$ ) y rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\Phi_F$ ).

### 10.1. Determinación del pK<sub>a</sub>

Se llevo a cabo a la determinación del pK<sub>a</sub> mediante el análisis por espectroscopía UV/Vis (*Sección 6.1*). Se ha reportado previamente que los grupos fenoles de Tyr<sub>2</sub> son mucho más ácidos que los de Tyr y que, como se mencionó previamente en el Capítulo 2, tiene dos formas ácido-base, las cuales poseen características espectrales bien diferenciadas, con un máximo de absorción a 283 nm para la forma ácida y a 315 nm para la forma alcalina (Esquema 10.1).<sup>1,2</sup> Por lo tanto, se registraron los espectros de absorción de las soluciones aisladas a distintos valores de pH (3,5-10,0) (Figura 10.1.a) y se graficó la variación de la absorbancia a 315 nm en función del pH (Figura 10.1. b), con el fin de hacer una titulación espectrofotométrica, como se detalla en la *Sección 6.1.1*. Esto se realizó para distintas longitudes de onda, en el rango de 310-320 nm, para luego realizar el ajuste de las curvas obtenidas con la Ecuación 6.1. A partir de las constantes obtenidas se calculó una constante promedio ( $K_a$ ) y su pK<sub>a</sub>, alcanzado un valor de 7,25 ( $\pm 0,05$ ), el cual coincide perfectamente con el valor reportado de 7,3.<sup>3</sup>



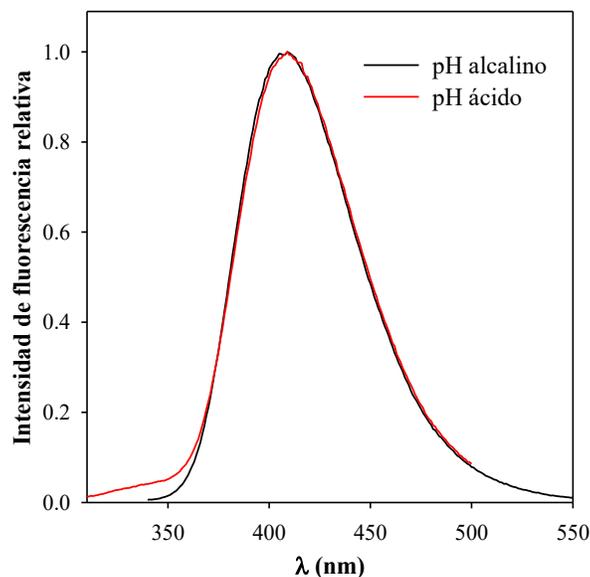
**Esquema 10.1.** Equilibrio ácido-base de Tyr<sub>2</sub> en solución acuosa de pH entre 3,0 y 10,0.

**Figura 10.1.a.** Espectro de absorción de soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> (10 μM) a diferentes valores de pH. Los valores de pH se encuentran sobre cada espectro. **b)** Curva de titulación a 315 nm. La línea negra representa el ajuste realizado con la Ecuación 6.1, *Sección 6.1.1*.

## 10.2. Fluorescencia

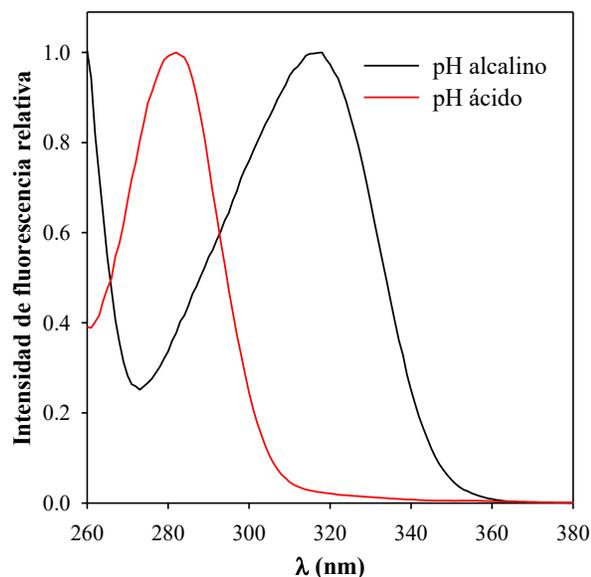
### 10.2.1. Fluorescencia estacionaria

La fluorescencia de Tyr<sub>2</sub> y su emisión característica se utiliza para detectar su formación en péptidos y proteínas y como marcador inespecífico de daño oxidativo.<sup>2,4</sup> Sin embargo, son escasos los trabajos de fluorescencia de soluciones acuosas puras de Tyr<sub>2</sub> reportados en la literatura.<sup>2,5</sup> Por lo tanto, se midieron los espectros de fluorescencia de las soluciones acuosas aisladas de Tyr<sub>2</sub> (14 μM) en condiciones ácidas (pH 4,5 ± 0,1) y alcalinas (pH 9,5 ± 0,1) excitando a 280 nm y 315 nm, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 10.2, los espectros de emisión son idénticos, con un máximo de emisión centrado en 410 nm. Este resultado permite concluir que al no verse afectados los espectros de emisión por el cambio pH, la especie emisora es la misma, es decir, el estado excitado singlete de la forma ionizada.<sup>6</sup> Los espectros de emisión de la forma ácida se midieron a valores de pH comprendidos entre 3,5 y 6,9. Teniendo en cuenta que hasta pH 3,5 no se observaron cambios en los espectros de emisión, este resultado sugiere que el pK<sub>a</sub>\* está por debajo de este valor, lo cual coincide con lo reportado en literatura.<sup>7</sup>



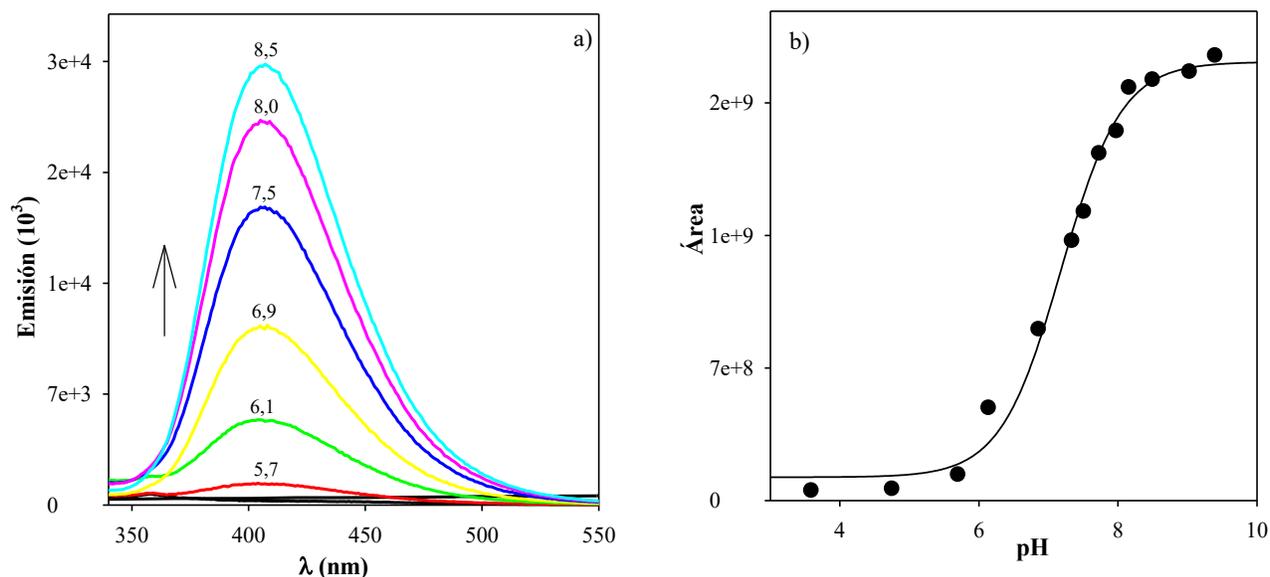
**Figura 10.2.** Espectro normalizado de emisión de soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> en medio ácido (pH= 4,5) y alcalino (pH= 9,5), obtenidos luego de excitar a 280 nm y 315 nm, respectivamente. [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 14 μM.

A diferencia de los resultados obtenidos para los espectros de emisión, al medir los espectros de excitación siguiendo la emisión a 410 nm en medio ácido y alcalino, se puede observar el corrimiento del máximo de 280 a 315 nm al aumentar el pH (Figura 10.3). Estos datos concuerdan con lo reportado en literatura<sup>2,4</sup> y con sus correspondientes espectros de absorción.



**Figura 10.3.** Espectro normalizado de excitación ( $\lambda_{em} = 410$  nm) de soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> en medio ácido (pH = 4,5) y alcalino (pH = 9,5). [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 14 μM.

Teniendo en cuenta la fluorescencia que presenta Tyr<sub>2</sub>, se registraron los espectros de emisión a diferentes pH de soluciones acuosas aisladas de Tyr<sub>2</sub>, con el fin de determinar el pK<sub>a</sub> de la muestra mediante una titulación espectrofluorométrica (*Sección 6.2.2.1*). Estas medidas se realizaron en paralelo a las medidas de absorbancia, excitando a 315 nm, de manera de excitar solamente a la forma alcalina. Se integró el área debajo de la curva de los espectros de emisión obtenidos para los distintos valores de pH y se graficaron los valores de área en función del pH. Se determinó el pK<sub>a</sub>, a partir del ajuste de la curva con la Ecuación 6.15, obteniéndose un valor de 7,18 (±0,02) que coincide con el obtenido por medias de absorbancia (Figura 10.4.b). La titulación se repitió excitando a 280 nm, sin embargo, la diferencia de emisión es baja debido a que en estas condiciones absorben las dos formas ácido-base y el cambio de absorbancia ( $\epsilon$ ) se contrapone al del rendimiento cuántico. Sin embargo, el valor de pK<sub>a</sub> obtenido del ajuste fue el mismo que al excitar a 315 nm. Por lo tanto, se titula el estado fundamental, ya que si uno quisiera titular el estado excitado, se debería excitar a la forma ácida a valores de pH menores a 3,0.



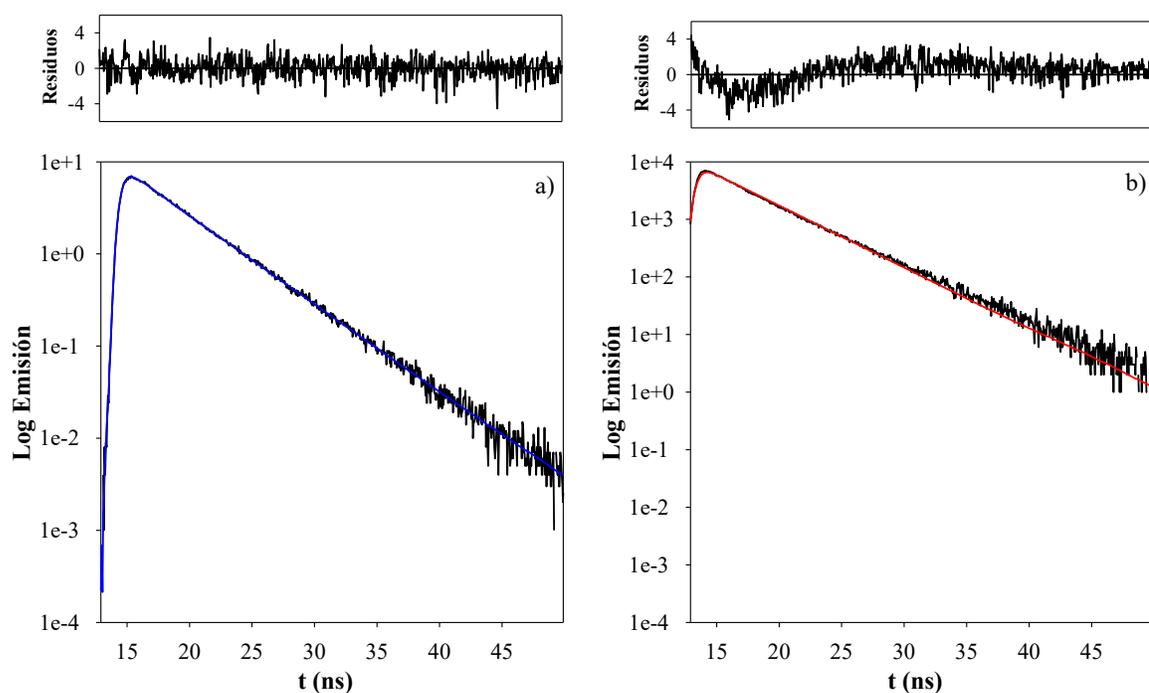
**Figura 10.4.a.** Espectro de emisión de soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) puras a diferentes valores de pH ( $\lambda_{exc}$ = 315 nm) y **b)** curva de titulación espectrofluorométrica. La línea negra representa al ajuste realizado con la Ecuación 6.15, *Sección 6.2.2.1*.

### 10.2.2. Fluorescencia resuelta en el tiempo

Se midieron los decaimientos de emisión de fluorescencia tanto para la forma ácida como la alcalina de las soluciones acuosas aisladas de Tyr<sub>2</sub>, utilizando un NanoLED de 295 nm y otro

de 341 nm como fuente de excitación, respectivamente. Los decaimientos se registraron a 410 nm y las señales obtenidas se ajustaron con una ecuación monoexponencial (*Sección 6.2.3*), obteniéndose un tiempo de vida ( $\tau_F$ ) de 4,0 ( $\pm 0,1$ ) ns y 4,4 ( $\pm 0,1$ ) ns para la forma ácida y alcalina, respectivamente (Figura 10.5). Estos resultados difieren de trabajos publicados previamente, donde se encuentra reportado que el decaimiento de fluorescencia de Tyr<sub>2</sub> tiene un ajuste biexponencial.<sup>5</sup> Esta diferencia se podría atribuir a la pureza que se logró alcanzar en nuestras soluciones acuosas aisladas con el método de síntesis y aislamiento utilizado.

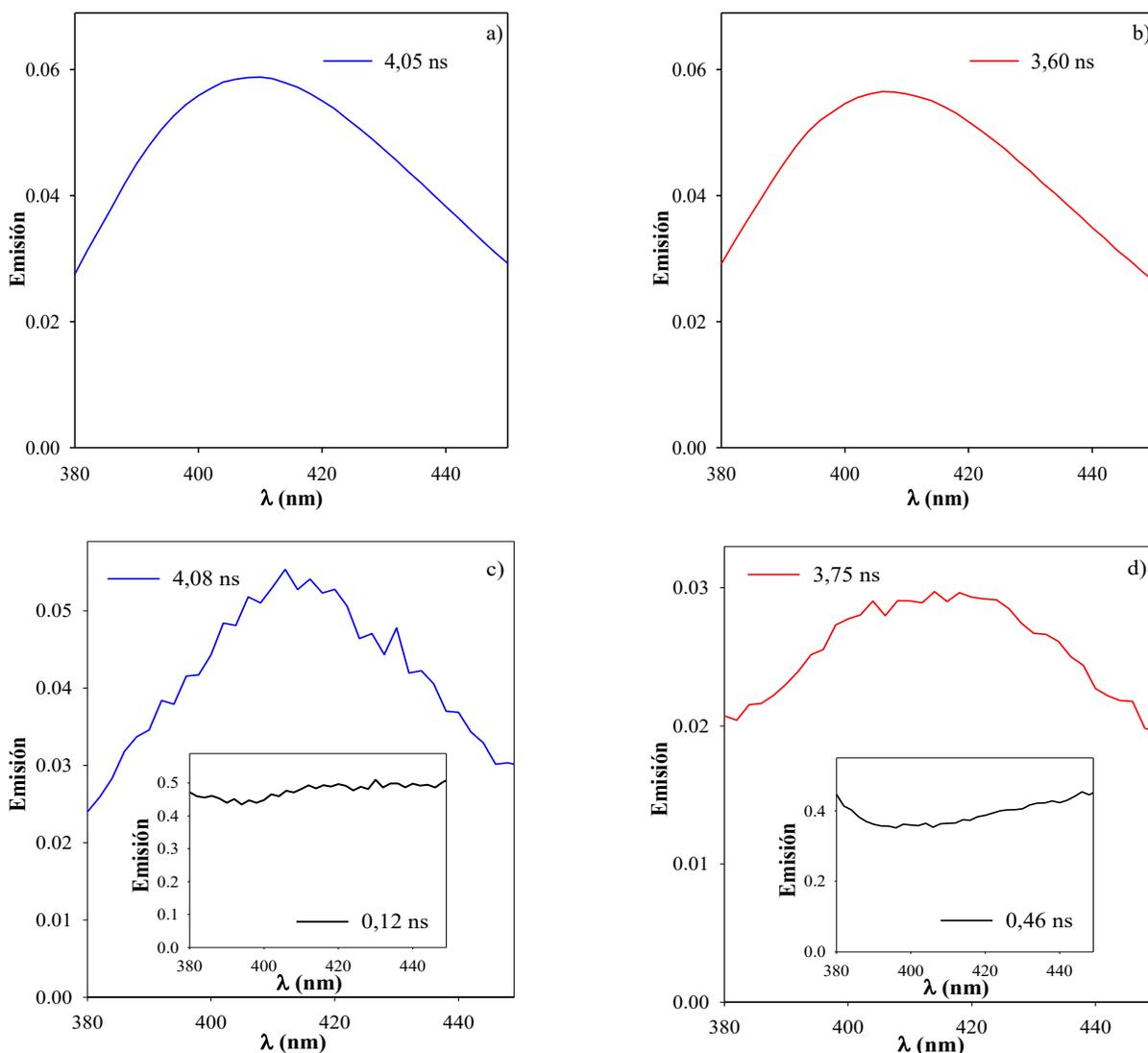
Por otro lado, la diferencia del valor del  $\tau_F$  en medio ácido con respecto al mismo en medio alcalino se puede explicar por la presencia de protones en el medio, ya que pueden actuar como desactivadores de la fluorescencia de Tyr<sub>2</sub> y así disminuir el valor de  $\tau_F$  en medio ácido.



**Figura 10.5.** Decaimientos de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{em} = 410$  nm) y ajuste monoexponencial de soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> a pH= 9,5 (a) y pH= 5,5 (b). [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 17  $\mu$ M.

Se realizaron medidas de espectros TRES (*Sección 6.2.3.1*) de las soluciones acuosas aisladas de Tyr<sub>2</sub> ácidas y alcalinas, excitando las muestras con un NanoLED de 295 y 341 nm, respectivamente. La emisión se registró entre 380 y 450 nm cada 2 nm. Se calculó el espectro de emisión registrado a partir del cambio de los factores pre-exponenciales con la  $\lambda_{em}$ , para un determinado tiempo, luego de la excitación con el NanoLED. En la Figura 10.6 se muestran los

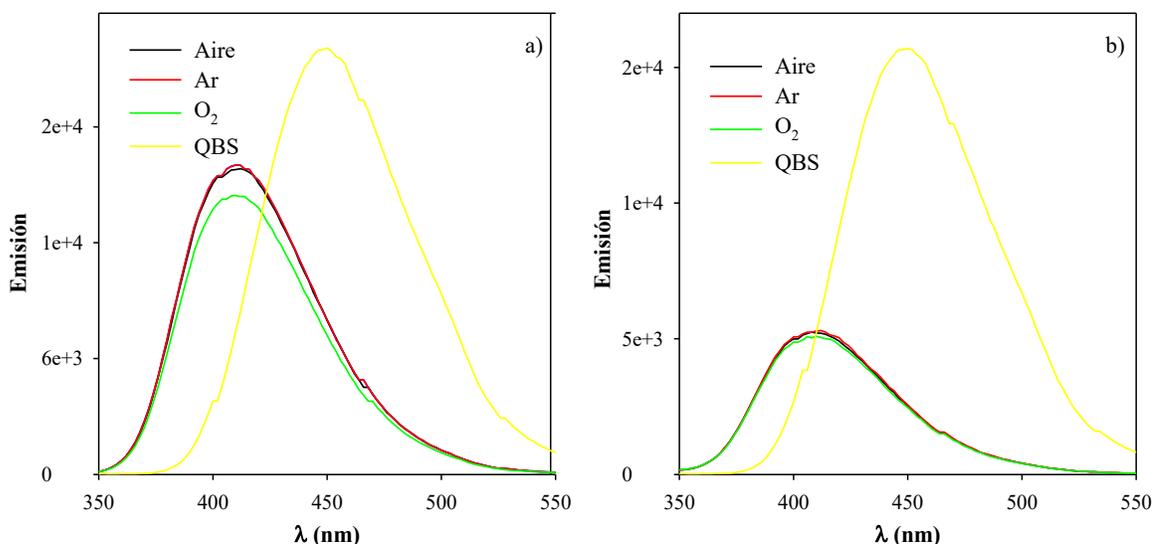
espectros calculados de esta forma para el ajuste monoexponencial y biexponencial de las soluciones de Tyr<sub>2</sub> a ambos pH. El espectro de emisión correspondiente a la componente obtenida en el ajuste monoexponencial a ambos valores de pH, presenta una banda centrada en 410 nm, que se corresponde con el espectro de emisión de Tyr<sub>2</sub> (Figura 10.6.a y b). En la Figura 10.6.c y d, se puede observar que al graficar los factores pre-exponenciales asociados a cada componente del ajuste biexponencial, solo uno de ellos se puede asociar a una especie, cuyo espectro coincide con el observado para la componente obtenida de los decaimientos monoexponenciales.



**Figura 10.6.** Variación de los factores pre-exponenciales de una solución acuosa aislada de Tyr<sub>2</sub> con un ajuste monoexponencial en medio alcalino (pH= 9,5, **a**) y ácido (pH= 5,5, **b**) y con un ajuste biexponencial en medio alcalino (pH= 9,5, **c**) y ácido (pH= 5,5, **d**). [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>:17  $\mu$ M

### 10.2.3. Rendimiento cuántico de fluorescencia

Se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) para la forma ácida y alcalina en distintas atmósferas, es decir, en ausencia de  $O_2$ , en aire y en condiciones saturadas de  $O_2$ . Como se detalla en la *Sección 6.2.2*, se utilizó quinina bisulfato (QBS) como patrón de fluorescencia y luego, se midieron los espectros de emisión de la forma ácida y alcalina de  $Tyr_2$  y de QBS excitando a 295 nm. Se trabajó a esta longitud de onda porque se corresponde al punto isobéptico de los espectros de absorción de las dos formas ácido-base (Figura 10.7).



**Figura 10.7.** Espectros de emisión de  $Tyr_2$  y QBS en distintas atmósferas en medio alcalino (pH= 9,5, a) y medio ácido (pH= 5,5, b).  $\lambda_{exc}$ = 295 nm.  $[Tyr_2]_0$ : 14  $\mu$ M.

Como se puede ver en la Tabla 10.1, no se observan diferencias en los valores de  $\Phi_F$ , dentro del error experimental, para ninguna de las formas ácido-base al cambiar la concentración de  $O_2$ . Por lo tanto, se puede concluir que al no ser el  $\Phi_F$  dependiente de la concentración de  $O_2$  en el medio, este último no actúa como desactivador del estado singlete excitado. Este resultado era esperable teniendo en cuenta los  $\tau_F$  de  $Tyr_2$ , ya que cuando el  $\tau$  de una especie es menor a 10 ns, no se observa *quenching* a concentraciones mM, aunque el proceso sea del orden difusional.

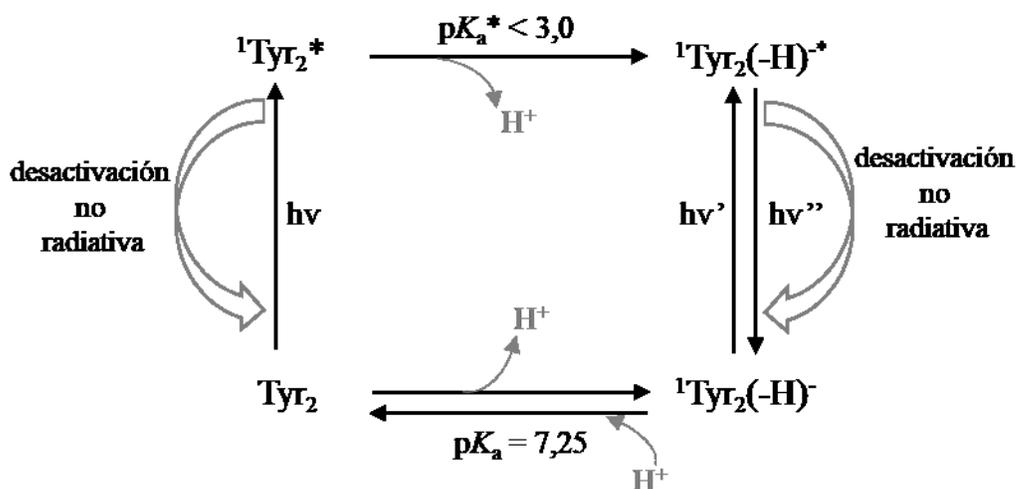
Al analizar la diferencia de los valores de  $\Phi_F$  de la forma ácida y alcalina, se puede observar que la primera posee un valor más bajo. Esto sugiere que cuando la forma ácida se excita, no toda la población del estado singlete excitado sufre una deprotonación para alcanzar la forma básica y cierta proporción del estado excitado se desactiva antes de ionizarse. Una eficiente desactivación no radiativa del estado singlete excitado antes de la deprotonación podría explicar el valor más

bajo del  $\Phi_F$  para la forma ácida, en comparación con el  $\Phi_F$  de la forma básica.

Forma ácido-base	$\lambda_F$ (nm) ( $\pm 2$ )	$\Phi_F(O_2)$	$\Phi_F(Ar)$	$\Phi_F(Aire)$	$\tau_F$ (ns) ( $\pm 0,1$ )
Ácida	410	0,29( $\pm 0,02$ )	0,29( $\pm 0,02$ )	0,28( $\pm 0,02$ )	4,0
Básica	410	0,42( $\pm 0,02$ )	0,46( $\pm 0,03$ )	0,46( $\pm 0,02$ )	4,4

**Tabla 10.1.** Rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) en soluciones acuosas saturadas en Ar, equilibradas en aire y saturadas en  $O_2$ , tiempos de vida de fluorescencia ( $\tau_F$ ) y máximo de fluorescencia ( $\lambda_F$ ) de Tyr<sub>2</sub> a pH 5,5 y 9,5.

A modo de conclusión, en el Esquema 10.2, se pueden observar los equilibrios ácido-base de los distintos estados excitados de Tyr<sub>2</sub>, luego de su exposición a radiación UV.



**Esquema 10.2.** Equilibrios ácido-base de los distintos estados excitados de Tyr<sub>2</sub>.

**Bibliografía**

- <sup>1</sup>S. O. Andersen, *et.al*, *Acta Physio. Scand.*, **66**, 1-81, 1966
- <sup>2</sup>D. A. Malencik, *et.al*, *Anal. Biochem.*, **242**, 202-213, 1966.
- <sup>3</sup>S. O. Andersen, *Biochim. Biophys. Acta.*, **69**, 249-262, 1963.
- <sup>4</sup>R. Amado, *et.al*, *Methods Enzymol.*, **107**, 377-388, 1984.
- <sup>5</sup>S. F. Mahamoud, *et.al*, *Appl. Spectrosc.*, **49**, 1669-1676, 1995.
- <sup>6</sup>S. S. Lehrer, G. D. Fasman, *Biochemistry*, **6**, 757-767, 1967.
- <sup>7</sup>D. A. Malencik, S. R. Anderson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 60-66, 1991.

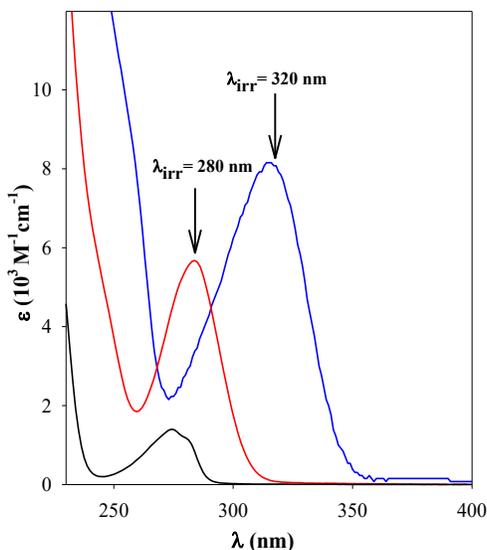
# CAPÍTULO 11

## FOTOQUÍMICA DE DÍMEROS DE TIROSINA

Al formarse Tyr<sub>2</sub> *in vivo* dentro de una proteína se genera un nuevo cromóforo que, a diferencia de los aminoácidos naturales, puede absorber a longitudes de onda presentes tanto en la radiación solar como en fuentes de luz artificiales. Esto se debe a que los grupos fenoles de Tyr<sub>2</sub> son más ácidos que los de Tyr y a la diferencia espectral entre sus dos formas ácido-base (*Sección 2.2.4*), ya que a pH fisiológico más del 50% de Tyr<sub>2</sub> se encuentra en su forma básica, la cual es capaz de absorber radiación UV-B y UV-A. El objetivo de este capítulo fue estudiar la fotoquímica de Tyr<sub>2</sub> en soluciones acuosas puras. Con este fin, primero se estudió si Tyr<sub>2</sub> era capaz de sufrir cambios químicos cuando es expuesto a radiación UV y se determinó el rendimiento cuántico de fotodegradación ( $\Phi_{\text{Tyr}_2}$ ) de sus formas ácida y alcalina. Luego, se llevó a cabo el estudio y caracterización de los fotoproductos generados.

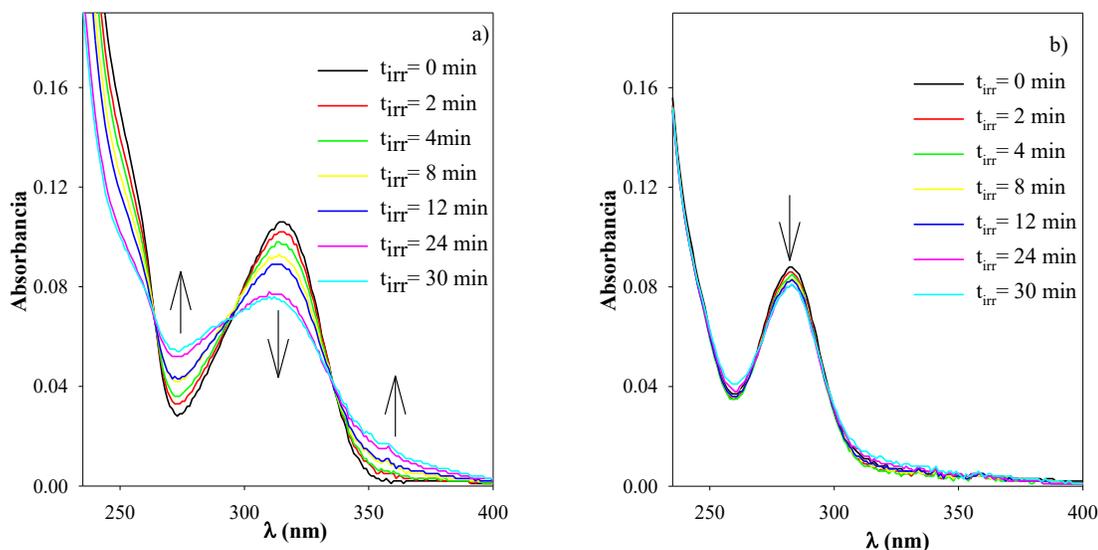
### 11.1. Fotodegradación de Tyr<sub>2</sub>

El primer objetivo de este estudio fue evaluar si Tyr<sub>2</sub> era capaz de sufrir degradación como consecuencia de la absorción directa de radiación UV. Para ello, se prepararon soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> provenientes del aislamiento de corridas cromatográficas, como se detalla en la *Sección 9.4*. Se ajustó el pH de estas soluciones de concentración aproximadamente 14  $\mu\text{M}$ , para poder estudiar en forma independiente la fotodegradación de las formas ácido-base. Las muestras se irradiaron en celdas de cuarzo de 0,4 cm de paso óptico por diferentes períodos de tiempo (*Sistema de irradiación III, Sección 5.4.1*) y las soluciones ácidas y alcalinas se excitaron a 280 y 320 nm, respectivamente (Figura 11.1). Finalmente, las soluciones irradiadas se analizaron por diferentes técnicas tales como espectroscopía UV-Vis, HPLC-PDA y HPLC-FL (*Sección 7.1*).



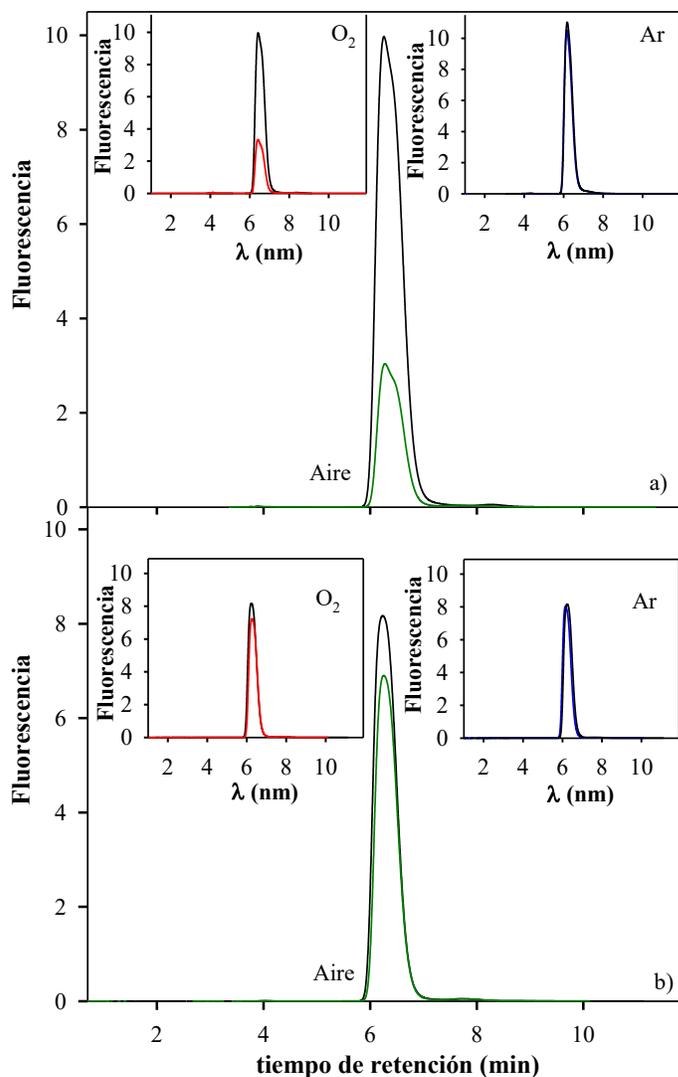
**Figura 11.1.** Espectro de absorción de Tyr (línea negra) y de Tyr<sub>2</sub> en agua a pH= 5,0 (línea roja) y a pH= 10,0 (línea azul).

Como se muestra en la Figura 11.2.a, se observaron cambios significativos en los espectros de absorción de las soluciones irradiadas en medio alcalino luego de exponerlos a radiación por un período de hasta 30 minutos. En particular, se observa el descenso de absorbancia de la banda centrada a 315 nm, correspondiente al reactivo, y un aumento en la zona de longitudes de onda entre 350 nm y 400 nm indicando que se generan productos que absorben en esta región del espectro. Por otro lado, en los espectros de absorción de las soluciones irradiadas en medio ácido, luego de exponerlos a irradiación durante 30 minutos, solamente se pueden ver pequeños cambios en la banda centrada a 280 nm, correspondiente al reactivo (Figura 11.2 b).



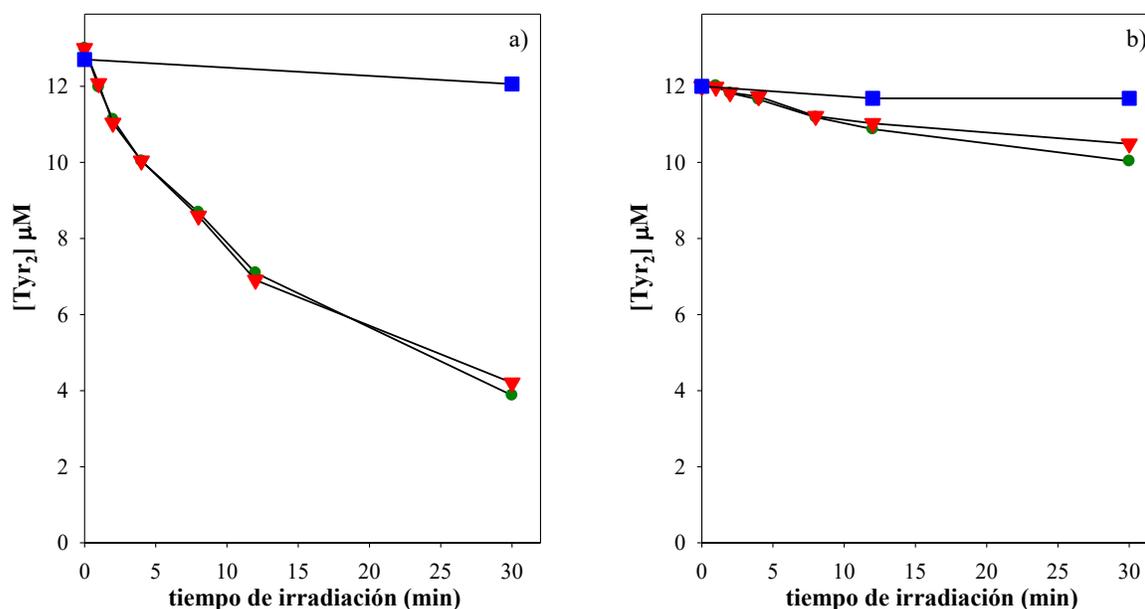
**Figura 11.2.** Espectro de absorción de soluciones acuosas aireadas de Tyr<sub>2</sub> en medio alcalino (pH= 9,5, **a**) y ácido (pH 5,5, **b**) irradiadas a 320 nm y 280 nm, respectivamente, durante diferentes períodos de tiempo. [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 14 μM.

Se irradiaron soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> (14 μM) en distintas atmósferas, es decir, en ausencia de O<sub>2</sub>, equilibrada en aire y saturada en O<sub>2</sub> por medio del análisis por HPLC–FL. Las fotólisis se realizaron a pH 5,5 y 9,5 para analizar por separado la fotodegradación de cada una de las formas ácido-base. Las corridas cromatográficas se realizaron utilizando 100% ácido fórmico a pH 3,5 como buffer de corrida, con el fin de tener una única forma ácido-base y así utilizar las condiciones características de excitación/emisión de la forma ácida de Tyr<sub>2</sub> ( $\lambda_{exc}= 280 \text{ nm}/\lambda_{em}= 410 \text{ nm}$ ). En la Figura 11.3, se muestran los cromatogramas de las soluciones de Tyr<sub>2</sub> antes y después de 30 minutos de irradiación, donde se puede observar que en medio alcalino (Figura 11.3.a), el consumo es mayor que en medio ácido (Figura 11.3.b). Además, en ambas condiciones de pH, Tyr<sub>2</sub> no se consume en ausencia de O<sub>2</sub>, lo cual sugiere que la fotodegradación es una oxidación en la que participa el O<sub>2</sub> disuelto en el medio. Cabe aclarar que no se observó la formación de ningún fotoproducto que emita en las mismas condiciones que Tyr.



**Figura 11.3.** Cromatogramas registrados con el HPLC-FL ( $\lambda_{exc}= 280$  nm,  $\lambda_{em}= 410$  nm) antes y después de 30 min de irradiación para soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> a pH 9,5 (a) y a pH 5,5 (b) en distintas atmósferas. Condiciones cromatográficas: 100% HCOOH 25 mM; pH 3,5; 0,6 mL/min;  $vol_{iny}= 150$   $\mu$ L; columna analítica Synergi Polar RP.

Se cuantificó el consumo de Tyr<sub>2</sub> en función del tiempo de irradiación en presencia de distintas concentraciones de O<sub>2</sub> (Figura 11.4). Al analizar las cinéticas de consumo obtenidas se puede concluir que Tyr<sub>2</sub> es fotoestable en condiciones anaeróbicas. Por otro lado, no se encontraron diferencias en el consumo de Tyr<sub>2</sub> en las soluciones equilibradas en aire con respecto a las saturadas en O<sub>2</sub> y la forma alcalina se degrada mucho más rápidamente que la ácida.



**Figura 11.4.** Evolución de la concentración de Tyr<sub>2</sub> en función del tiempo de irradiación de soluciones acuosas equilibradas en aire (●), saturadas en O<sub>2</sub> (▼) y en ausencia de O<sub>2</sub> (■) a pH 9,5 (a) y pH 5,5 (b). (HPLC-FL: λ<sub>exc</sub>= 280 nm, λ<sub>em</sub>= 410 nm).

## 11.2. Rendimiento cuántico de fotodegradación

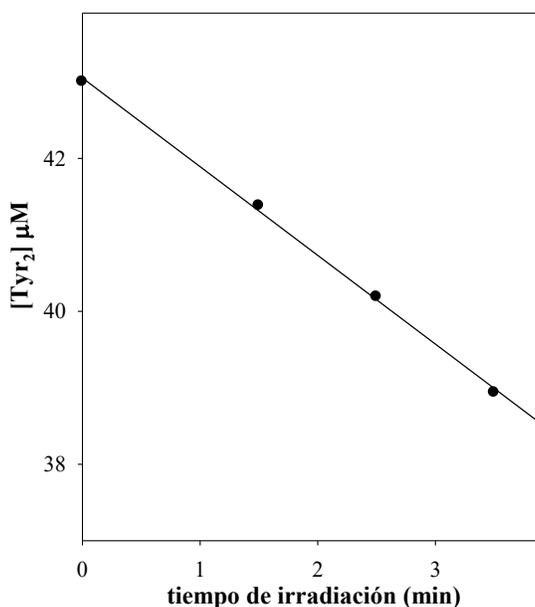
Se determinó el rendimiento cuántico de fotodegradación de Tyr<sub>2</sub> ( $\Phi_{\text{-Tyr}_2}$ ) utilizando la Ecuación 11.1:

$$\Phi_{(-\text{Tyr}_2)} = \frac{\left(-\frac{d[\text{Tyr}_2]}{dt}\right)_0}{q_{n,p}^{a,v}} \quad (\text{Ecuación 11.1})$$

Donde  $\left(-\frac{d[\text{Tyr}_2]}{dt}\right)_0$  es la velocidad inicial de consumo y  $q_{n,p}^{a,v}$  es el flujo de fotones incidentes absorbidos.

Para ello, se irradiaron soluciones aireadas ácidas y alcalinas de Tyr<sub>2</sub> a 280 nm y 320 nm, respectivamente, y luego se determinaron las velocidades iniciales de consumo a partir de la gráfica de concentración de Tyr<sub>2</sub> en función del tiempo de irradiación. Este cálculo se realizó considerando que, durante el tiempo del experimento, el  $q_{n,p}^{a,v}$  es constante (Sección 5.5), la  $\left(-\frac{d[\text{Tyr}_2]}{dt}\right)_0$  sea lineal y la absorbancia de Tyr<sub>2</sub> no cambie en más del 15%. Para nuestro sistema, se eligieron los puntos correspondientes a los primeros 5 minutos de irradiación de la forma alcalina y los primeros 10 minutos para la forma ácida. Se calcularon los valores de  $\Phi_{\text{-Tyr}_2}$  para la forma ácida y la forma alcalina de Tyr<sub>2</sub>, obteniéndose valores de  $0,023 \pm 0,003$  y  $0,0053 \pm 0,0005$ ,

respectivamente. Al comparar estos valores con el  $\Phi$  reportado para la fotodegradación de Tyr ( $\Phi_{\text{Tyr}}$ : 0,0035),<sup>1</sup> para un rango de pH entre 2,0-12,0, se puede concluir que el  $\Phi_{\text{Tyr}_2}$  de la forma ácida es similar al  $\Phi_{\text{Tyr}}$ , mientras que el  $\Phi_{\text{Tyr}_2}$  de la forma alcalina es mucho mayor. Los errores en el cálculo del  $\Phi_{\text{Tyr}_2}$  se obtuvieron a partir de experimentos independientes en los cuales la concentración de Tyr<sub>2</sub> era aproximadamente 15  $\mu\text{M}$ . Se repitió el cálculo de  $\Phi_{\text{Tyr}_2}$  a altas concentraciones de Tyr<sub>2</sub> (43  $\mu\text{M}$ ) en condiciones alcalinas, obtenidas luego de liofilizar soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> (Sección 5.2.1) y de resuspender el sólido en un volumen menor de agua. Se obtuvo un valor de 0,025, el cual coincide con el valor obtenido a bajas concentraciones (Figura 11.5).



**Figura 11.5.** Evolución de la concentración de Tyr<sub>2</sub> (43  $\mu\text{M}$ ) en función del tiempo de irradiación de soluciones acuosas equilibradas en aire. (HPLC-FL:  $\lambda_{\text{exc}}=280$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=410$  nm).

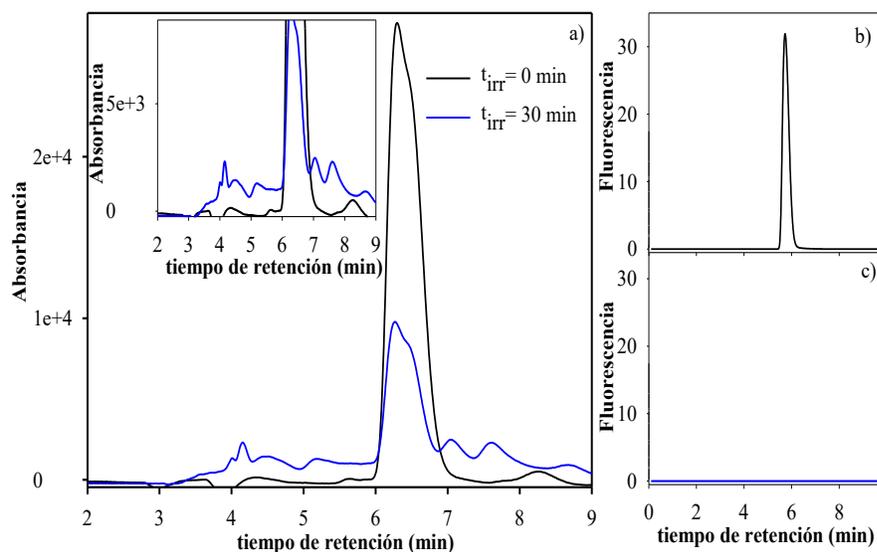
A pH fisiológico (pH= 7,4), la contribución de la forma aniónica de Tyr<sub>2</sub> es significativa, la cual es más fotosensible que la forma protonada y además, su espectro de absorción se encuentra desplazado hacia longitudes de onda mayores. Por lo tanto, se puede concluir que al ser la radiación UV-A la componente más importante de la radiación solar que llega a la superficie terrestre y que Tyr<sub>2</sub> se fotooxida con un  $\Phi$  relativamente alto, su fotoquímica se vuelve relevante, incluso frente a períodos cortos de exposición solar, dado que la intensidad de nuestra fuente de radiación es semejante a la de la radiación solar.<sup>2</sup>

### 11.3. Estudio de fotoproductos

#### 11.3.1. Análisis por HPLC

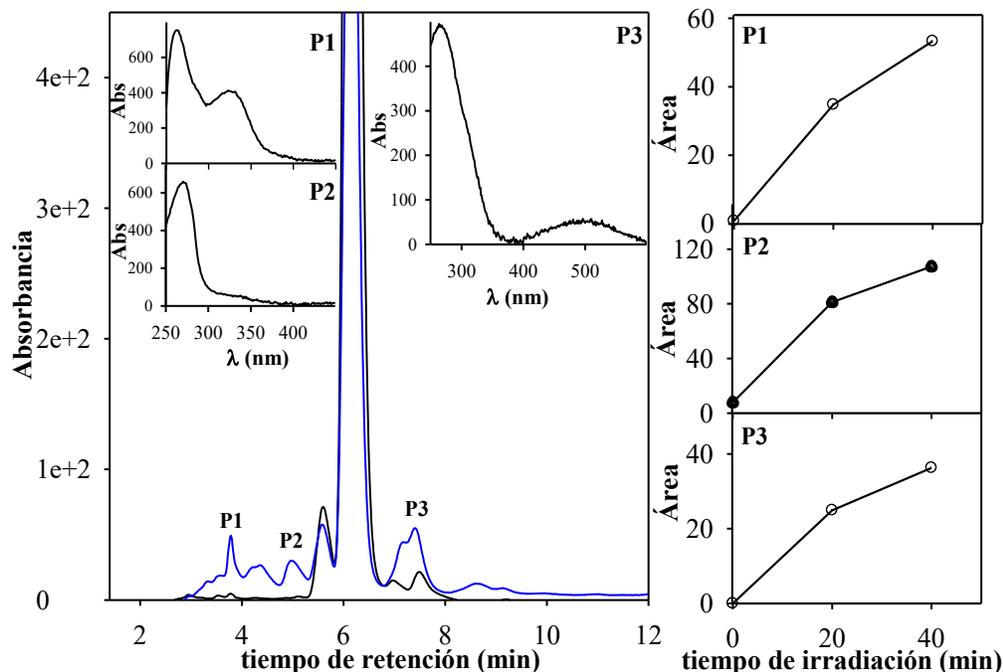
Se llevó a cabo el estudio de los productos generados en la fotodegradación de Tyr<sub>2</sub>, mediante el análisis por HPLC-PDA. Para ello, se analizaron los nuevos picos que aparecen en las corridas cromatográficas luego de irradiar a 320 nm las soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> (14 μM) a pH 9,5 (*Sistema de Irradiación III*). El análisis no se realizó en medio ácido, considerando que la forma ácida de Tyr<sub>2</sub> posee un  $\Phi_{\text{Tyr}_2}$  bajo y que es más fotoestable que la forma alcalina. En la Figura 11.6.a, se muestra el cromatograma registrado a 280 nm, donde se puede ver la aparición de nuevos picos de baja intensidad, lo que estaría indicando que se formarían varios fotoproductos que estarían en baja concentración.

Por otro lado, al tener distintos productos, se buscó determinar si Tyr era uno de ellos mediante el análisis cromatográfico utilizando el HPLC-FL ( $\lambda_{\text{exc}} = 275$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 300$  nm), aprovechando sus propiedades características de excitación/emisión.<sup>3</sup> Como se puede ver en la Figura 11.6.c, no se observó formación de Tyr en los cromatogramas de las soluciones de Tyr<sub>2</sub> irradiadas por 30 minutos, a diferencia de la emisión observada para una solución patrón de Tyr, en las mismas condiciones (Figura 11.6.b). Es decir, Tyr no es un producto de fotodegradación de Tyr<sub>2</sub>, lo que implica que no es posible revertir fotoquímicamente el proceso de dimerización por la excitación directa de Tyr<sub>2</sub>. A su vez, teniendo en cuenta que la 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) es un típico producto de oxidación de Tyr,<sup>4</sup> que posee un máximo de absorción a 280 nm y que emite en las mismas condiciones que Tyr, se puede descartar la formación de este compuesto.

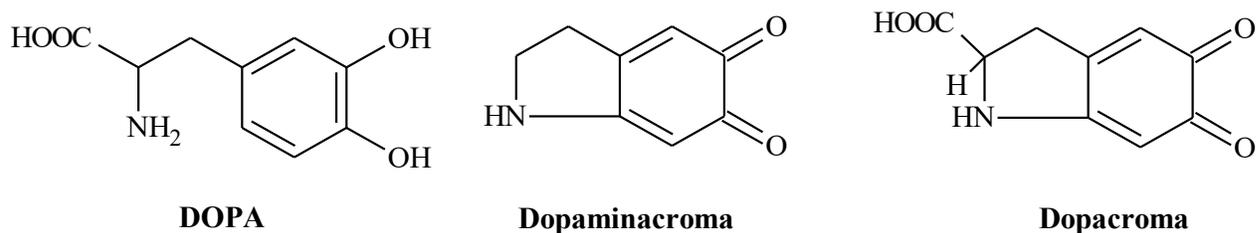


**Figura 11.6.a.** Cromatogramas registrados con el HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}} = 280 \text{ nm}$ ) antes y después de 30 min de irradiación para soluciones acuosas aireadas de Tyr<sub>2</sub> a pH 9,5 equilibradas en aire. Inset: ampliación del cromatograma a 280 nm. Cromatogramas registrados con el HPLC-FL ( $\lambda_{\text{exc}} = 275 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{em}} = 300 \text{ nm}$ ) para una solución patrón de Tyr (**b**) y una solución alcalina de Tyr<sub>2</sub> irradiada por 30 min (**c**).  $[\text{Tyr}_2]_0 = 14 \mu\text{M}$ . Condiciones cromatográficas: 100% HCOOH 25 mM; pH 3,5; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 150 \mu\text{L}$ ; columna analítica Synergi Polar RP.

Considerando que se forman varios productos y que la concentración de Tyr<sub>2</sub> es baja, se buscó aumentar la concentración inicial del reactivo para lograr un mejor análisis de los fotoproductos. Para ello, se liofilizaron 15 mL de una solución acuosa de Tyr<sub>2</sub> (14  $\mu\text{M}$ ) (*Sección 5.2.1*) y el sólido obtenido se disolvió en agua, para obtener una solución de concentración 60  $\mu\text{M}$ . Como se ve en la Figura 11.7, luego de irradiar por un período de 40 minutos, si bien el cromatograma a 280 nm sigue siendo ruidoso, se logro aumentar la intensidad de los picos, logrando en algunos casos, extraer sus espectros de absorción. En particular, se extrajeron los espectros de al menos tres fotoproductos, a los cuales se los denominó: P1, P2 y P3, arbitrariamente. A su vez, en la Figura 11.7, se puede observar que la concentración de los productos crece en función del tiempo de irradiación. El producto P3 presenta características espectrales similares a las reportadas para los productos típicos de oxidación de Tyr *in vivo*, dopaminocroma y dopacroma (Figura 11.8).<sup>5</sup> El espectro de absorción de estos compuestos presenta una banda de baja intensidad centrada en 475 nm. Estos compuestos se forman a partir de la ciclación intramolecular irreversible de DOPA, lo cual estaría implicando la formación de DOPA como producto de oxidación en uno de los residuos Tyr en la estructura de Tyr<sub>2</sub>.<sup>5</sup>

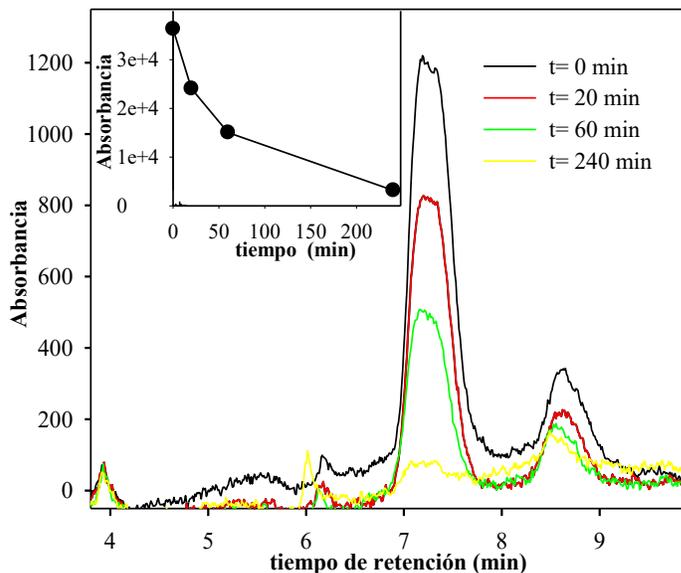


**Figura 11.7.** Cromatogramas registrados con el HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}} = 280 \text{ nm}$ ) de Tyr<sub>2</sub> (60  $\mu\text{M}$ ) a pH 9,5 antes (línea negra) y después (línea azul) de la irradiación por 40 min. Inset: espectros de absorción de los principales productos (P1, P2 y P3) y sus respectivas cinéticas de formación. Condiciones cromatográficas: 100% HCOOH 25 mM; pH 3,5; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 100 \mu\text{L}$ ; columna analítica Synergi Polar RP.



**Figura 11.8.** Estructuras moleculares de algunos de los productos de oxidación de Tyr libre.

Las aminocromas son químicamente inestables y en los melanocitos participan de una vía no enzimática que evoluciona a melanina.<sup>6</sup> Debido a esto, se estudió la estabilidad del producto P3 mediante HPLC. Para ello, una solución acuosa aireada alcalina de Tyr<sub>2</sub> (60  $\mu\text{M}$ ) se irradió por 40 minutos y luego de interrumpir la irradiación, se inyectó en el cromatógrafo a distintos tiempos. Como se puede ver en la Figura 11.9, en los cromatogramas registrados a 480 nm, se observa el descenso del pico correspondiente a P3 en función del tiempo confirmando que estos productos coloreados son inestables.



**Figura 11.9.** Cromatogramas registrados con el HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}} = 480 \text{ nm}$ ) de una solución acuosa alcalina de Tyr<sub>2</sub> irradiada durante 40 min, en función del tiempo. [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 60  $\mu\text{M}$ . Condiciones cromatográficas: 100% HCOOH 25 mM; pH 3,5; 0,6 mL/min; vol<sub>iny</sub> = 100  $\mu\text{L}$ ; columna analítica Synergi Polar RP.

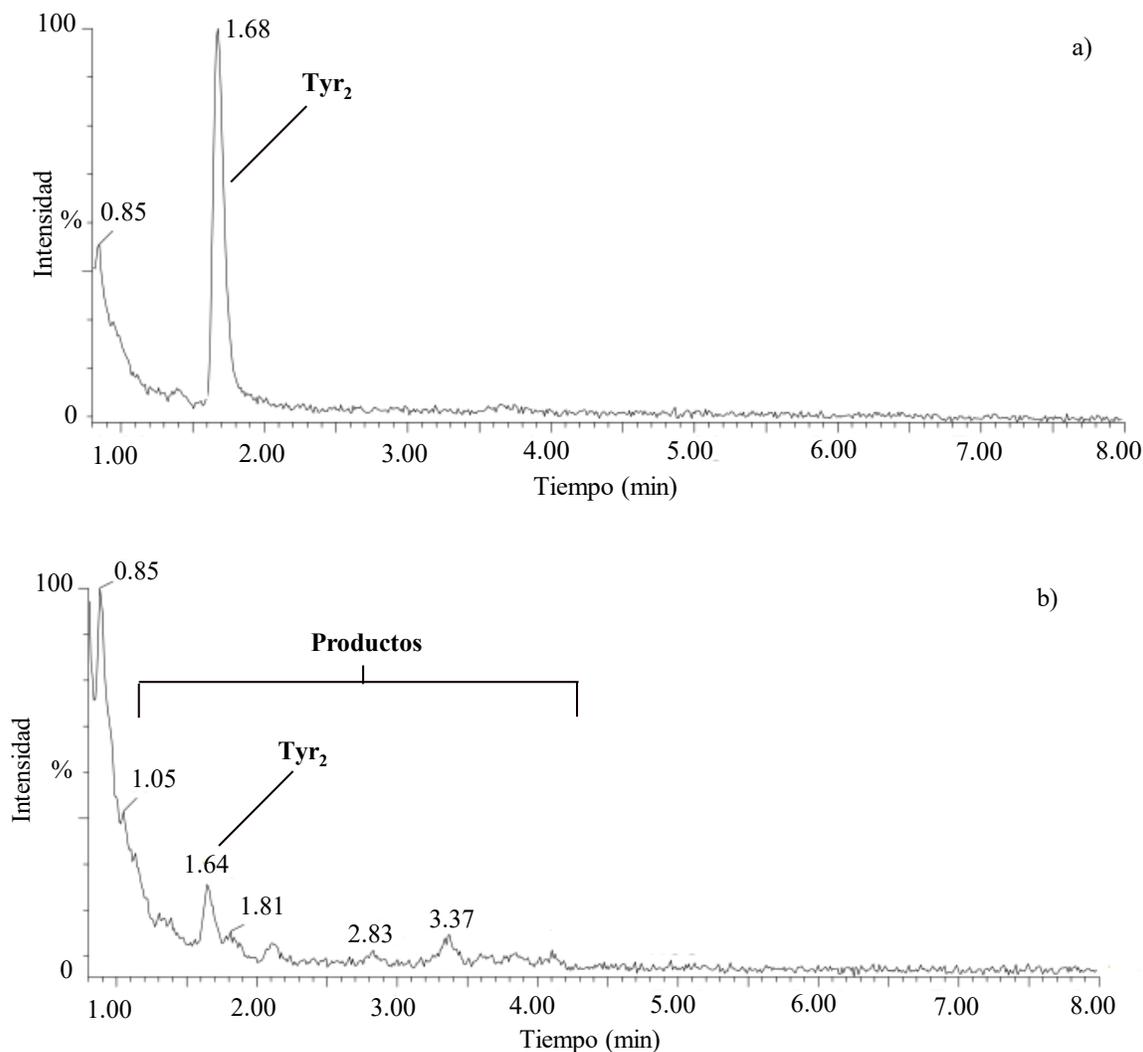
### 11.3.2. Análisis UPLC-MS

Con el fin de investigar las estructuras de los fotoproductos de Tyr<sub>2</sub> generados por la absorción directa de radiación UV, se realizó un estudio de espectrometría de masas por ionización *electrospray* (ESI). Las muestras se separaron previamente con un cromatógrafo líquido que se encuentra acoplado a un espectrómetro de masas (UPLC-QToF-MS, Sección 7.3). Las muestras se analizaron tanto en modo positivo (ESI<sup>+</sup>) como negativo (ESI<sup>-</sup>), sin embargo, se obtuvieron mejores señales con ESI<sup>-</sup>, por lo que se prosiguió con el análisis en este modo. Cabe aclarar que con el equipo UPLC se trabaja con condiciones experimentales distintas que en el estudio previo con el HPLC (equipo, columna, flujo), por lo que los tiempos de retención no coinciden con los mostrados en la sección anterior.

Se compararon los cromatogramas y los espectros de masas de las soluciones aireadas de Tyr<sub>2</sub> (14  $\mu\text{M}$ ) en medio alcalino antes y después de la irradiación durante diferentes períodos de tiempo. Antes de la irradiación, en el cromatograma de masas TIC (Sección 7.3) se pueden observar dos picos: uno con un tiempo de retención 0,85 minutos y otro con uno de 1,68 minutos (Figura 11.10.a). El primero se encuentra presente en todos los cromatogramas, incluso al inyectar agua, por lo que se le asigna a una impureza polimérica proveniente del equipo. El

segundo pico, se corresponde con el ion molecular intacto de Tyr<sub>2</sub>. La masa de este ion molecular es de 359,1237 en modo negativo [M-H]<sup>-</sup> (Figura 9.9, Capítulo 9).

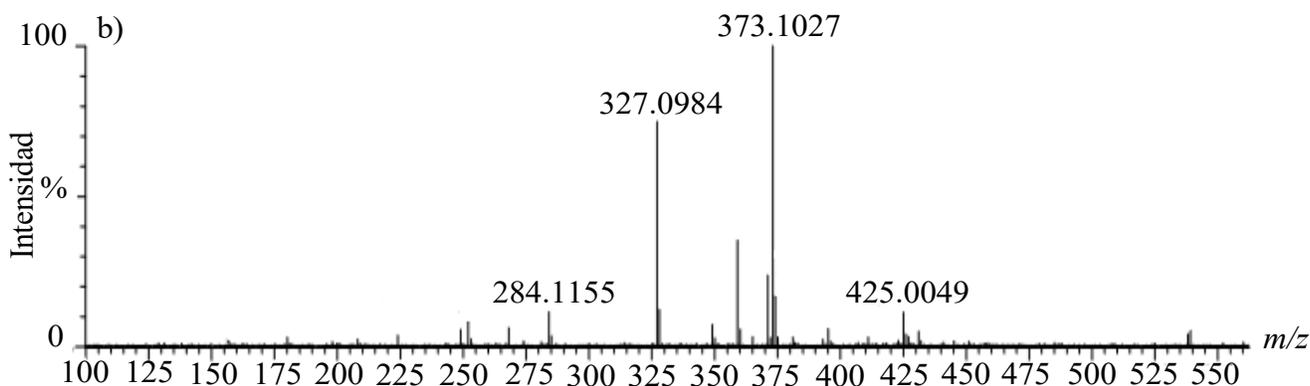
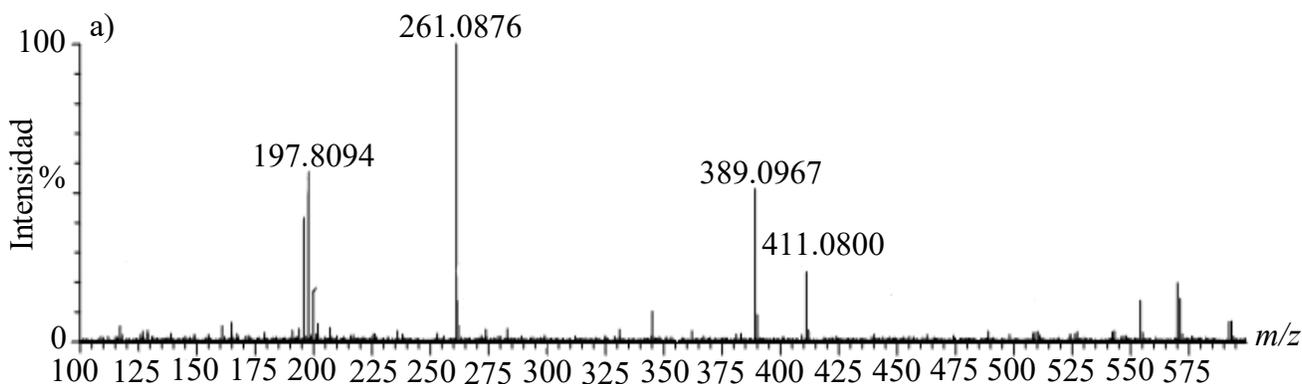
Al analizar las soluciones irradiadas luego de 5 minutos (Figura 11.10.b), se puede ver en los cromatogramas TIC, la aparición de nuevos picos con distintos tiempos de retención.

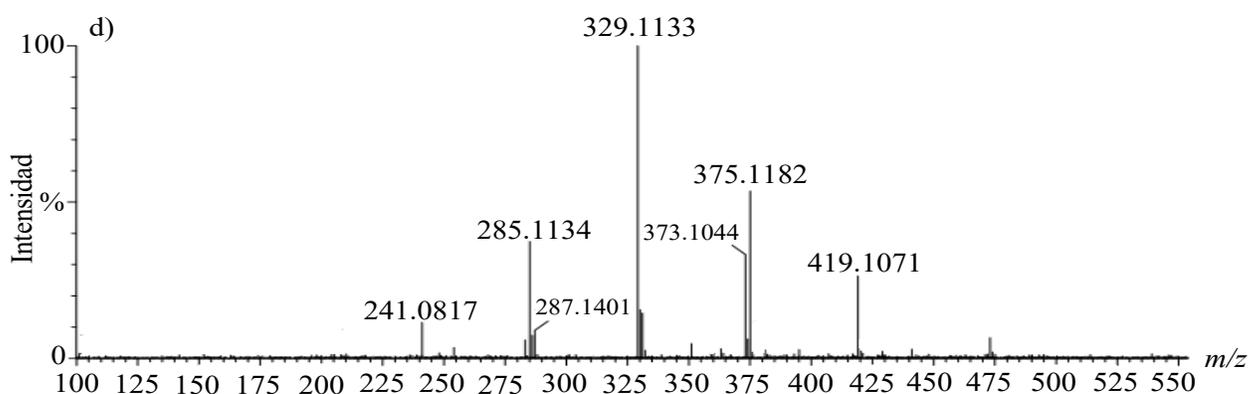
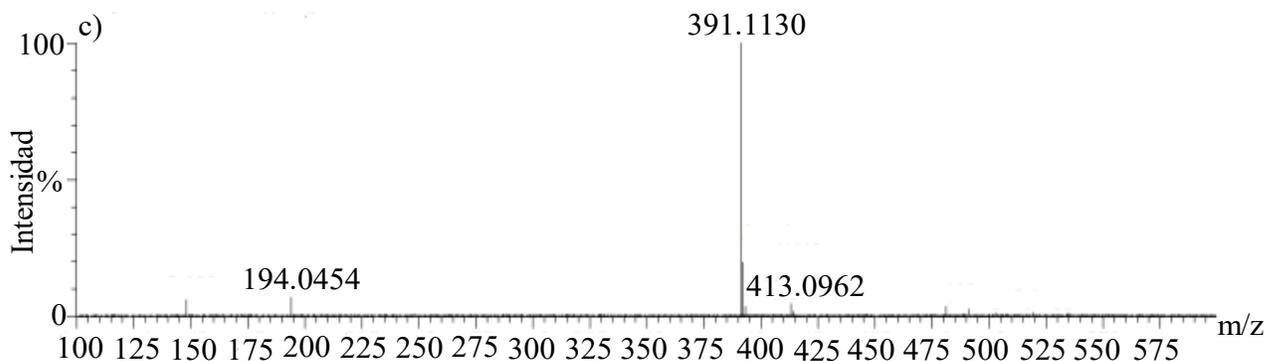


**Figura 11.10.** Cromatogramas de masas TIC registrados para soluciones acuosas aireadas de Tyr<sub>2</sub> por UPLC-MS, antes (a) y después de 5 min de irradiación (b). [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 14 μM, pH= 9,5.

Los espectros de masas a los distintos tiempos de retención (1,4 min, 1,8 min, 2,1 min y 3,4 min) muestran señales de diversas masas (Figura 11.11), sin embargo, se identificaron al menos cuatro productos con valores de  $m/z$  mayores al de Tyr<sub>2</sub> (Tabla 11.1). Estos valores de masa se corresponden con compuestos que han incorporado un átomo de oxígeno ([M + O], [M +

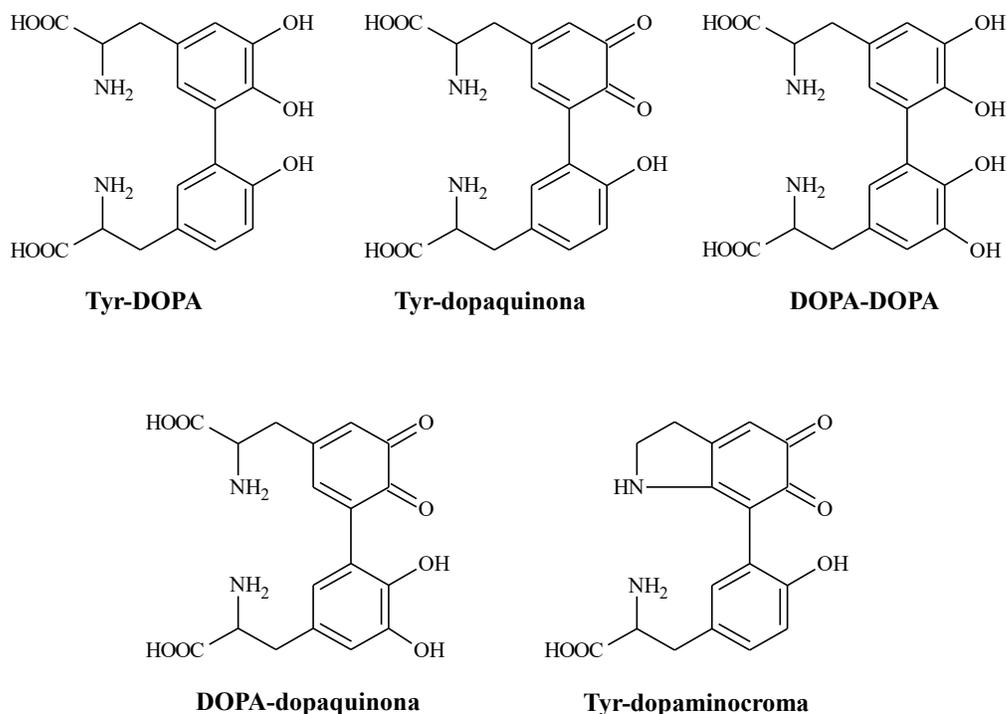
O – 2H]) o dos átomos de oxígeno ([M + 2O], [M + 2O – 2H]). La incorporación de un átomo de oxígeno podría deberse a la formación de DOPA en una de las unidades de Tyr del dímero.<sup>4</sup> A su vez, la incorporación de un átomo de oxígeno y la pérdida de dos átomos de hidrógeno sugiere la oxidación de una unidad de Tyr a dopaquinona, otro de los productos de oxidación de Tyr.<sup>5</sup> A partir de estos datos obtenidos, se propuso que cuatro de los productos encontrados se corresponden a estructuras diméricas, compuestos por una unidad de Tyr intacta y la otra unidad de Tyr oxidada o dos unidades de Tyr oxidadas (Figura 11.12). En los cromatogramas de masas XIC (Sección 7.3), registrados para los distintos *m/z* obtenidos, se puede observar que al irradiar las soluciones, se forman nuevos picos con tiempos de retención distintos. En particular, los *m/z* de 375,1182 y 373,1027, correspondientes a los productos Tyr-DOPA y Tyr-dopaquinona respectivamente, se muestran en las Figuras 11.13 y 11.14.





**Figure 11.11.** Espectros de masa de soluciones de Tyr<sub>2</sub> irradiadas durante 5 min (modo ESI), a distintos tiempos de retención (1,4 min (a), 1,8 min (b), 2,1 min (c) y 3,4 min (d)). [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 14  $\mu$ M, pH= 9,5.

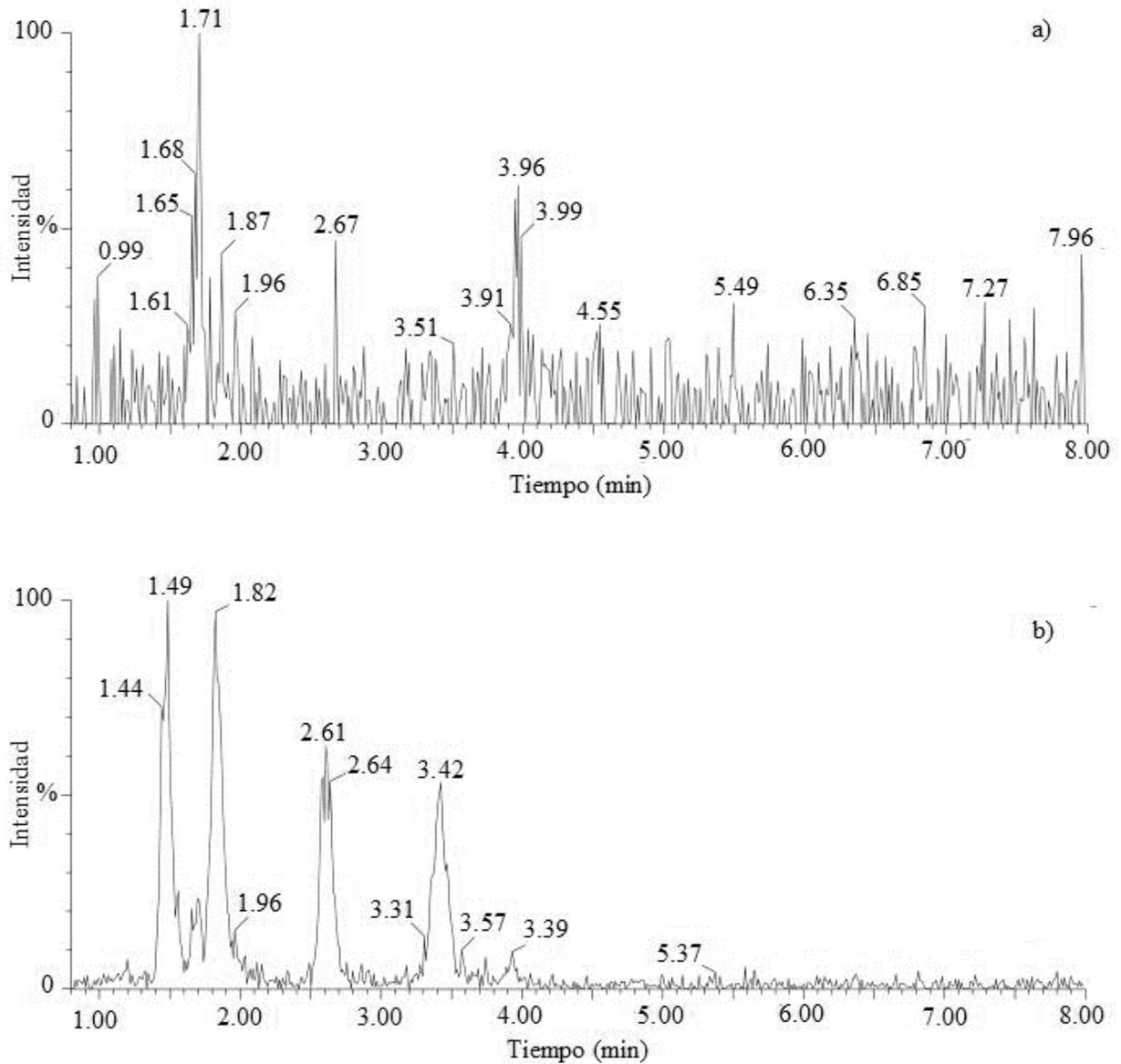
Por otro lado, en los espectros de masas se encontraron valores correspondientes a productos con pesos moleculares menores al de Tyr<sub>2</sub>. Si bien aparecen numerosas señales, se logró identificar una señal intensa para un valor de  $m/z$  de 327,0984 (Tabla 11.1). Teniendo en cuenta que la ciclación intramolecular de quinonas es una reacción típica de estos compuestos,<sup>5</sup> la estructura del producto se puede corresponder con una estructura dimérica formada por una Tyr intacta y una dopaminocroma (Figura 11.12). Además, esta estructura justifica la absorbancia del producto P3 en la zona visible que se observa en el cromatograma obtenido por HPLC-PDA (Figura 11.7). Para el valor de  $m/z$  de 329,1133, no se logró proponer una estructura, sin embargo, podemos asumir que se corresponde a un producto que posee uno de los residuos Tyr intacto y la otra Tyr ciclada.



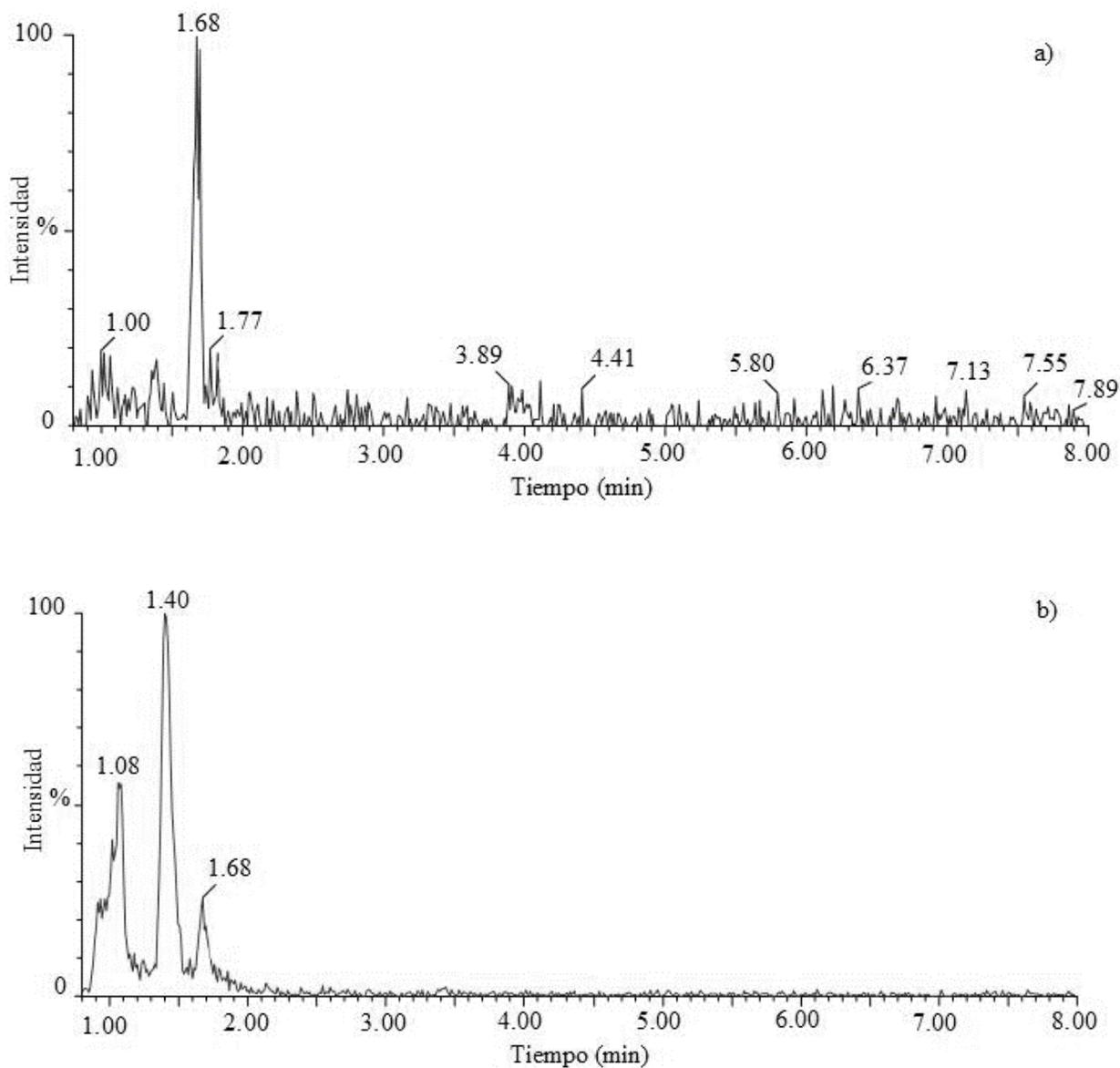
**Figura 11.12.** Estructuras moleculares propuestas para los productos de oxidación de soluciones acuosas alcalinas de Tyr<sub>2</sub> detectados por UPLC-MS luego de su exposición a radiación UV-A.

Compuestos	[M]	Composición Elemental	ESI [M-H] <sup>-</sup>		
			Observada (m/z)	Calculada (m/z)	Error (ppm)
Tyr <sub>2</sub>	--	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	359,1237	359,1249	-3,3
Tyr-DOPA	Tyr <sub>2</sub> +O	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	375,1182	375,1198	-4,3
Tyr-dopaquinona	Tyr <sub>2</sub> +O-2H	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	373,1027	373,1041	-3,8
DOPA-DOPA	Tyr <sub>2</sub> +2O	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	391,1130	391,1147	-4,9
DOPA-dopaquinona	Tyr <sub>2</sub> +2O-2H	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	389,0976	389,0990	-3,6
	Tyr <sub>2</sub> +2O-2H-COO	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	329,1133	329,1143	-3,0
Tyr-dopaminocroma	Tyr <sub>2</sub> +O-2H-HCOOH	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	327,0984	327,0986	-0,6

**Tabla 11.1.** Relaciones m/z observadas y calculadas, fórmulas químicas y errores de los principales productos de oxidación obtenidos en el análisis de UPLC-MS.



**Figura 11.13.** Cromatogramas de masas XIC registrados para  $m/z$  373,1027 de una solución acuosa alcalina de Tyr<sub>2</sub> antes (a) y luego de 5 min de irradiación (b). [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 14 μM, pH= 9,5.

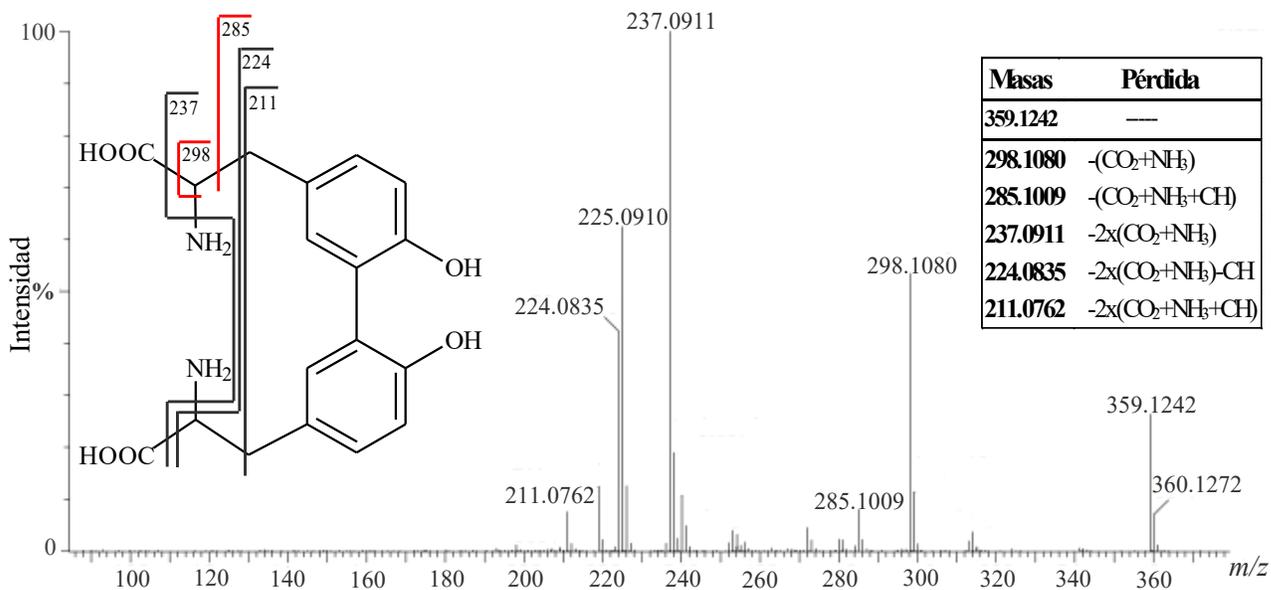


**Figura 11.14.** Cromatogramas de masas XIC registrados para  $m/z$  375,1182 de una solución acuosa alcalina de Tyr<sub>2</sub> antes (a) y luego de 5 min de irradiación (b). [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 14  $\mu$ M, pH= 9,5.

### 11.3.3. Análisis MS-MS

Para obtener información adicional de los productos, se utilizó el equipo UPLC-QToF-MS para realizar espectrometría de masas en tándem (MS-MS, Sección 7.3). Primero, se registró el espectro MS/MS de soluciones acuosas alcalinas de Tyr<sub>2</sub> (14  $\mu$ M) antes de la irradiación, no solo para utilizar el reactivo como patrón de cortes, sino porque no se encontraba publicado en bibliografía hasta el momento. En el espectro de la Figura 11.15, se puede observar la formación

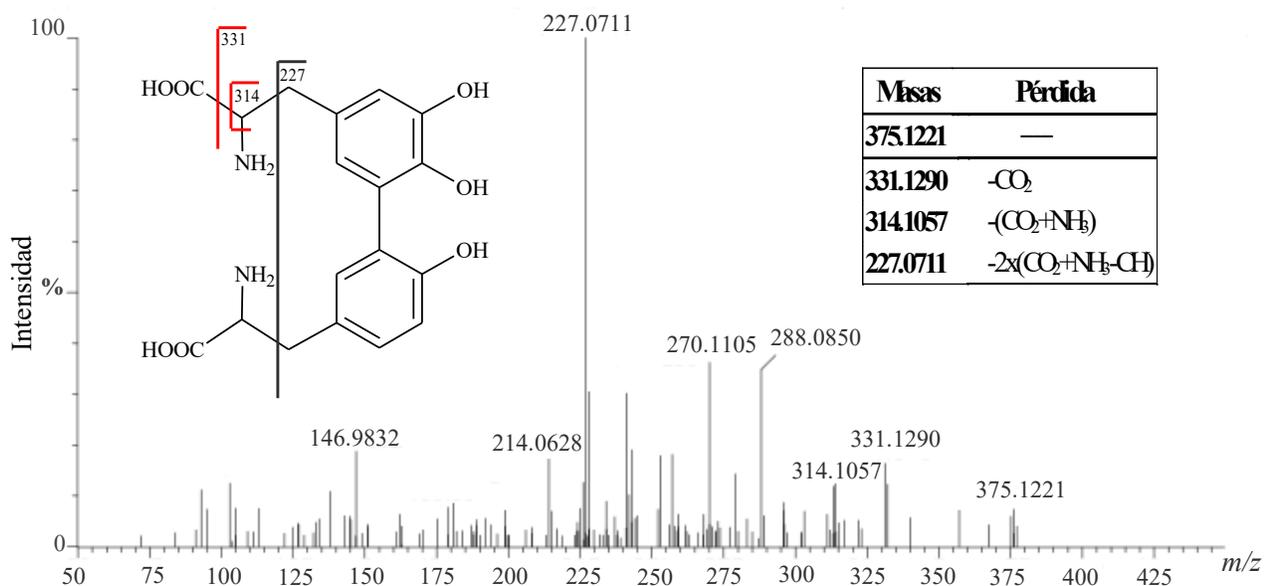
de distintos fragmentos, todos provenientes de la cadena lateral. Además, como se detalla en la tabla de la Figura 11.15, no se observaron fragmentos correspondientes a la ruptura de los anillos aromáticos ni al enlace entre las dos Tyr, lo que estaría indicando que el enlace covalente entre las dos Tyr de la molécula es lo suficientemente fuerte para no romperse durante la fragmentación MS/MS. Este tipo de patrón de fragmentación ya ha sido previamente observado para DOPA.<sup>8</sup>



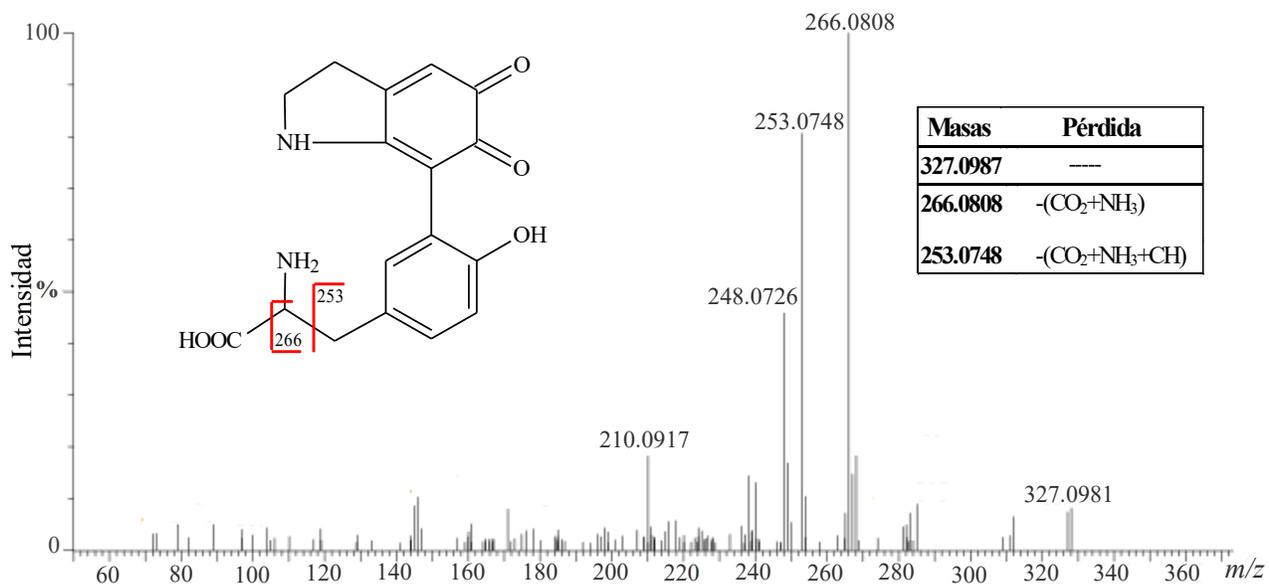
**Figure 11.15.** Espectro de MS/MS de Tyr<sub>2</sub> en modo ESI. Estructura con los cortes en una cadena lateral (línea roja) y cortes en ambas cadenas (línea negra). [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 14 μM, pH= 9,5.

Teniendo en cuenta nuevamente que la concentración inicial del reactivo es baja y que se forman distintos productos, la mayoría de los espectros MS/MS de los productos fueron ruidosos y con señales de baja intensidad. Sin embargo, en todos los casos se pudo observar que la fragmentación se llevó a cabo en las cadenas laterales y no en los anillos. En la Figura 11.16 se puede ver el espectro de MS/MS registrado para el valor de  $m/z$  de 375,1182, correspondiente al producto denominado Tyr-DOPA, el cual presenta un patrón de fragmentación similar al observado para Tyr<sub>2</sub>. A su vez, su espectro MS/MS confirma que la incorporación de un átomo de oxígeno ocurre en uno de los anillos aromáticos de la molécula porque ninguno de los fragmentos obtenidos posee una masa que se corresponda con la incorporación de un átomo de oxígeno. En el caso del producto Tyr-dopaminocroma ( $m/z$  de 327,0984), se puede observar que a diferencia de los otros productos, en su espectro MS/MS la fragmentación ocurre en una sola de

las cadenas laterales, lo cual se corresponde con la estructura propuesta, la cual involucra a la otra cadena en la ciclación (Figura 11.17).



**Figure 11.16.** Espectro MS/MS del producto Tyr-DOPA ( $m/z$  de 375,1182) en modo ESI. Estructura con los cortes en una cadena lateral (línea roja) y cortes en ambas cadenas (línea negra).



**Figure 11.17.** Espectro MS/MS del producto Tyr-dopaminocroma ( $m/z$  de 327,0984) en modo ESI. Estructura con los cortes en una cadena lateral (línea roja).

### Bibliografía

- <sup>1</sup> I. A Vladimirov, *et. al*, *Photochem Photobiol.*, **11**, 227-246, 1970.
- <sup>2</sup> A. Ipiña, *et. al*, *Solar Energy*, **109**, 45-53, 2014.

- <sup>3</sup> J. R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Springer, New York, **ch. 3**, 2006.
- <sup>4</sup> D. Creed, *Photochem Photobiol.*, **39**(4), 563-575, 1984.
- <sup>5</sup> G. M. Robinson, M. R. Smyth, *Analyst.*, **122**, 797-802, 1997.
- <sup>6</sup> F. Lemos-Amado, *et. al*, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 2466-2471, 2001.
- <sup>7</sup> F. García- Canovas, *et. al*, *J. Biol. Chem.*, **257**, 8738-8744, 1982.
- <sup>8</sup> J. L. Kerwin, *J. Mass Spectrometry*, **31**, 1429-1439, 1996.



# CAPÍTULO 12

## PROPIEDADES FOTOSENSIBILIZADORAS DE DÍMEROS DE TIROSINA

Los aminoácidos aromáticos, como en el caso del Trp y Tyr, son capaces de producir EROs por absorción directa de luz<sup>1</sup> o durante su degradación fotosensibilizada inducida por sensibilizadores tanto endógenos como exógenos.<sup>2,3</sup> Teniendo en cuenta los resultados desarrollados previamente en los Capítulos 10 y 11, donde se demostró que Tyr<sub>2</sub> luego de ser excitado con radiación UV-A, alcanza un estado electrónicamente excitado que puede iniciar nuevas reacciones y que posee su espectro de absorción corrido hacia el rojo con respecto a Tyr y otros aminoácidos, se buscó investigar si Tyr<sub>2</sub> también era capaz de producir EROs (tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) bajo irradiación UV. A su vez, se evaluó su capacidad fotosensibilizadora utilizando Tyr como sustrato oxidable.

### 12.1. Producción fotoquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup>

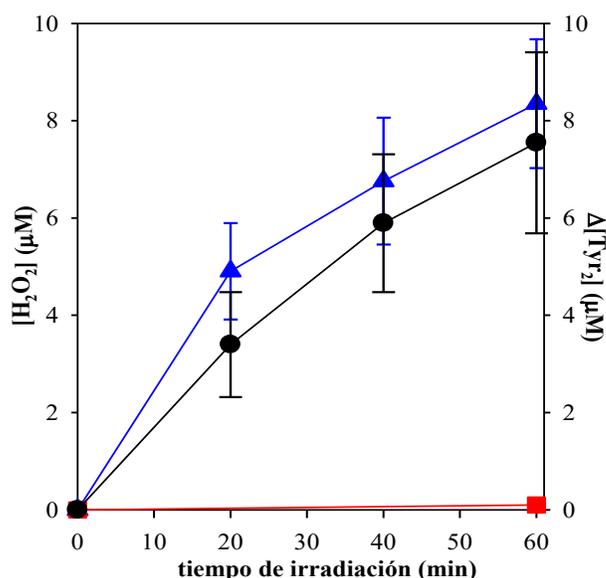
El objetivo de este estudio fue evaluar si Tyr<sub>2</sub> era capaz de generar EROs cuando se expone a radiación UV. Para ello, se prepararon soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub> provenientes del aislamiento de corridas cromatográficas, como se detalla en la *Sección 9.4*, y luego, se expusieron a irradiación por diferentes períodos de tiempo (*Sistema de irradiación III*). Las muestras se irradiaron en celdas de cuarzo de 0,4 cm de paso óptico por diferentes períodos de tiempo y luego, se analizaron con las técnicas usadas en los experimentos descritos en los capítulos anteriores y colorimétricas específicas para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

#### 12.1.1. Determinación de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Soluciones acuosas aireadas de Tyr<sub>2</sub> (14 μM) en medio ácido y alcalino fueron expuestas a radiación UV (*Sistema de irradiación III*) por diferentes períodos de tiempo. Posteriormente, se evaluó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el proceso fotoquímico, utilizando el kit comercial (“COLESTAT enzimático”) (*Sección 6.1.2.1*). El error asociado a la medida se calculó a partir de experimentos independientes.

Durante la fotooxidación de soluciones alcalinas aireadas de Tyr<sub>2</sub> (pH 9,5,  $\lambda_{exc}$ = 320 nm) se observó que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produce y que su concentración aumenta con el tiempo de exposición a la radiación (Figura 12.1). Al comparar los perfiles de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado con el consumo de Tyr<sub>2</sub> ( $\Delta[Tyr_2]=[Tyr_2]_0-[Tyr_2]_t$ ), cuantificado simultáneamente por HPLC, los resultados indican que la cantidad generada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es la misma, dentro del error experimental, al consumo de Tyr<sub>2</sub>. A su vez, se realizó un experimento control para evaluar si existe reactividad entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Tyr<sub>2</sub> en medio alcalino en ausencia de luz, donde no se observaron cambios. Por lo tanto, se puede concluir que una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se genera por cada molécula Tyr<sub>2</sub> que se fotodegrada.

Por otra parte, en las soluciones acuosas aireadas de Tyr<sub>2</sub> irradiadas en medio ácido (pH 5,5,  $\lambda_{exc}$ = 280 nm), no se observa producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este resultado era esperable, teniendo en cuenta que el consumo de Tyr<sub>2</sub> durante su fotooxidación en medio ácido fue menor al 20 %, luego de 30 minutos de irradiación (Sección 11.1, Capítulo 11).



**Figura 12.1.** Consumo de Tyr<sub>2</sub> ( $\Delta[Tyr_2]$  en medio alcalino (●) y producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en soluciones acuosas aireadas de Tyr<sub>2</sub> a pH 9,5 (▲) y pH 5,5 (■) irradiadas a 320 nm y 280 nm, respectivamente, durante diferentes períodos de tiempo.  $[Tyr_2]_0$ : 14  $\mu$ M.

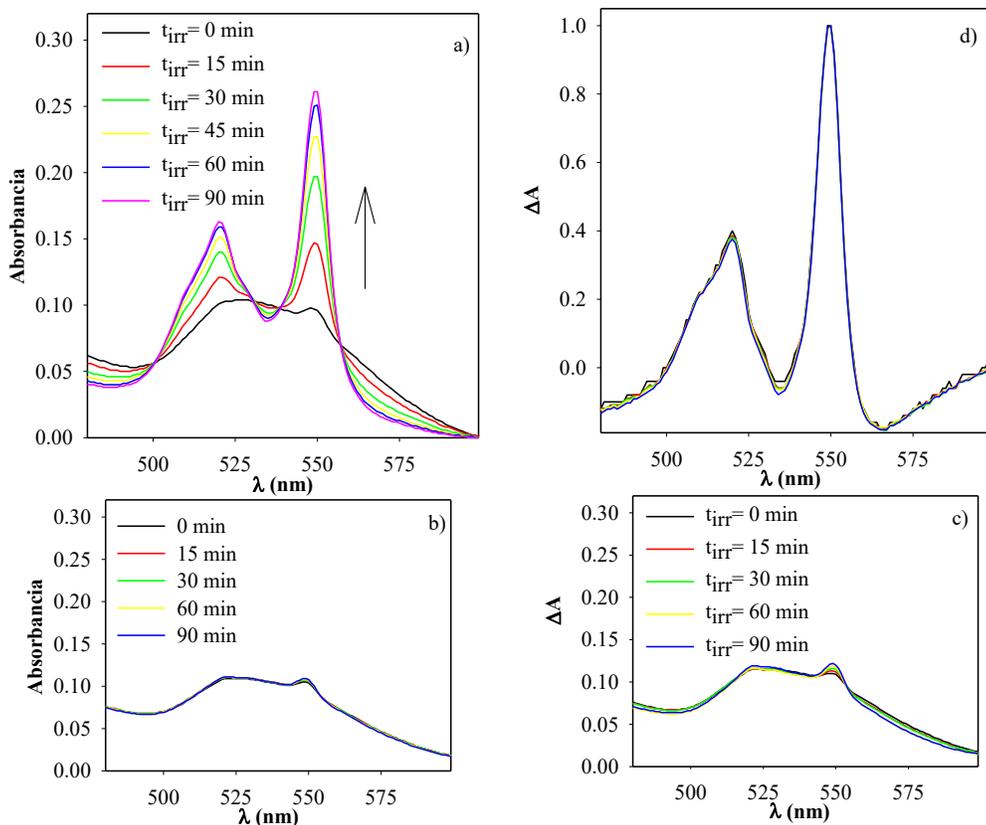
### 12.1.2. Investigación de la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>

Teniendo en cuenta que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede generarse a partir del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) debido a que este radical puede dismutarse con su respectivo ácido conjugado (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(Reacciones 12.1 y 12.2),<sup>4</sup> se decidió investigar la formación de esta especie reactiva al irradiar soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub>.



Para ello, se utilizó el método de reducción del Citocromo c (Cyt) inhibible por Superóxido Dismutasa (*Sección 6.1.2.2*), donde soluciones acuosas aireadas de Tyr<sub>2</sub> (14 μM), en medio ácido y alcalino, se mezclaron con una solución de Cyt (200 μM). Dichas muestras fueron irradiadas con *el Sistema de irradiación III*, registrando los espectros de absorción cada 15 minutos, durante un período total de irradiación de 90 minutos. En la Figura 12.2.a se muestran los espectros de absorción en función del tiempo de irradiación de las soluciones en medio alcalino (pH = 9,5), donde se puede apreciar el incremento de la absorbancia en el rango entre 500-600 nm, consistente con la reducción de Cyt. Los espectros diferencia normalizados (EDEN) en ese rango de longitudes de onda, detallados en la Figura 12.2.d, son similares a los reportados en literatura para la reducción de Cyt.<sup>5</sup>

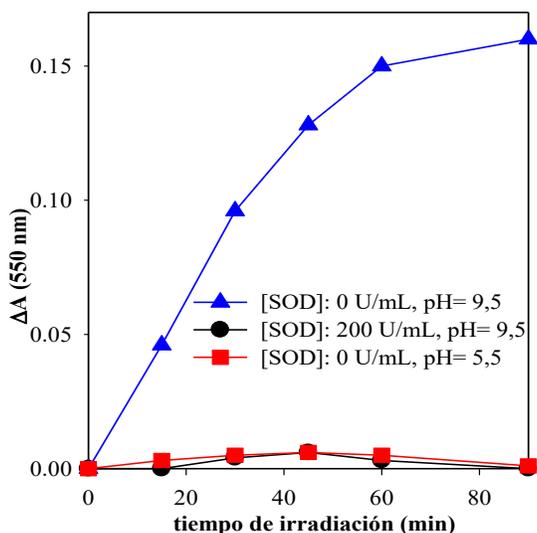


**Figura 12.2.** Espectros de absorción de una solución acuosa aireada de Tyr<sub>2</sub> y Cyt en medio alcalino irradiados a distintos tiempos **(a)** y mantenida en oscuridad **(b)**. **(c)** Espectros de absorción de una solución acuosa aireada de Cyt irradiada durante distintos períodos de tiempo y **(d)** EDEN. Camino óptico = 1 cm. Condiciones de irradiación: [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 10 μM; [Cyt]<sub>0</sub>: 14 μM; pH= 9,5, λ<sub>exc</sub>= 320 nm.

En la Figura 12.3 se observa el aumento de la absorbancia a 550 nm ( $\Delta A^{550\text{nm}}$ ) en función del tiempo de irradiación de la solución de Tyr<sub>2</sub> en medio alcalino previamente mencionada. Con el fin de confirmar que la reducción de Cyt es debido al O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, se irradió a Tyr<sub>2</sub> en presencia de SOD (200 U/mL), ya que esta enzima cataliza la reacción de dismutación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> para dar O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evitando que el mismo reaccione con Cyt (Figura 12.3). Se observó una clara inhibición de la fotorreducción de Cyt en presencia de SOD, sugiriendo que bajo las condiciones experimentales empleadas, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> generado fotoquímicamente por Tyr<sub>2</sub> es el responsable de la reducción del Cyt.

Para descartar la existencia de procesos térmicos o fotoquímicos que puedan interferir en el ensayo, se realizaron diversos experimentos de control. No se observó reducción de Cyt en soluciones mezcla de Tyr<sub>2</sub> (10 μM) y Cyt (14 μM) a pH 9,5 cuando se mantuvieron en oscuridad por un período de hasta 90 minutos (Figura 12.2.b). Asimismo, al exponer a radiación UV-A a soluciones conteniendo sólo Cyt, no se observaron cambios espectrales (Figura 12.2.c). A partir de estos resultados, se puede concluir que el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se genera fotoquímicamente al irradiar Tyr<sub>2</sub>.

Se repitió el mismo ensayo pero irradiando a la solución mezcla de Tyr<sub>2</sub> y Cyt en medio ácido (pH= 5,5), pero al no observar el aumento de absorbancia a 550 nm, se puede decir que la fotorreducción de Cyt no ocurre en el período de tiempo analizado (Figura 12.3). Este resultado era de esperarse, teniendo en cuenta los resultados previos de la fotodegradación de Tyr<sub>2</sub> en medio ácido (*Sección 11.1*).

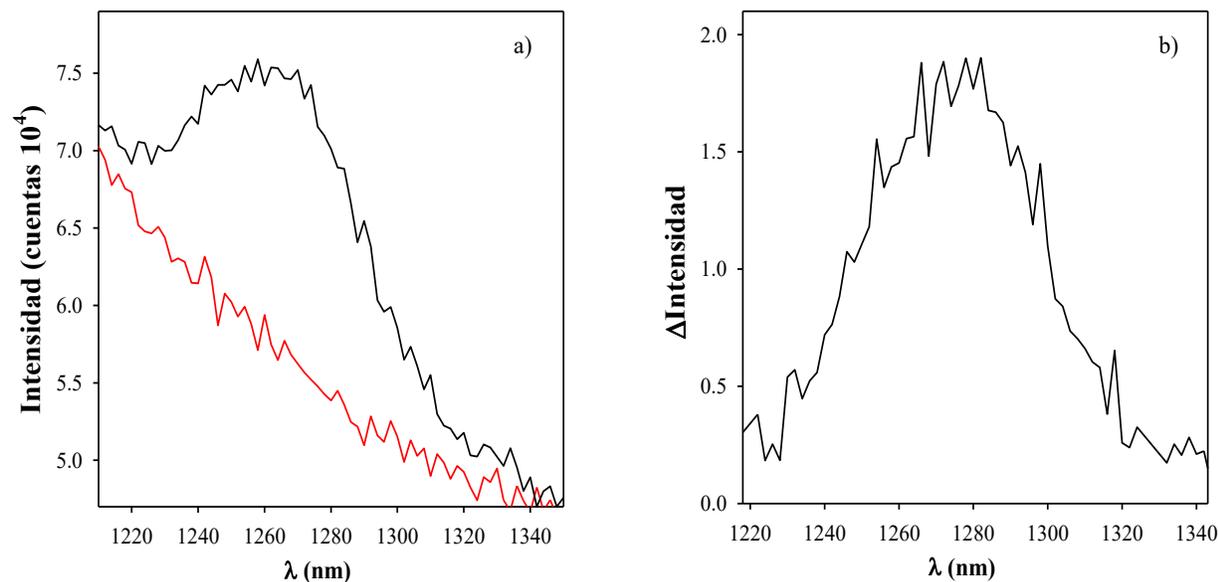


**Figura 12.3.** Evolución de  $\Delta A^{550\text{nm}}$  de soluciones mezcla aireadas de Tyr<sub>2</sub> (10  $\mu\text{M}$ ) y Cyt (14  $\mu\text{M}$ ) en medio ácido ( $\lambda_{\text{exc}}= 280 \text{ nm}$ ) y alcalino ( $\lambda_{\text{exc}}= 320 \text{ nm}$ ) en función del tiempo de irradiación, en presencia y ausencia de SOD (200 U/mL).

## 12.2. Producción fotoquímica de $^1\text{O}_2$

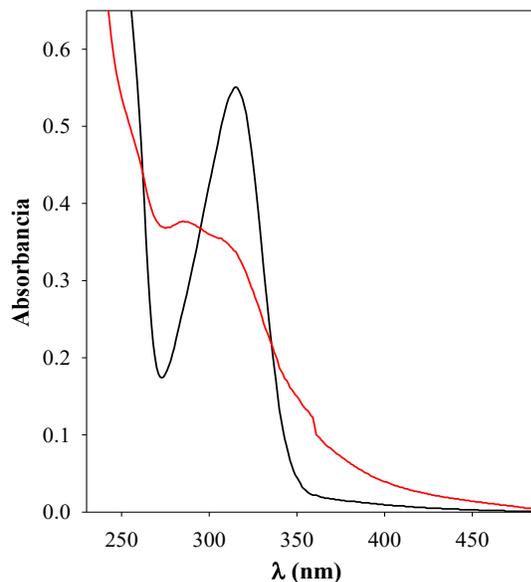
Con el fin de investigar si Tyr<sub>2</sub> es capaz de generar  $^1\text{O}_2$ , se monitoreo la luminiscencia en el infrarrojo cercano (NIR), característico de esta especie reactiva del  $\text{O}_2$ , durante la irradiación estacionaria de la muestra (*Sección 6.2.4*). La emisión del  $^1\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  es muy débil. Por lo tanto, para medir la emisión del  $^1\text{O}_2$  se trabajó en  $\text{D}_2\text{O}$ , debido a que el tiempo de vida medio del  $^1\text{O}_2$  aumenta un orden de magnitud con respecto al mismo en  $\text{H}_2\text{O}$  (*Sección 5.3.3*), lo que permite obtener señales lumínicas superiores. Por otra parte, los experimentos se hicieron a una alta concentración de Tyr<sub>2</sub> y con alta energía de excitación. Para esto, un volumen de 15 mL de una solución acuosa de Tyr<sub>2</sub> (14  $\mu\text{M}$ ) se liofilizó y el sólido resultante se resuspendió en 700  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ , obteniéndose una solución de Tyr<sub>2</sub> 165  $\mu\text{M}$ , la cual se alcalinizó (pD= 10,5). Posteriormente, se registraron los espectros de emisión en el NIR, donde se puede observar la señal típica centrada en 1270 nm, compatible con el espectro de emisión del  $^1\text{O}_2$  (Figura 12.4). Para confirmar que esa señal se corresponde a  $^1\text{O}_2$ , se registró el espectro en ausencia de  $\text{O}_2$ , para lo cual se burbujeo la solución con Ar. Como se muestra en la Figura 12.4.a, la emisión desaparece al eliminar el  $\text{O}_2$  del medio, confirmando que durante la irradiación de soluciones alcalinas de Tyr<sub>2</sub> se forma  $^1\text{O}_2$ . En la

Figura 12.4.b se observa el espectro de emisión diferencia obtenida al substrar la señal del espectro de la solución en Ar al espectro registrado en aire, donde se observa la señal centrada en 1270 nm.



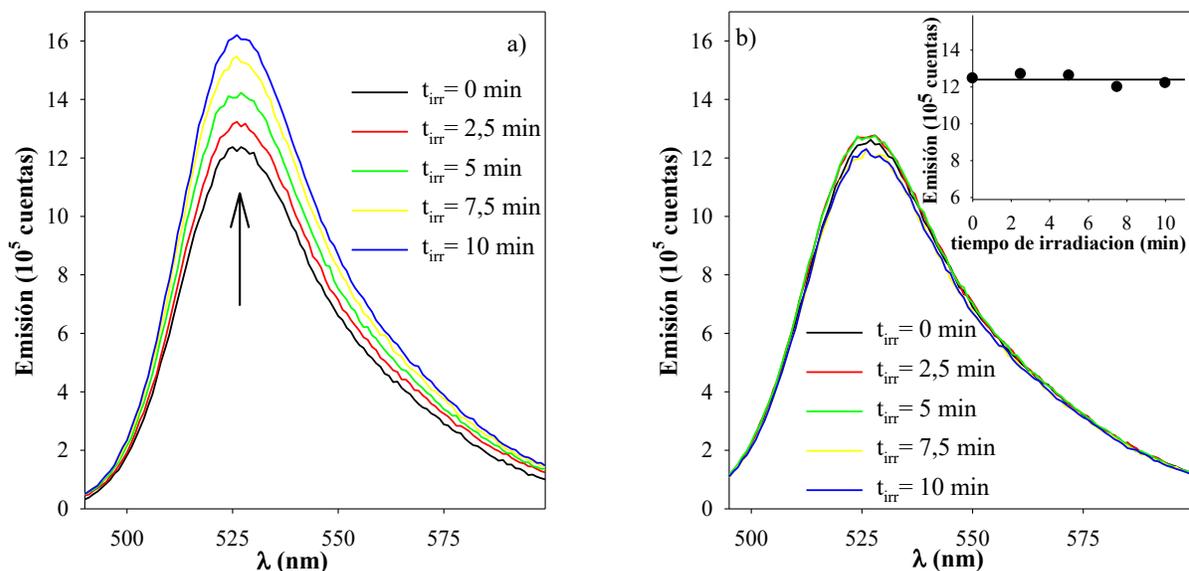
**Figura 12.4. a.** Espectros de emisión en el NIR de una solución en D<sub>2</sub>O de Tyr<sub>2</sub> en Ar (línea roja) y equilibrada en aire (línea negra). **b)** Espectro de emisión diferencia. [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 165 μM; pD= 10,5; λ<sub>exc</sub>= 320 nm.

Al realizar la medida de absorbancia de la solución de Tyr<sub>2</sub> luego de medir el espectro de emisión del <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, se pudo observar que la misma varía, indicando que la concentración de Tyr<sub>2</sub> no es constante a lo largo de la medida (Figura 12.5). Este resultado era esperable debido a que en medio alcalino Tyr<sub>2</sub> posee un valor Φ<sub>Tyr<sub>2</sub></sub> alto (*Sección 11.1.1*) y además, debido a las bajas señales de luminiscencia obtenidas, las muestras se irradiaron con alta energía y por un período de tiempo relativamente largo.



**Figura 12.5.** Espectro de absorción de soluciones aireadas de Tyr<sub>2</sub> en D<sub>2</sub>O antes (línea negra) y después de medir el espectro en el NIR (línea roja). [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 165 μM; pD=10,5.

Bajo las condiciones experimentales mencionadas previamente, la determinación del rendimiento cuántico de producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ( $\Phi_{\Delta}$ ) por Tyr<sub>2</sub> mediante medidas de emisión NIR no es posible. Por lo tanto, se buscó un método químico alternativo para determinarlo, donde se utilizó una sonda denominada *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG) (Sección 6.2.4.1). Soluciones acuosas aireadas alcalinas de Tyr<sub>2</sub> (14 μM) se irradiaron en presencia de SOSG (0,63 mg/L) a 320 nm, utilizando el *Sistema de irradiación III*. SOSG reacciona con <sup>1</sup>O<sub>2</sub> para formar un endoperóxido (SOSG-EP), el cual presenta una fluorescencia característica con un espectro centrado a 525 nm al excitar a 470 nm. Consecuentemente, se registraron los espectros de emisión correspondientes a las soluciones mezcla de Tyr<sub>2</sub> y SOSG irradiadas. En la Figura 12.6.a se puede observar el aumento de la emisión a 525 nm con el tiempo de irradiación. Esta reportado que SOSG produce <sup>1</sup>O<sub>2</sub> cuando se expone a radiación UV o visible,<sup>6,7,8</sup> en ausencia de un fotosensibilizador que genere <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, por lo que se realizó el control de la irradiación de la sonda en ausencia de Tyr<sub>2</sub>. Como se puede ver en la Figura 12.6.b, en este control no hubo un aumento de la emisión en ausencia de Tyr<sub>2</sub> con el tiempo de irradiación.

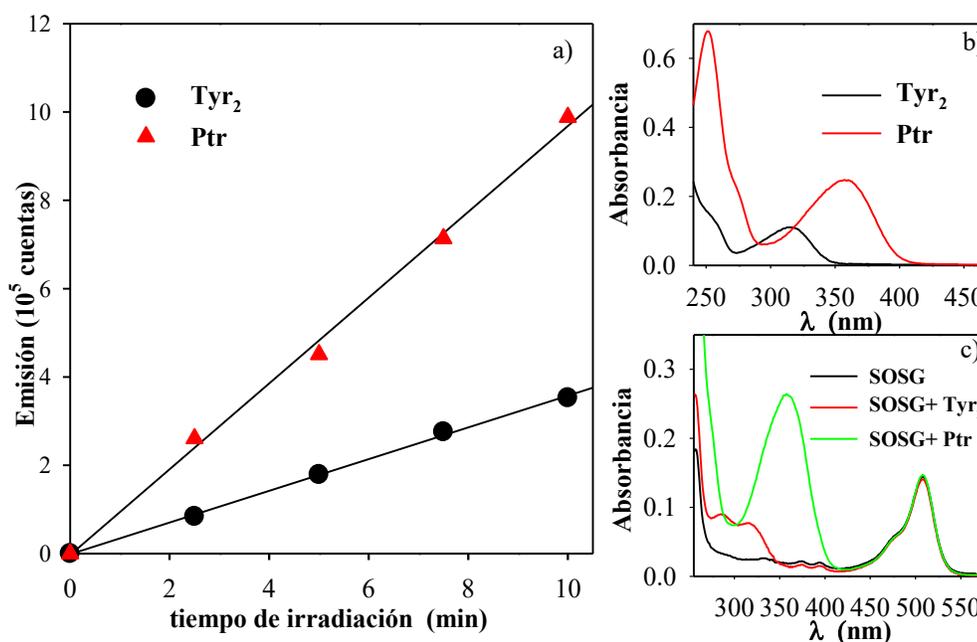


**Figura 12.6.** Espectros de emisión de soluciones acuosas alcalinas de SOSG (0,63 mg/L) en presencia (a) y ausencia (b) de Tyr<sub>2</sub> en función del tiempo de irradiación. [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 14 μM; pH= 9,5; λ<sub>irr</sub>= 320 nm; λ<sub>exc</sub> (fluorescencia) = 470 nm.

Posteriormente, se determinó el  $\Phi_{\Delta}$  por Tyr<sub>2</sub> bajo radiación UV-A. Para esto se utilizó Ptr como fotosensibilizador de referencia de producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, pues se conoce el valor de  $\Phi_{\Delta}$  (0,30 en medio alcalino).<sup>9</sup> Se prepararon soluciones acuosas aireadas de Tyr<sub>2</sub> y Ptr en medio alcalino (pH= 9,5) de la misma absorbancia a 320 nm (Figura 12.7.b). Se mezclaron con SOSG (Figura 12.7.c), se irradiaron y luego, se registraron los espectros de emisión de SOSG-EP excitando a 470 nm. A continuación, se graficó la intensidad a 525 nm en función del tiempo de irradiación (Figura 12.7.a), restando previamente el valor de la intensidad promedio a 525 nm obtenida de los espectros de emisión de la solución de la sonda irradiada. Finalmente, utilizando el procedimiento que se menciona en la *Sección 6.2.4.1* y a partir de la Ecuación 6.22, se calculó el valor de  $\Phi_{\Delta}$  de Tyr<sub>2</sub> a partir de las pendientes de las rectas obtenidas, alcanzando un valor de 0,15± 0,05.

Por lo tanto, a partir de los datos obtenidos en esta sección, se puede concluir que cuando Tyr<sub>2</sub> en solución acuosa y en presencia de O<sub>2</sub>, se expone a radiación UV-A, genera <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, cuya producción se demuestra con las medidas de emisión en el NIR. Por otro lado, el valor de  $\Phi_{\Delta}$  obtenido se asemeja al valor de  $\Phi_{\Delta}$  reportado para Tyr libre bajo irradiación UV-C ( $\Phi_{\Delta}$ = 0,138 ± 0,007) y a su vez, es mayor al reportado para otros aminoácidos aromáticos libres como en el

caso de Trp y Phe.<sup>1</sup> Por lo tanto, si bien Tyr no es un fotosensibilizador de  $^1\text{O}_2$  relevante debido a que no es capaz de absorber radiación solar o de fuentes artificiales comunes, la forma alcalina de Tyr<sub>2</sub> produce  $^1\text{O}_2$  con la misma eficiencia, pero al tener su espectro de absorción corrido hacia el rojo con respecto al de Tyr (Figura 11.1), es capaz de absorber radiación de las fuentes previamente mencionadas. Esto se vuelve relevante desde el punto de vista biológico, ya que a pH fisiológico, más del 50% de Tyr<sub>2</sub> se encuentra en su forma alcalina, la cual absorbe radiación UV-A y genera EROs.

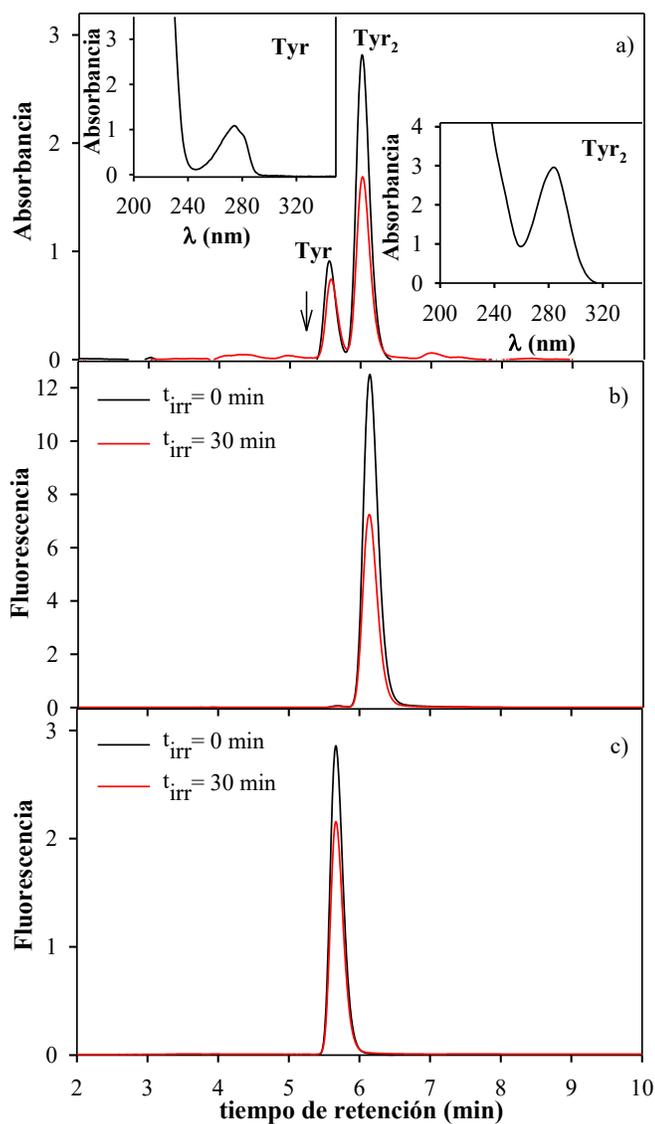


**Figura 12.7.a.** Intensidad de fluorescencia a 525 nm en función del tiempo de irradiación de soluciones acuosas de SOSG en presencia de Tyr<sub>2</sub> ( $A_{0(320\text{ nm})}$ : 0,12,  $[\text{Tyr}_2]_0$ : 14  $\mu\text{M}$ ) y Ptr ( $A_{0(320\text{ nm})}$ : 0,12,  $[\text{Ptr}]_0$ : 47  $\mu\text{M}$ ). **b)** Espectros de absorción de soluciones acuosas en medio alcalino de Tyr<sub>2</sub> y Ptr en ausencia de SOSG y de soluciones acuosas aireadas de SOSG (0,63 mg/L) en ausencia y presencia de Tyr<sub>2</sub> y de Ptr (c).

### 12.3. Capacidad de Tyr<sub>2</sub> para fotosensibilizar la oxidación de Tyr

Teniendo en cuenta los resultados presentados sobre la fotodegradación de Tyr<sub>2</sub> bajo irradiación UV-A (Capítulo 11) y de la producción de EROs descrita en las secciones previas en este capítulo, se evaluó la capacidad fotosensibilizadora de Tyr<sub>2</sub>. Para ello, se buscó un sustrato oxidable, como es el caso de Tyr, debido a que es capaz de reaccionar con  $^1\text{O}_2$ <sup>10,11</sup> y de sufrir fotooxidación por mecanismo Tipo I.<sup>2,3</sup> Por lo tanto, se preparó un solución mezcla de Tyr<sub>2</sub> (15  $\mu\text{M}$ ) y Tyr (20  $\mu\text{M}$ ) en medio alcalino (pH= 9,5) y se irradiaron en aire durante diferentes períodos de tiempo a 320 nm utilizando el *Sistema de Irradiación III*. El

análisis por HPLC-PDA a 280 nm muestra que al irradiar la solución con radiación UV-A donde Tyr no absorbe, además del descenso esperable del área del pico cromatográfico correspondiente a Tyr<sub>2</sub>, se observa un descenso del área de Tyr en función del tiempo de irradiación (Figura 12.8.a). A su vez, para ganar especificidad, se realizó el análisis cromatográfico utilizando el detector HPLC-FL en las condiciones de emisión características de Tyr<sub>2</sub> y Tyr ( $\lambda_{exc}= 280 \text{ nm}/\lambda_{em}= 410 \text{ nm}$  y  $\lambda_{exc}= 275 \text{ nm}/\lambda_{em}= 300 \text{ nm}$ , respectivamente) (Figura 12.8.b y c).

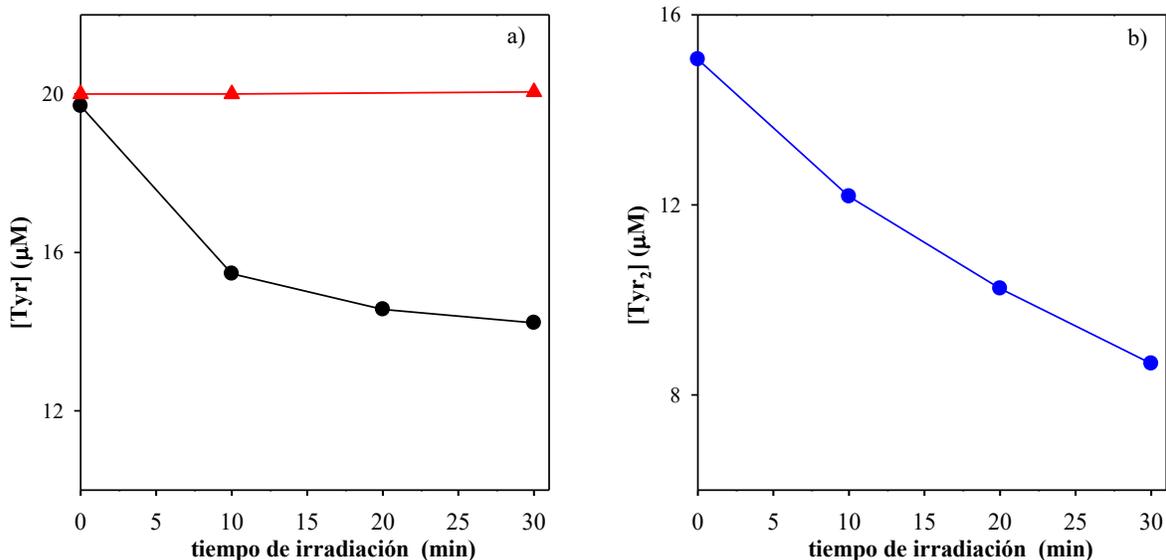


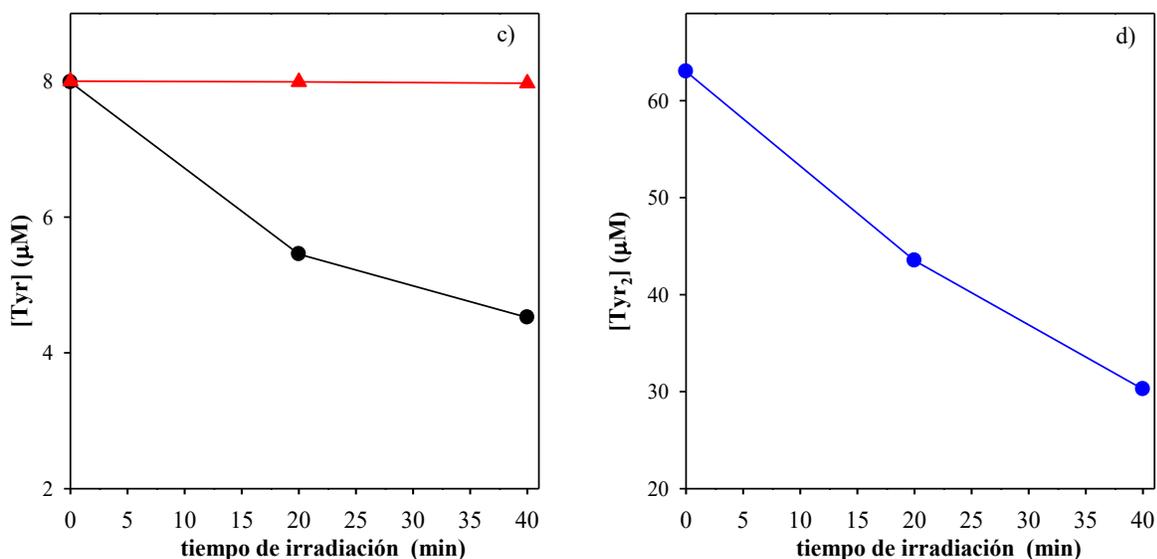
**Figura 12.8.a.** Cromatogramas registrados con HPLC-PDA ( $\lambda_{ana}= 280 \text{ nm}$ ) antes y después de 30 min de irradiación para una solución alcalina de Tyr<sub>2</sub> y Tyr equilibradas con aire. Insets: espectro absorción de Tyr y Tyr<sub>2</sub>. Cromatogramas registrados con HPLC-FL en las condiciones de excitación/emisión de Tyr<sub>2</sub> (b) y de Tyr (c) antes y después de 30 min de irradiación. Condiciones de irradiación:  $[\text{Tyr}_2]_0: 15 \mu\text{M}$ ;  $[\text{Tyr}]_0: 20 \mu\text{M}$ ; pH=

9,5;  $\lambda_{\text{ir}} = 320$  nm. Condiciones de corrida: 100% HCOOH 25 mM; pH 3,3; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 100$   $\mu\text{L}$ ; columna analítica Synergi Polar RP.

La cuantificación del consumo de Tyr<sub>2</sub> y Tyr se realizó a partir de la integración de los picos obtenidos en los cromatogramas registrados por HPLC-FL. Se realizó el control del consumo de Tyr en ausencia de Tyr<sub>2</sub>, para verificar que el consumo observado se debe al proceso fotosensibilizado. Efectivamente, no se observó consumo de Tyr en ausencia de Tyr<sub>2</sub> (Figura 12.9.a). Se repitió el experimento en otras condiciones experimentales (Tyr<sub>2</sub> (63  $\mu\text{M}$ ) y Tyr (8  $\mu\text{M}$ )) en medio alcalino. Como se muestra en la Figura 12.9.c, se observa el mismo comportamiento que en el experimento anterior, pero se logró aumentar el consumo de Tyr casi a un 50%.

A partir de estos resultados, se puede afirmar que Tyr<sub>2</sub> es capaz de generar daño químico fotoinducido en biomoléculas oxidables, como es el caso de Tyr. A diferencia de fotosensibilizadores exógenos, Tyr<sub>2</sub> se forma como un daño oxidativo dentro de estructuras proteicas, lo que implica que estamos en presencia de la formación de un fotosensibilizador intrínseco, el cual puede aumentar aún más el daño en sistemas vivos por exposición a radiación UV-A.





**Figura 12.9.** Variación de la concentración de soluciones acuosas de Tyr en presencia (●) y ausencia (▲) de Tyr<sub>2</sub> en función del tiempo de irradiación: **a)** [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 15 μM; [Tyr]<sub>0</sub>: 20 μM y **c)** [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 63 μM; [Tyr]<sub>0</sub> = 8 μM. Consumo de Tyr<sub>2</sub> en la reacción fotosensibilizada de Tyr: **b)** [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub>: 15 μM y **d)** [Tyr<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 63 μM. pH= 9,5; λ<sub>irr</sub>= 320 nm.

### **Bibliografía**

- <sup>1</sup> K. K. Chin, C. C. Trevithick-Sutton, *et.al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 6912-6913, 2008.
- <sup>2</sup> C. Castaño, *et.al*, *Photochem Photobiol.*, **89**, 1448-1455, 2013.
- <sup>3</sup> E. Silva, J. Godoy, *Internat J. Vit. Nutr Res.*, **64**, 253-256, 1994.
- <sup>4</sup> B. H. J. Bielski, *et.al*, *J. Phys. Chem. Ref. Data.*, **14**, 1041-1100, 1985.
- <sup>5</sup> R. Kuciel, A. Mazurkiewicz, *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, **32**, 183-186, 2004.
- <sup>6</sup> A. Gollmer, *et.al*, *Photochem Photobiol.*, **87**, 671-679, 2011.
- <sup>7</sup> C. Flors, *et.al*, *J. Exp. Bot.*, **57**, 1725-1734, 2006.
- <sup>8</sup> S. Kim, *et.al*, *J. Phys. Chem. B*, **117** (45), 13985-13992, 2013.
- <sup>9</sup> C. Lorente, A. H. Thomas, *Acc. Chem. Res.*, **39** (6), 395-402, 2006.
- <sup>10</sup> S. Criado, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **68**, 453-458, 1998.
- <sup>11</sup> A. Wright, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **76**, 35-46, 2002.

**RESULTADOS**

**PARTE II**



## CAPÍTULO 13

# DAÑO FOTOINDUCIDO A UBIQUITINA EN PRESENCIA DE O<sub>2</sub>

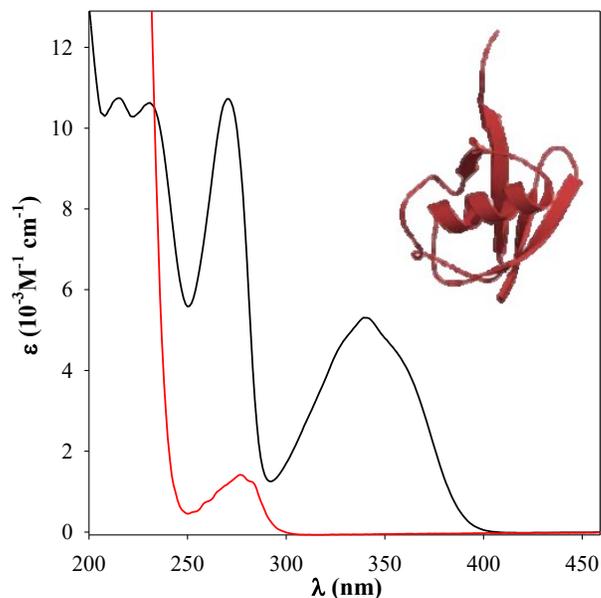
Ubiquitina (Ub) es una proteína pequeña altamente conservada de 8,5 kDa (76 aminoácidos), presente en todas las células eucariotas.<sup>1,2</sup> Posee una estructura globular compacta con un núcleo hidrofóbico. Presenta una 16% de estructura  $\alpha$ -hélice, un 37% de lámina  $\beta$  y el resto de estructuras con giro.<sup>3</sup> Su función biológica consiste en unirse covalentemente a residuos Lys de otras proteínas intracelulares, de manera de marcarlas para su degradación en un proteasoma, para alterar su función o para direccionar proteínas de membrana hacia los lisosomas.

Con el fin de estudiar la formación de Tyr<sub>2</sub> en entornos peptídicos, se utilizó como modelo proteico a Ub, ya que contiene un sólo residuo Tyr, facilitando el estudio de la formación de Tyr<sub>2</sub> al evitarse la formación de aglomerados proteicos. A su vez, posee 7 Lys y tiene la ventaja de no contener ningún residuo Trp, ya que sus productos de fotooxidación mediados por Ptr son fluorescentes e interferían en las medidas de emisión de Tyr<sub>2</sub>. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue investigar la formación de Tyr<sub>2</sub> y el daño químico y estructural generado en Ub como consecuencia de la fotosensibilización por Ptr bajo radiación UV-A.

### 13.1. Fotosensibilización de Ub por Ptr

Se comenzó investigando si Ptr era capaz de fotoinducir daño en Ub en solución acuosa bajo irradiación UV-A. Para ello, soluciones acuosas aireadas que contenían Ptr y Ub fueron expuestas a irradiación (*Sistema de Irradiación II, Sección 5.4.1*) por diferentes períodos de tiempo ( $\lambda_{\text{irr}}= 350 \text{ nm}$ ). Posteriormente, las muestras se analizaron por diferentes técnicas tales como SDS-PAGE, HPLC-PDA, HPLC-FL, MALDI-TOF y nano-LC MS. Los experimentos se llevaron a cabo a pH 6,0 $\pm$ 0,1, para trabajar con la forma ácida de Ptr, la cual predomina a pH fisiológico, como se mencionó en el Capítulo 3. Bajo estas condiciones

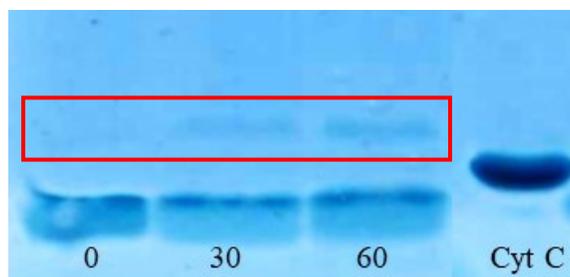
experimentales sólo Ptr es excitada, ya que la proteína no absorbe a la longitud de onda de excitación (Figura 13.1).



**Figura 13.1.** Espectro de absorción de soluciones acuosas aireadas de Ub (línea negra) y de Ptr a pH ácido (línea roja). pH= 6,0. Estructura tridimensional de la Ub.

### 13.1.1. Análisis electroforético

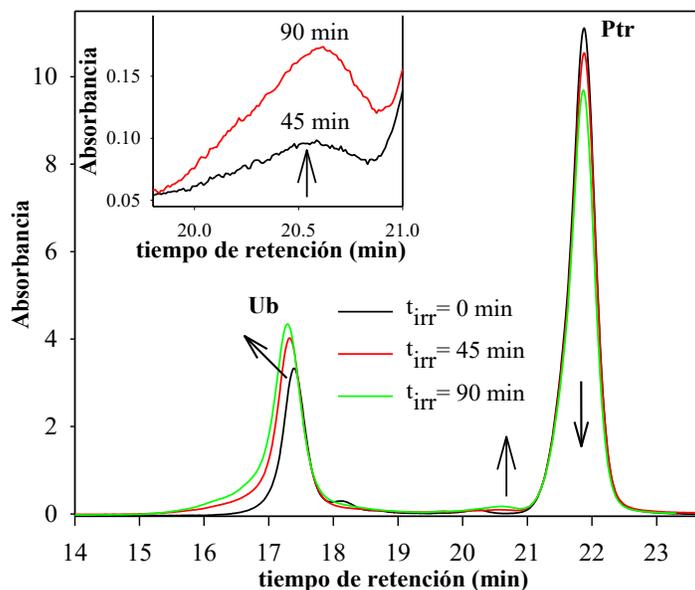
Siendo Tyr<sub>2</sub> uno de los productos de la fotosensibilización de Tyr por Ptr en presencia de O<sub>2</sub> (Capítulo 9),<sup>4</sup> se evaluó si Ub sufre dimerización cuando se expone a irradiación en presencia de Ptr. Se analizaron las muestras irradiadas por SDS-PAGE (*Sección 8.1*) ([Ub]: 45 μM, [Ptr]: 45 μM, pH= 6,0). Como se puede ver en la Figura 13.2, se forma una nueva banda electroforética cuya intensidad aumenta en función del tiempo de irradiación con un peso molecular que se corresponde con el doble del peso molecular de la proteína. No se registraron productos de mayor peso molecular que el dímero. Este resultado indica que la Ub se dimeriza como consecuencia del proceso fotosensibilizado y que, al tener un solo residuo Tyr, esta dimerización podría estar mediada por Tyr<sub>2</sub>.



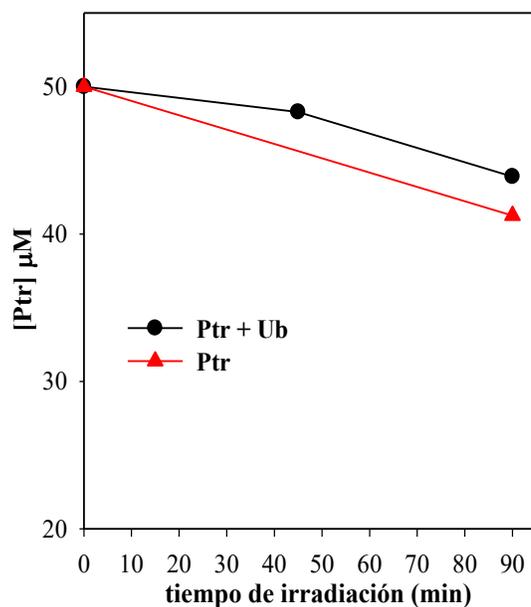
**Figura 13.2.** Perfil electroforético de soluciones acuosas de Ub y Ptr irradiadas durante 0, 30 y 60 min en presencia O<sub>2</sub>. Cyt C se utilizó como control de peso molecular (12,5 kDa). Condiciones SDS-PAGE: gel *resolving* 20%, gel *stacking* 4%, volumen de siembra: 20  $\mu$ l, tinción Azul de Coomasie. Condiciones de irradiación: [Ub]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M, [Ptr]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M,  $\lambda_{irr}$ = 350 nm.

### 13.1.2. Análisis cromatográfico

Se analizaron las soluciones irradiadas ([Ub]: 45  $\mu$ M, [Ptr]: 45  $\mu$ M, pH= 6,0) por HPLC-PDA y HPLC-FL utilizando una columna de exclusión molecular (Biosep-SEC-2000, *Sección 7.1*) y Tris 10 mM con NaCl 50 mM a pH 5,5 como fase móvil. En la Figura 13.3 se observa el cromatograma registrado a 280 nm, donde se puede ver un corrimiento del pico correspondiente a Ub a tiempos de retención más cortos a medida que aumenta el tiempo de irradiación. Por otra parte, se observa un aumento del área en la zona de la proteína. Este resultado sugiere que se están formando productos de mayor peso molecular, que poseen un coeficiente de extinción molar mayor que la proteína a esa longitud de onda. Al analizar el pico correspondiente a Ptr en el cromatograma a 280 nm, se puede ver el consumo del fotosensibilizador con el tiempo de irradiación. El consumo de Ptr en presencia de Ub se comparó con experimentos en los cuales no había Ub, donde se observó que el consumo en ausencia y presencia de Ub es el mismo, dentro del error experimental (Figura 13.4). Por otro lado, también se puede ver la formación de productos con tiempos de retención entre los correspondientes a Ub y a Ptr, indicando que como consecuencia del proceso fotosensibilizado, se forman productos con peso molecular mayor a Ptr y menor que Ub (Inset Figura 13.3). Este resultado sugiere que la proteína no solo dimeriza, sino que sufre una ruptura como consecuencia del proceso fotosensibilizado. Este resultado es muy importante, debido a que hasta el momento no se había observado la fragmentación de proteínas como consecuencia de la fotosensibilización por Ptr.

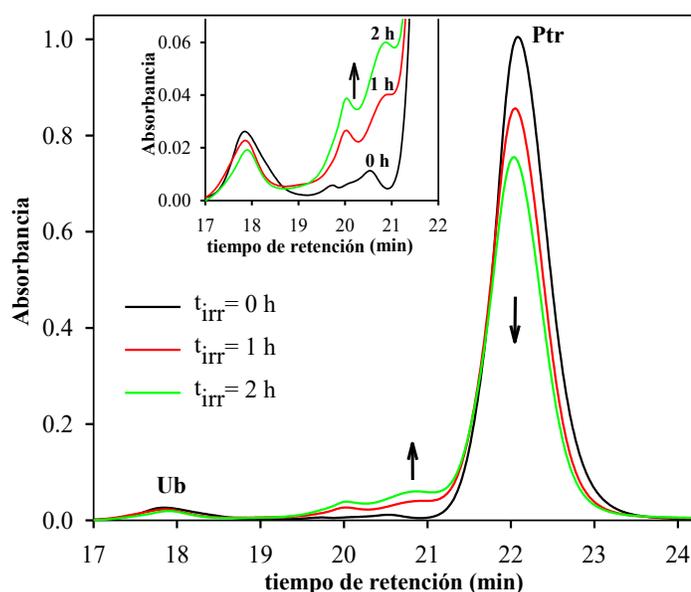


**Figura 13.3.** Cromatogramas registrados con el HPLC-PDA ( $\lambda_{ana} = 280$  nm) para una solución mezcla de Ub y Ptr equilibradas en aire irradiada durante distintos períodos de tiempo. Inset: ampliación cromatograma en la zona comprendida entre 19,8 y 21,0 min. Condiciones de irradiación:  $[Ub]_0 = 45 \mu M$ ;  $[Ptr]_0 = 45 \mu M$ ; pH= 6,0;  $\lambda_{irr} = 350$  nm. Condiciones de corrida: 100% Tris 10 mM y NaCl 50 mM: pH 5,5; 0,6 mL/min;  $vol_{iny} = 100 \mu L$ ; columna Biosep-SEC-2000.



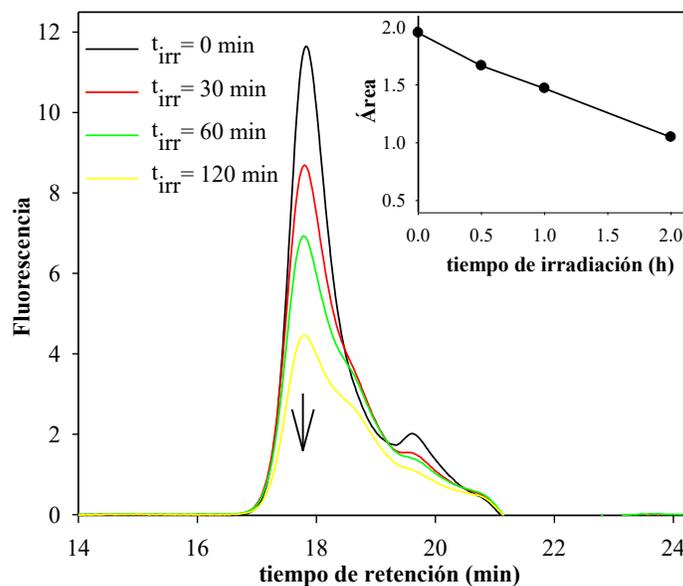
**Figura 13.4.** Evolución de la concentración de soluciones acuosas aireadas Ptr en ausencia y presencia de Ub irradiadas durante distintos períodos de tiempo. Condiciones de irradiación:  $[Ub]_0 = 45 \mu M$ ;  $[Ptr]_0 = 45 \mu M$ ; pH: 6,0;  $\lambda_{irr} = 350$  nm.

Se realizaron fotólisis de soluciones de Ub y Ptr a distintas concentraciones. Se comenzó aumentando la concentración de Ptr a 200  $\mu\text{M}$  en la mezcla de reacción, manteniendo la concentración de Ub constante. Como se puede ver en la Figura 13.5, al analizar las muestras irradiadas en estas condiciones por HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}} = 280 \text{ nm}$ ), se observa un descenso del pico correspondiente a Ub y un aumento en la formación de productos de menor peso molecular, a diferencia de lo observado en la Figura 13.3. Se pudieron detectar al menos dos fragmentos, cuyas áreas aumentan con el tiempo de irradiación (Inset Figura 13.5). Este resultado indica que al aumentar la concentración del fotosensibilizador en presencia de O<sub>2</sub>, se favorece la fragmentación de la proteína.



**Figura 13.5.** Cromatogramas registrados con el HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}} = 280 \text{ nm}$ ) para una solución mezcla de Ub y Ptr aireada irradiada durante distintos períodos de tiempo. Condiciones de irradiación:  $[\text{Ub}]_0$ : 45  $\mu\text{M}$ ;  $[\text{Ptr}]_0$ : 200  $\mu\text{M}$ ; pH: 6,0;  $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$ . Condiciones de corrida: 100% H<sub>2</sub>O y NaCl 100 mM: pH 5,5; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 350 \mu\text{L}$ ; columna Biosep-SEC-2000.

El análisis por HPLC-FL se realizó utilizando las condiciones de excitación/emisión de Tyr ( $\lambda_{\text{exc}} = 275 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 300 \text{ nm}$ ), debido a que es el único cromóforo que absorbe a 280 nm en la proteína. En la Figura 13.6 se puede ver el descenso de la emisión del pico de Ub, en función del tiempo de irradiación, indicando que el residuo Tyr sufre una modificación durante el proceso fotosensibilizado.

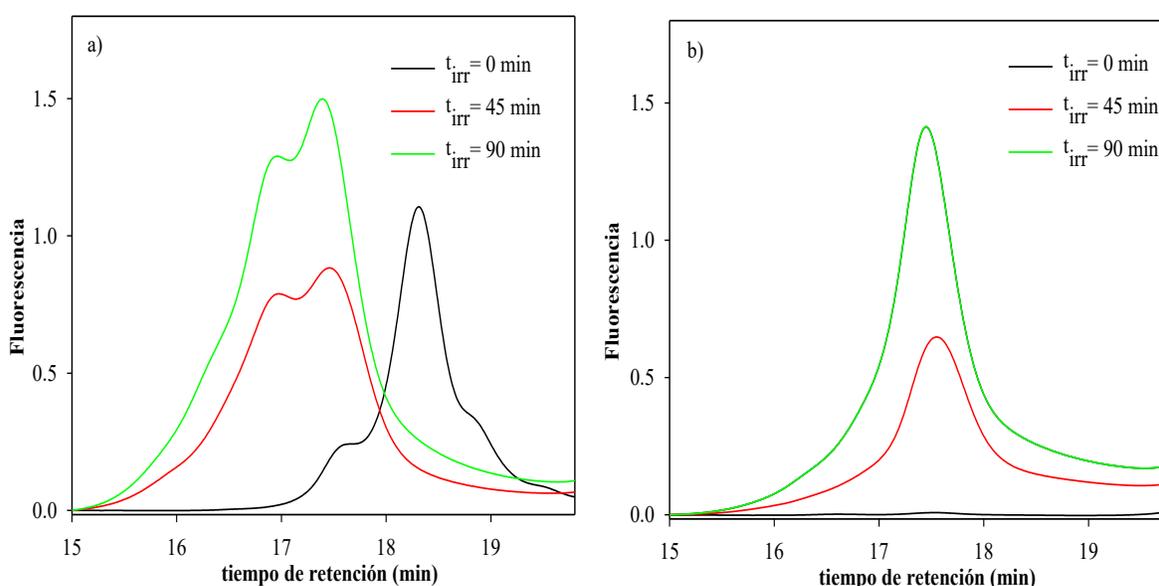


**Figura 13.6.** Cromatogramas registrados con el HPLC-FL ( $\lambda_{exc} = 275 \text{ nm}$  /  $\lambda_{em} = 300 \text{ nm}$ ) de soluciones acuosas aireadas de Ub y Ptr irradiadas durante distintos períodos de tiempo. Condiciones de irradiación:  $[\text{Ub}]_0$ :  $45 \mu\text{M}$ ;  $[\text{Ptr}]_0$ :  $150 \mu\text{M}$ ; pH: 6,0;  $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$ . Condiciones de corrida: 100%  $\text{H}_2\text{O}$  y NaCl 100 mM: pH 5,5; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ; columna Biosep-SEC-2000.

Se registraron los cromatogramas con el HPLC-FL utilizando las condiciones características de excitación/emisión de Tyr<sub>2</sub> ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410 \text{ nm}$ ), para evaluar si Tyr<sub>2</sub> estaba presente en los fotoproductos. Como se puede ver en la Figura 13.7.a, aparece un nuevo pico, con un tiempo de retención menor que el de Ub ( $t_{ret} = 16,9 \text{ min}$ ), cuya área aumenta con el tiempo de irradiación, sugiriendo que estamos en presencia de un producto de mayor peso molecular con condiciones de emisión compatibles con las de Tyr<sub>2</sub>. En la Figura 13.7.a también se puede observar otro pico, con un tiempo de retención similar al de Ub, el cual emite en las condiciones de análisis. Sin embargo, la emisión de ese pico no se puede corresponder a Tyr<sub>2</sub> en Ub monomérica, considerando que posee un único residuo Tyr. Al observar el tiempo cero, se puede ver que en estas condiciones hay una emisión que no coincide con la de los fotoproductos ni a Ub y que se debe a una impureza presente en el sólido comercial de Ub.

Teniendo en cuenta que bajo radiación UV-A, Ptr reacciona con dTMP generando distintos productos y que en ausencia de  $\text{O}_2$ , se genera un fotoaducto donde Ptr se une covalentemente con la estructura de dTMP,<sup>5</sup> se buscó investigar si en nuestro sistema se

podría formar un fotoaducto Ub-Ptr pero en condiciones aeróbicas. Considerando que Ptr es capaz de emitir en las condiciones de emisión de Tyr<sub>2</sub>, ya que absorbe a 280 nm y tiene una baja emisión a 410 nm, se buscó evaluar si la emisión observada se podría corresponder a Ptr unida a Ub. Para ello, se analizó el cromatograma con el HPLC-FL, pero en condiciones donde solo se puede evaluar la emisión de Ptr ( $\lambda_{exc}= 350$  nm,  $\lambda_{em}= 450$  nm). Como se puede ver en la Figura 13.7.b, se observa un único pico que emite con tiempo de retención similar al de Ub. Este dato sugiere que Ptr podría estar unida a la proteína, ya que justifica el aumento del área observada en las condiciones de emisión de Tyr<sub>2</sub> de las soluciones irradiadas, debido a que ambos productos aportan a la emisión.

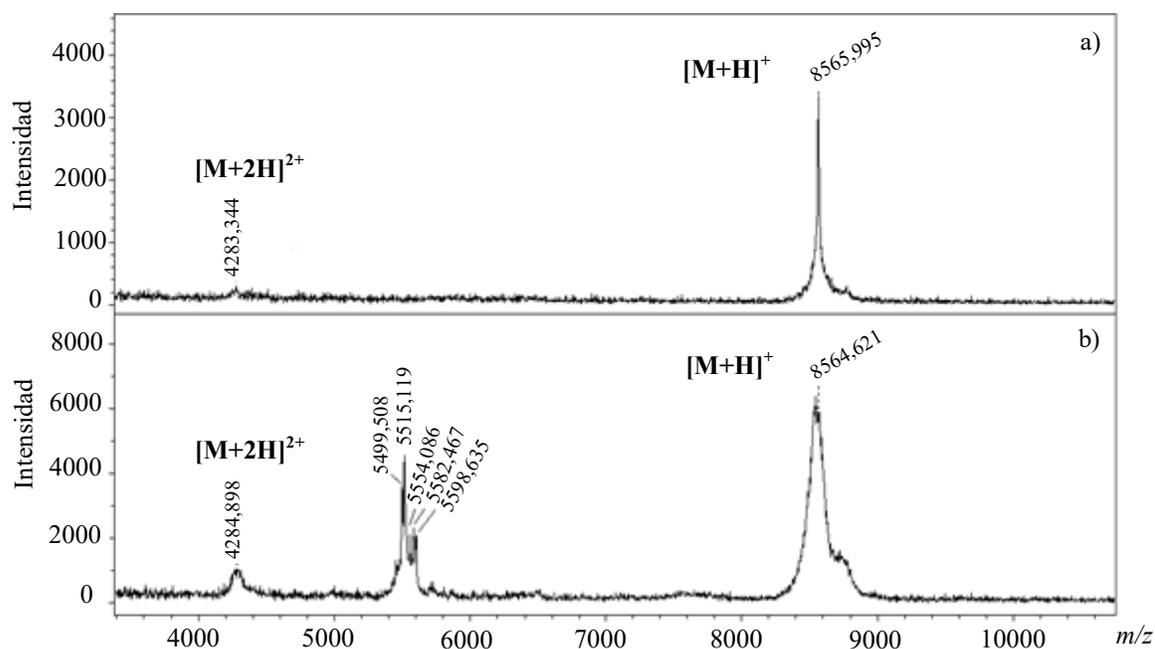


**Figura 13.7.** Cromatogramas registrados con el HPLC-FL de soluciones acuosas aireadas de Ub y Ptr irradiadas durante distintos períodos de tiempo, (a)  $\lambda_{exc}= 280$  nm,  $\lambda_{em}= 405$  nm y (b)  $\lambda_{exc}= 350$  nm,  $\lambda_{em}= 450$  nm. Condiciones de irradiación: [Ub]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; [Ptr]<sub>0</sub>: 150  $\mu$ M; pH: 6,0;  $\lambda_{irr}= 350$  nm. Condiciones de corrida: 100% Tris 10 mM y NaCl 100 mM; pH 5,5; 0,6 mL/min;  $vol_{inj}= 100$   $\mu$ L; columna Biosep-SEC-2000.

### 13.2. Análisis de fotoproductos por MALDI-TOF y nano-LC MS

Con el fin de profundizar en el estudio de los distintos fotoproductos generados en el proceso fotoquímico, se llevó a cabo el análisis de las soluciones acuosas aireadas de Ub y Ptr por espectroscopía de masas, utilizando distintos métodos de ionización (MALDI-MS y ESI-MS, Sección 8.3 y 7.3.1, respectivamente).

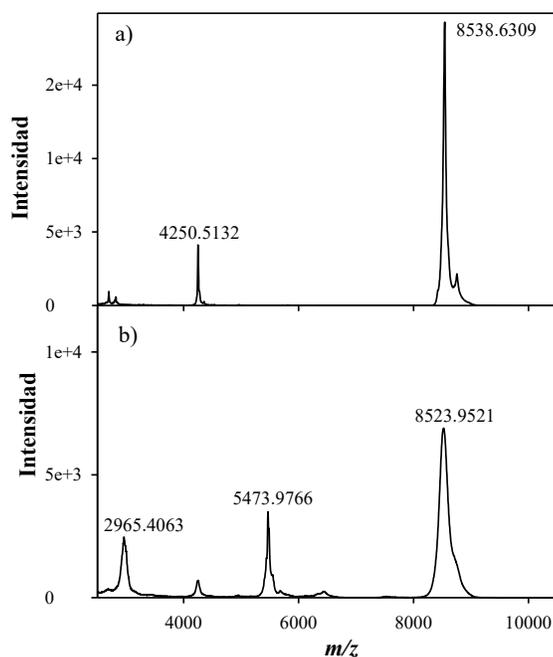
En la Figura 13.8.a, se puede observar el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF (Equipo I) de una solución Ub (45  $\mu\text{M}$ ) y Ptr (45  $\mu\text{M}$ ) sin irradiar, donde el pico más intenso con un máximo en  $m/z = 8565$ , se corresponde al ion molecular ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{M} = \text{Ub}$ ) y uno menos intenso, correspondiente a su ion dicargado ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ,  $m/z = 4283$ ). Al analizar el espectro obtenido luego de 90 minutos de irradiación (*Sistema de Irradiación II*), se puede observar un ensanchamiento del pico correspondiente al ion monocargado de Ub (Figura 13.8.b). Esto estaría indicando que durante el proceso fotosensibilizado se están formando distintos productos con pesos moleculares similares al de Ub, ya que no se logran distinguir como picos individuales. Este resultado sugiere la incorporación de átomos de oxígeno en la proteína, sin embargo, se observa un hombro con un  $m/z$  que no se podría justificar únicamente con la incorporación de átomos de oxígeno. Por otro lado, se detectaron señales intensas en el rango de  $m/z$  de 5400-5600. Estos picos de menor peso molecular, podrían justificar los fragmentos observados previamente por HPLC (*Sección 13.1.2*), generados luego de la exposición de Ub en presencia de Ptr a radiación UV-A. Si se calcula la diferencia entre los picos correspondientes a los fragmentos obtenidos con  $m/z = 5499,51$  y  $m/z = 5515,12$  y  $m/z = 5582,47$  y  $m/z = 5598,63$ , el  $\Delta m/z$  es 16 en ambos casos, confirmando que se observan productos cuya diferencia es un átomo de oxígeno. Por lo tanto, durante la fotosensibilización la proteína se fragmenta y se oxida.



**Figura 13.8.** Espectro de masas UV-MALDI en modo positivo de una solución acuosa aireada de Ub y Ptr

antes (a) y después de 90 min (b) de irradiación. Matriz SA; rango  $m/z$ : 3700-10300. Condiciones de irradiación:  $[Ub]_0$ : 45  $\mu$ M;  $[Ptr]_0$ : 45  $\mu$ M; pH: 6,0;  $\lambda_{irr}$ = 350 nm.

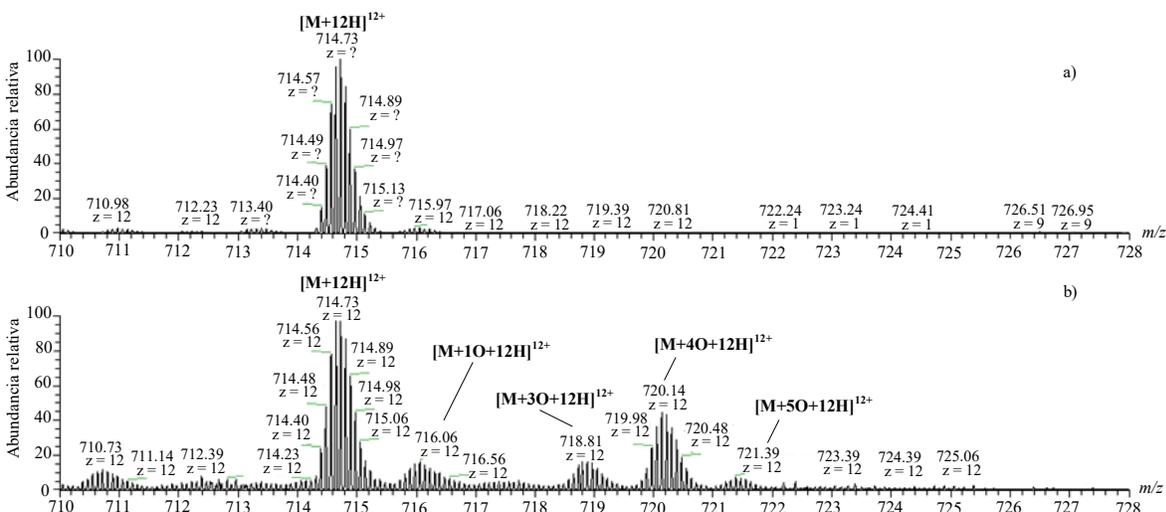
Se llevó a cabo un segundo análisis por MALDI-TOF (Equipo 2, Sección 8.3) de soluciones de Ub y Ptr irradiadas con el Sistema de Irradiación IV. Como se puede ver en la Figura 13.9.a, en la solución sin irradiar se observa el ion molecular correspondiente a Ub con un máximo en  $m/z$  de 8538 y su ion dicargado con un máximo en 4250. Luego de la irradiación de la muestra durante 90 minutos, se observan dos nuevos picos con  $m/z$  de 2965 y 5473, cuya suma se aproxima a la masa del ion molecular. Este resultado apoya la evidencia obtenida anteriormente en el análisis por HPLC-PDA a favor de la ruptura de Ub en dos fragmentos de pesos moleculares menores, pero mayores al de Ptr (Figura 13.5).



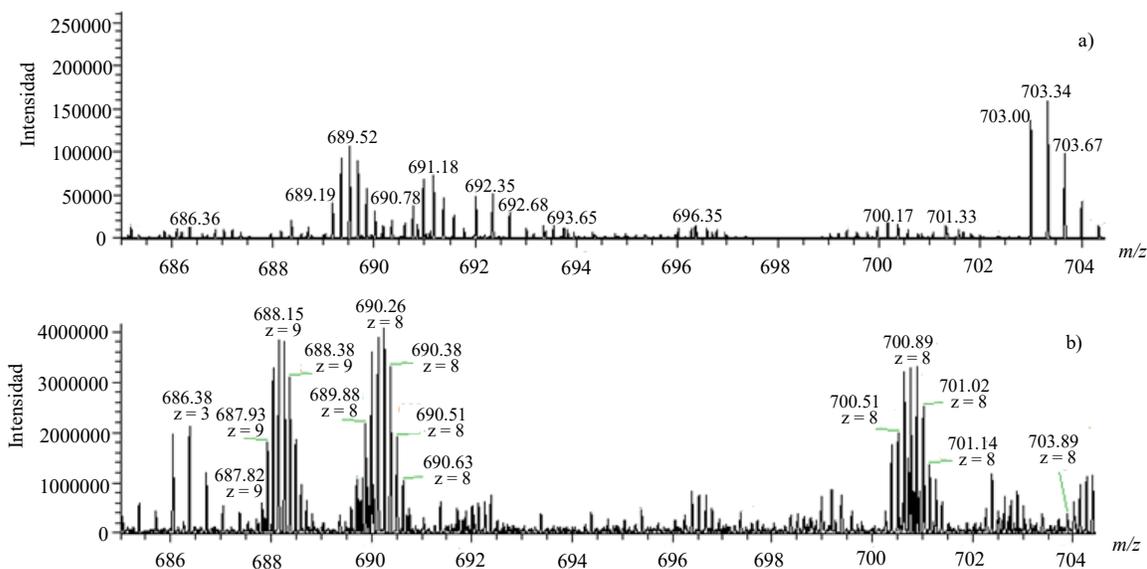
**Figura 13.9.** Espectro de masas UV-MALDI en modo positivo de una solución acuosa aireada de Ub y Ptr antes (a) y después de 90 min (b) de irradiación. Matriz SA; rango  $m/z$ : 2500-10500. Condiciones de irradiación:  $[Ub]_0$ : 45  $\mu$ M;  $[Ptr]_0$ : 45  $\mu$ M; pH: 6,0;  $\lambda_{irr}$ = 350 nm.

Debido a la complejidad del sistema de reacción, en el cual se forman diversos fotoproductos, se llevaron a cabo estudios adicionales por nano-LC MS de soluciones

aireadas de Ub y Ptr a distintas concentraciones. Por un lado, en los espectros de masas obtenidos para soluciones irradiadas de Ub (45  $\mu\text{M}$ ) y Ptr (45  $\mu\text{M}$ ) durante 90 minutos (*Sistema de Irradiación II*), se lograron detectar productos de oxidación que coinciden con la incorporación desde uno a cinco átomos de oxígeno en Ub con  $m/z = 716,0585$   $[\text{M}+\text{O}+12\text{H}]^{12+}$ ,  $m/z = 718,8092$   $[\text{M}+3\text{O}+12\text{H}]^{12+}$ ,  $m/z = 720,1422$   $[\text{M}+4\text{O}+12\text{H}]^{12+}$ , y  $m/z = 721,3905$   $[\text{M}+5\text{O}+12\text{H}]^{12+}$  (Figura 13.10). Este resultado justifica el ensanchamiento del pico correspondiente al ion molecular de Ub, observado en la Figura 13.8.b. Por otro lado, a partir de los espectros de masas obtenidos de soluciones irradiadas de Ub (45  $\mu\text{M}$ ) y Ptr (200  $\mu\text{M}$ ) durante 120 minutos (*Sistema de Irradiación II*), se pudo confirmar la formación de los mismos fragmentos observados en la Figura 13.8.b, con masas moleculares exactas de 5514,0520 Da y 5598,1208 Da, detectadas como especies iónicas con  $m/z = 690,2565$  ( $z = 8$ ) y con  $m/z = 700,7651$  ( $z = 8$ ), respectivamente (Figura 13.11.b). Además, aparece una nueva señal con un  $m/z = 688,1544$  ( $z = 9$ ), que se corresponde con la masa molecular exacta de 6184,3896 Da. Ninguna de estas señales aparece en el espectro de masas obtenido para la solución sin irradiar (Figura 13.11.a).



**Figura 13.10.** Espectro de masas ESI en modo positivo de una solución acuosa aireada de Ub y Ptr antes (a) y después de 90 min (b) de irradiación. Condiciones de irradiación:  $[\text{Ub}]_0$ : 45  $\mu\text{M}$ ;  $[\text{Ptr}]_0$ : 45  $\mu\text{M}$ ; pH: 6,0;  $\lambda_{\text{irr}} = 350$  nm.



**Figura 13.11.** Espectro de masas ESI en modo positivo de una solución acuosa aireada de Ub y Ptr antes (a) y después de 120 min (b) de irradiación. Condiciones de irradiación: [Ub]<sub>0</sub>: 45 μM; [Ptr]<sub>0</sub>: 200 μM; pH: 6,0; λ<sub>irr</sub>= 350 nm.

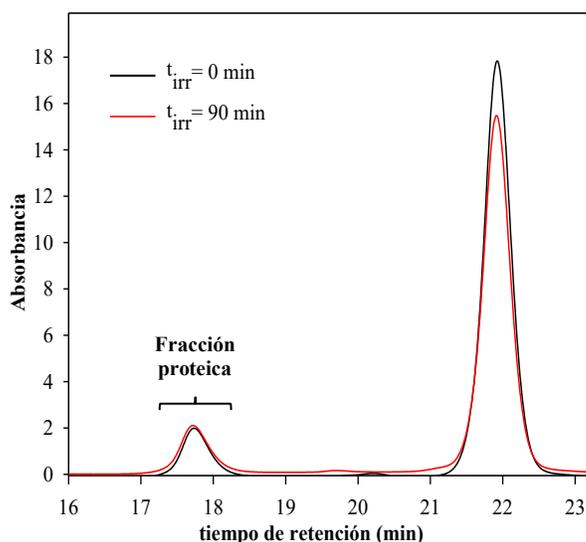
### 13.3. Caracterización del producto compatible con el aducto Ub-Ptr

#### 13.3.1. Aislamiento

Se llevó a cabo el aislamiento de la fracción proteica (Figura 13.12) de Ptr a partir de corridas cromatográficas obtenidas por HPLC-PDA, utilizando una columna Biosep-SEC-2000 y una solución acuosa de NaCl 100 mM a pH 5,5, como solvente de corrida. Se recolectó la fase móvil luego de que la muestra atraviesa por el detector PDA (λ<sub>ana</sub>= 280 nm). En la Figura 13.12 se muestra el rango de recolección empleado para el aislamiento. Teniendo en cuenta el flujo utilizado en las corridas cromatográficas (0,6 mL/min) y el rango de recolección, se obtuvo un volumen de 500 μL para cada muestra.

Por otro lado, para aislar la fracción proteica en condiciones desnaturizantes, las muestras de Ub y Ptr se pasaron a través de columnas de *sephadex* G-25 siguiendo el protocolo descrito en la *Sección 7.4*. Se utilizó H<sub>2</sub>O como solvente para la elución de las muestras, de manera de evitar procesos de *quenching* de fluorescencia por los componentes de buffers. Previamente a la siembra, se llevó a cabo la desnaturización de las muestras con cloruro de guanidinio (CIG) 3 M. Se estableció un volumen de siembra de 2,5 mL y un

volumen de elución de 3,5 mL a partir de las especificaciones de las columnas utilizadas y de lo reportado para la purificación del fotoaducto de Ub-HTB.<sup>6</sup>

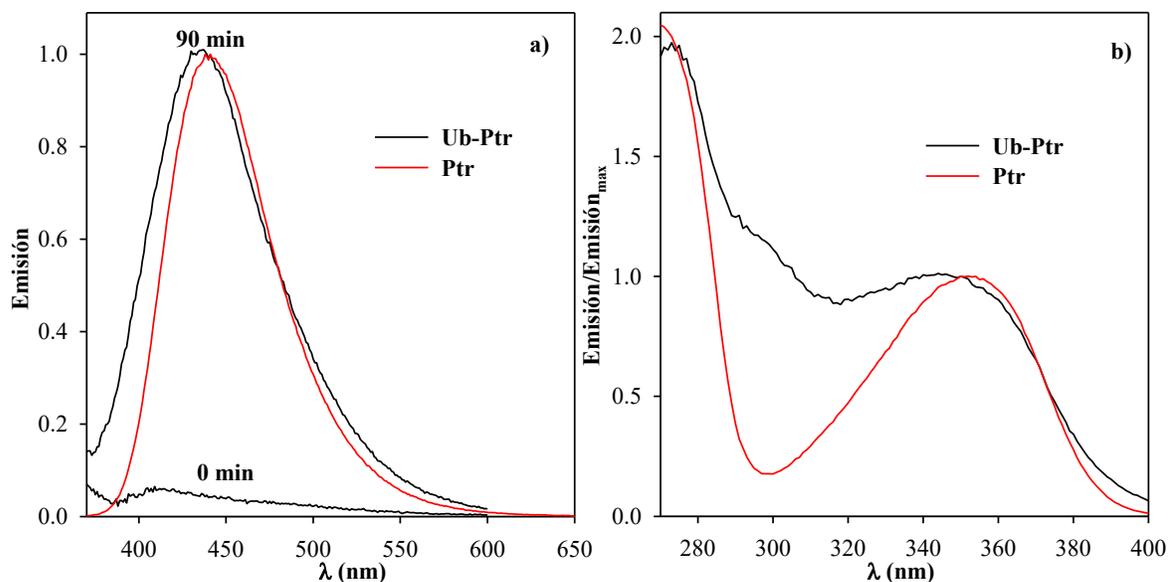


**Figura 13.12.** Cromatogramas registrados con el HPLC-PLDA ( $\lambda_{\text{ana}} = 280 \text{ nm}$ ) para una solución mezcla de Ub y Ptr aireada antes y después de 90 min de irradiación. Condiciones de irradiación:  $[\text{Ub}]_0 = 45 \mu\text{M}$ ;  $[\text{Ptr}]_0 = 45 \mu\text{M}$ ; pH: 6,0;  $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$ . Condiciones de corrida: 100%  $\text{H}_2\text{O}$  y NaCl 100 mM; pH 5,5; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 150 \mu\text{L}$ ; columna Biosep-SEC-2000.

### 13.3.2. Análisis de fluorescencia

Se llevó a cabo el análisis tanto por fluorescencia estacionaria como resuelta en el tiempo de las fracciones proteicas aisladas. En la Figura 13.13.a, se puede observar el espectro de emisión de las soluciones aisladas por columnas de *sephadex* antes y después de 90 minutos de irradiación, luego de excitarlas a 350 nm. El espectro de la muestra irradiada presentó aumento de emisión con respecto a la muestra sin irradiar, confirmando que durante el proceso fotoquímico se generó una proteína fluorescente (Figura 13.13.a). Al trabajar en condiciones desnaturalizantes, se puede confirmar la unión covalente del fluoróforo a la proteína. La banda de emisión correspondiente a la fracción proteica presenta un máximo centrado en 436 nm, el cual se aproxima al máximo de 440 nm de Ptr libre.<sup>7</sup> Sin embargo, al registrar los espectros de excitación de la fracción proteica aislada (Figura 13.13.b) siguiendo la emisión a 440 nm, si bien se observa la banda de menor energía correspondiente a Ptr, hay una banda en la zona de 300 nm que indica la presencia de otro componente que contribuye a la emisión. La formación de  $\text{Tyr}_2$  entre dos moléculas de Ub, justificaría la banda en la zona

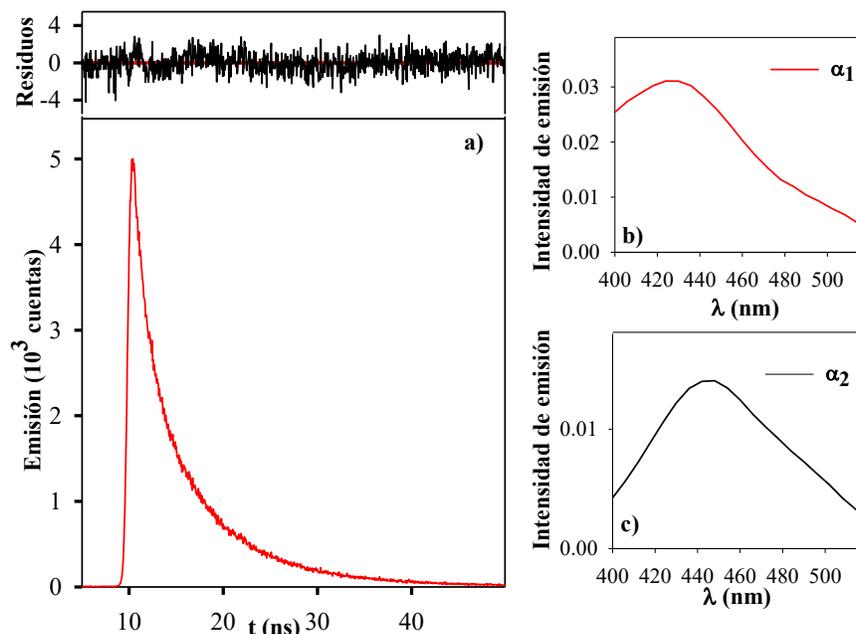
de 300 nm que se observa en el espectro de excitación de la fracción proteica aislada irradiada durante 90 minutos.



**Figura 13.13.a.** Espectros de emisión de Ptr y de soluciones acuosas aireadas de Ub y Ptr, aisladas por columnas de *sephadex* en condiciones desnaturalizantes, antes y después de 90 min de irradiación ( $\lambda_{exc}$  = 350 nm). **b)** Espectro de excitación normalizado de Ptr y de la fracción proteica aislada, después de 90 min de irradiación en ausencia de O<sub>2</sub> ( $\lambda_{em}$  = 440 nm). Condiciones de irradiación: [Ub]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; [Ptr]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; [CIG]: 3M; pH= 6,0;  $\lambda_{irr}$  = 350 nm.

En los estudios de fluorescencia resueltos en el tiempo, la muestra de Ub y Ptr aislada por HPLC-PDA irradiada por 90 minutos, se excitó utilizando como fuente de excitación un NanoLED de 341 nm y se obtuvo un decaimiento de emisión biexponencial, registrado a 450 nm (Figura 13.14.a). Del ajuste biexponencial de la curva (*Sección 6.2.3*) se obtuvieron los tiempos de vida  $\tau_{F1} = 2,9 \pm 0,5$  ns y  $\tau_{F2} = 8,7 \pm 0,5$  ns con sus correspondientes factores pre-exponenciales  $B_1 = 0,02$  y  $B_2 = 0,02$ . Para obtener el espectro de emisión y la contribución de cada componente se registró un espectro TRES, excitando la muestra a 341 nm y registrando los decaimientos entre 400 y 530 nm. La variación de los factores pre-exponenciales ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ) de los ajustes de los decaimientos originó el espectro de emisión asociado a cada componente. Se puede ver en la Figura 13.14.c, el espectro correspondiente a la componente del tiempo largo presenta características similares al de Ptr, con uno máximo centrado en 440 nm. La contribución de cada componente se calculó multiplicando el área de cada espectro

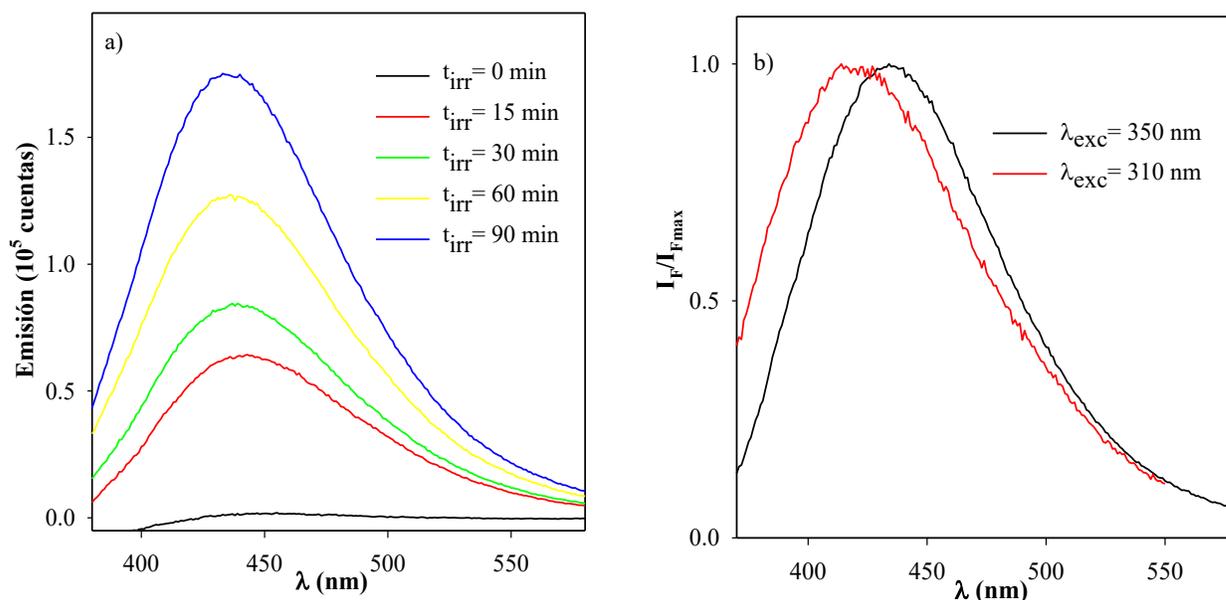
por el  $\tau_F$  correspondiente, obteniendo unos valores de 38 y 62 % para  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , respectivamente. La componente del tiempo corto podría adjudicarse a Tyr<sub>2</sub>, sin embargo, considerando que la solución se encuentra a pH 5,5 y que se excita a 341 nm, no se debería observar contribución de Tyr<sub>2</sub> (Figura 13.14.b).



**Figura 13.14.a.** Decaimiento de emisión registrado a 450 nm ( $\lambda_{exc}=341$  nm) de soluciones acuosas de Ub y Ptr aisladas por HPLC-PDA, luego de 90 min de irradiación en presencia de O<sub>2</sub>. Espectros de emisión resueltos en el tiempo, siendo  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  las componentes del tiempo corto (b) y largo (c), respectivamente. Condiciones de irradiación: [Ub]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; [Ptr]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; pH= 6,0;  $\lambda_{in}=350$  nm.

Para evaluar si la banda observada en la zona de 300 nm en el espectro de excitación de la Figura 13.13.b se corresponde a Tyr<sub>2</sub>, soluciones acuosas aireadas de Ptr y Ub se irradiaron durante diferentes períodos tiempos (*Sistema de Irradiación IV*). Luego, las muestras se aislaron con las columnas de *sephadex* y se registraron los espectros de emisión con el Equipo II (*Sección 6.2.1*,  $\lambda_{exc}=350$  nm). Se observó un aumento de emisión en función del tiempo de irradiación, con un máximo centrado en 436 nm (Figura 13.15.a). A su vez, se registraron los espectros de emisión de las mismas soluciones irradiadas, pero excitando a 310 nm, para evaluar si la presencia Tyr<sub>2</sub> influye en la emisión de las muestras aisladas. Como se puede ver en la Figura 13.15.b, al comparar los espectros normalizados obtenidos

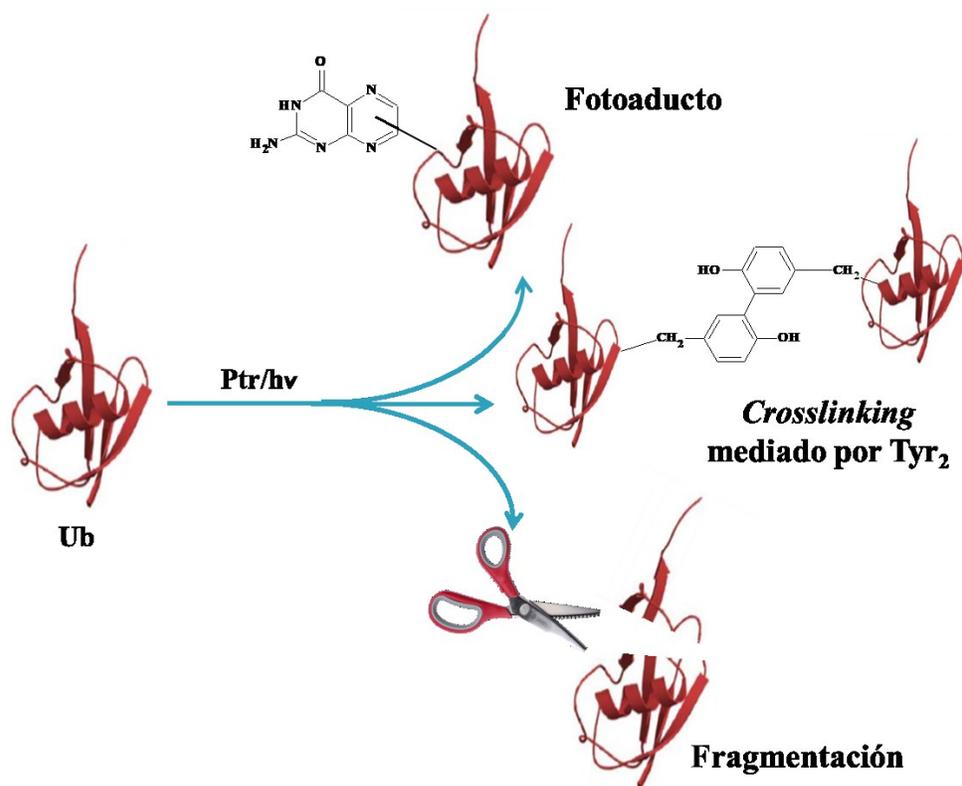
luego de 90 minutos de irradiación, hay un corrimiento del máximo de emisión hacia el azul al excitar a 310 nm, con un máximo centrado en 410 nm, lo cual es compatible con la presencia de Tyr<sub>2</sub>.



**Figura 13.15.a.** Espectros de emisión ( $\lambda_{\text{exc}} = 350$  nm) de soluciones acuosas aireadas de Ub y Ptr, aisladas por columnas de *sephadex* en condiciones desnaturalizantes, irradiadas durante distintos períodos de tiempo y **b)** espectros de emisión normalizados luego de 90 min de irradiación, excitando a 350 nm (línea negra) y a 310 nm (línea roja). Condiciones de irradiación: [Ub]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; [Ptr]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; [ClG]: 3 M; pH= 6,0;  $\lambda_{\text{irr}} = 350$  nm.

### 13.4. Esquema de reacción

A partir de los resultados presentados en este capítulo, se puede concluir que como consecuencia de la fotosensibilización de Ub por Ptr bajo radiación UV-A en presencia de O<sub>2</sub>, se generan distintos fotoproductos, entre los cuales se lograron identificar productos con incorporación de hasta 5 átomos de oxígeno. Se puede concluir que ocurren tres procesos químicos principales distintos: una dimerización, mediada por Tyr<sub>2</sub>; una fragmentación proteica, en al menos dos fragmentos; y la formación de un posible fotoaducto Ub-Ptr, el cual mantiene las propiedades espectroscópicas de Ptr libre. En el Esquema 13.1 se resumen estos procesos.



**Esquema 13.1.** Esquema de reacción del daño fotoinducido de Ub por Ptr en presencia de O<sub>2</sub> bajo radiación UV-A.

### **Bibliografía**

- <sup>1</sup> C. M. Pickart, M. J. Eddins, *BBA*, **1695**, 55-72, 2004.
- <sup>2</sup> M. Hochstrasser, *Nature*, **458**, 422-429, 2009.
- <sup>3</sup> S.Vijay-Kumar, *et.al*, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, **82**, 3582-3585, 1985.
- <sup>4</sup> C. Castaño, *et.al*, *Photochem. Photobiol*, **89**, 1448-1455, 2013.
- <sup>5</sup> M.P. Serrano, *et.al*, *Free Radical Bio Med.*, **96**, 418 —431, 2016.
- <sup>6</sup> E. Nuin, *et.al*, *Front Pharmacol.*, **2**, 1-8, 2016.
- <sup>7</sup> C. Lorente, A.H. Thomas, *Acc. Chem. Res.*, **39**, 395-402, 2006.

# CAPÍTULO 14

## DAÑO FOTOINDUCIDO A UBIQUITINA EN AUSENCIA DE O<sub>2</sub>

En el Capítulo 13 se mostró fuerte evidencia de la formación de un aducto covalente Ub-Ptr. Sin embargo, por la complejidad de los procesos involucrados, se recurrió al estudio de soluciones acuosas de Ub y Ptr en anaerobiosis. Se encuentra reportado que la formación de aductos de Ptr con dTMP<sup>1</sup>, 2'-desoxitimidina (dT)<sup>2</sup> y ADN<sup>3</sup> ocurre únicamente en ausencia de O<sub>2</sub>. Teniendo en cuenta que Ub posee un peso molecular lo suficientemente bajo como para permitir el burbujeo de gases (Ar o N<sub>2</sub>) en la solución, se buscó estudiar y evaluar si en condiciones anaeróbicas se forma el producto visto en condiciones aeróbicas y si su formación en estas condiciones es más eficiente. Además, al trabajar en anaerobiosis con proteínas, se evita la formación de productos de oxidación de distintos aminoácidos, como lo mencionado para Tyr.<sup>4,5,6,7,8,9</sup>

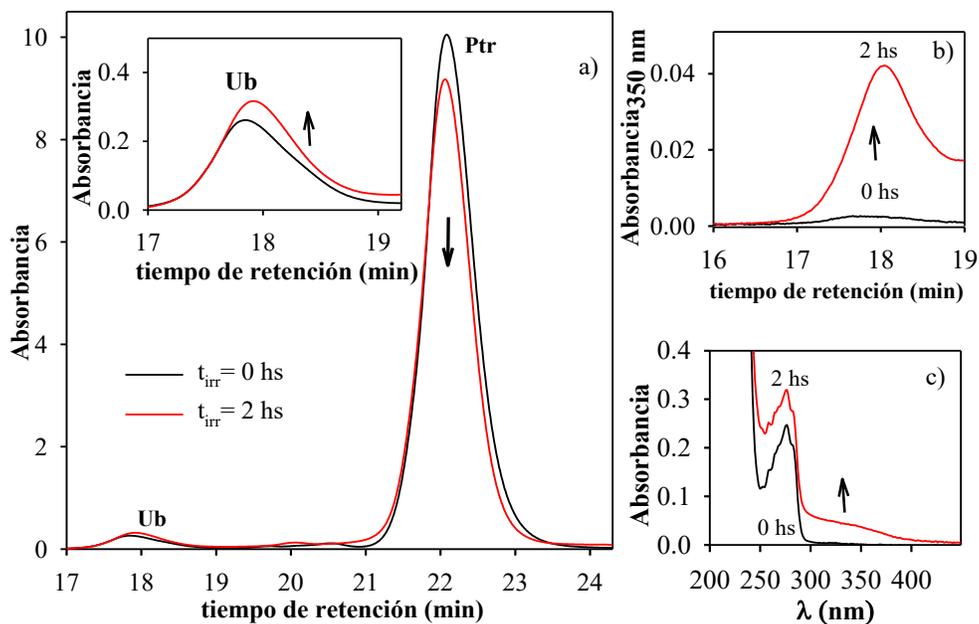
### 14.1. Irradiación de Ub en presencia de Ptr en condiciones anaeróbicas

Se comenzó investigando si Ptr era capaz de generar alteraciones químicas en Ub en ausencia de O<sub>2</sub>, como consecuencia de la exposición a radiación UV-A. Para ello, soluciones acuosas que contenían Ptr y Ub a distintas concentraciones y burbujeadas en Ar, fueron expuestas a irradiación (*Sistema de Irradiación II y IV, Sección 5.4.1*) por diferentes períodos de tiempo ( $\lambda_{irr} = 350$  nm). Los experimentos se llevaron a cabo a pH 6,0±0,1, para trabajar con la forma ácida de Ptr. Las soluciones irradiadas se analizaron por HPLC-PDA, HPLC-FL, SDS-PAGE y nano-LC MS.

#### 14.1.1. Análisis cromatográfico

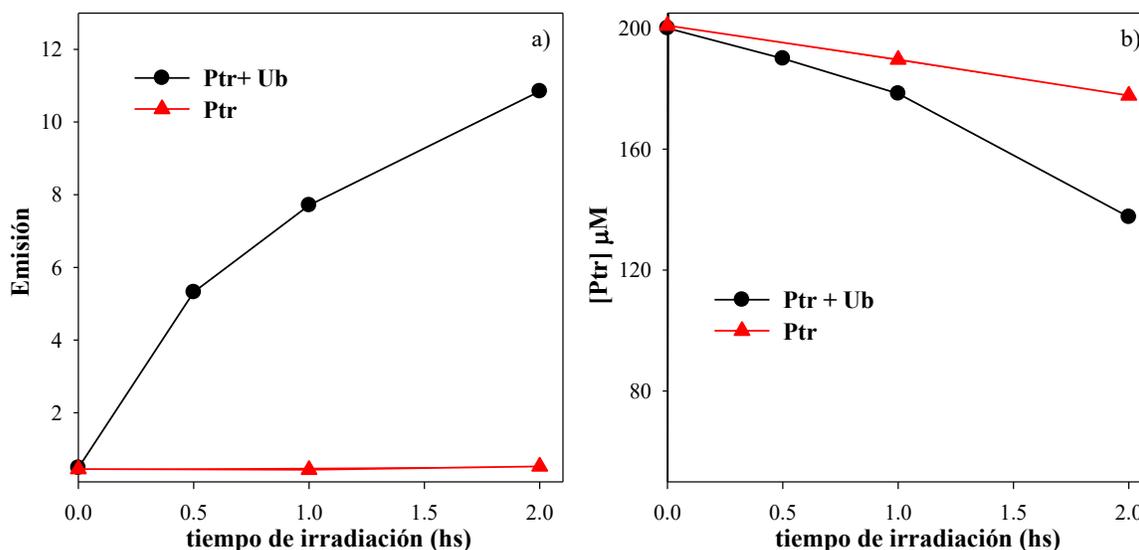
Se llevó a cabo el análisis cromatográfico de soluciones de Ub (45  $\mu$ M) y Ptr (200  $\mu$ M) irradiadas en condiciones anaeróbicas, utilizando el equipo HPLC-PDA. En el cromatograma registrado a 280 nm (Figura 14.1.a), se puede observar el descenso del área del pico

correspondiente a Ptr luego de 2 horas de irradiación, mientras que hay un leve aumento del área del pico correspondiente a Ub en la solución irradiada (Inset Figura 14.1.a). Por otro lado, se analizó el cromatograma a 350 nm (Figura 14.1.b), y se observó la aparición de un nuevo pico, con un tiempo de retención cercano al de Ub, cuyo espectro de absorción presenta una banda en la región de UV-A, además de la banda correspondiente a la Ub (Figura 14.1.c).



**Figura 14.1.** Cromatogramas registrados con el HPLC-PDA ( $\lambda_{ana} = 280$  nm) (a) y ( $\lambda_{ana} = 350$  nm) (b) para una solución mezcla de Ub y Ptr antes y luego de 2 hs de irradiación en anaerobiosis. c) Espectro de absorción del pico con  $t_{ret}$ : 17,8 min a 350 nm antes y después de 2 hs de irradiación. Condiciones de irradiación:  $[Ub]_0$ : 45  $\mu$ M;  $[Ptr]_0$ : 200  $\mu$ M; pH= 6,0;  $\lambda_{irr} = 350$  nm. Condiciones de corrida: 100%  $H_2O$  y NaCl 100 mM; pH 5,5; 0,6 mL/min;  $vol_{iny} = 350$   $\mu$ L; columna Biosep-SEC-2000.

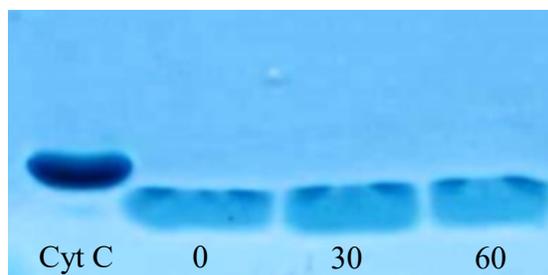
Además, se realizaron análisis por HPLC-FL, utilizando las propiedades características de excitación/emisión de Ptr ( $\lambda_{exc} = 350$  nm/  $\lambda_{em} = 440$  nm). En la Figura 14.2.a, se puede ver el aumento del área en función del tiempo de irradiación del pico de un producto fluorescente con el mismo tiempo de retención que Ub. A su vez, se cuantificó el consumo de Ptr en presencia y ausencia de Ub y, a diferencia de lo observado en condiciones aeróbicas (Sección 13.1.2), el consumo es más rápido en presencia que en ausencia de Ub. Al ser Ptr muy estable en ausencia de  $O_2$ , este resultado sugiere que parte de Ptr desaparece para formar parte del aducto Ub-Ptr (Figura 14.2.b).



**Figura 14.2.a.** Evolución del área del producto fluorescente en función del tiempo de irradiación ( $\lambda_{exc}= 350$  nm/ $\lambda_{em}= 440$  nm). **b)** Evolución de la concentración Ptr en presencia y ausencia de Ub luego de la irradiación durante distintos períodos de tiempo en ausencia de O<sub>2</sub>. Condiciones de irradiación: [Ub]<sub>0</sub>: 45 μM; [Ptr]<sub>0</sub>: 200 μM; pH= 6,0;  $\lambda_{irr}= 350$  nm. Condiciones de corrida: 100% H<sub>2</sub>O y NaCl 100 mM: pH 5,5; 0,6 mL/min; vol<sub>iny</sub>= 350 μL; columna Biosep-SEC-2000.

#### 14.1.2. Análisis electroforético

Se realizaron estudios electroforéticos (SDS-PAGE), en los que se observó que no hay consumo de la banda correspondiente a Ub ni alteración en su movilidad con los distintos tiempos de irradiación (Figura 14.3). A su vez, no se observa la formación de nuevas bandas que indiquen la generación de productos de mayor peso molecular, como se vio en las muestras de Ub irradiadas en presencia de O<sub>2</sub> (Figura 13.2, Capítulo 13).



**Figura 14.3.** Perfil electroforético de soluciones acuosas de Ub y Ptr irradiadas durante 0, 30 y 60 min en ausencia de O<sub>2</sub>. Cyt C se utilizó como control de peso molecular (12,5 kDa). Condiciones SDS-PAGE: gel

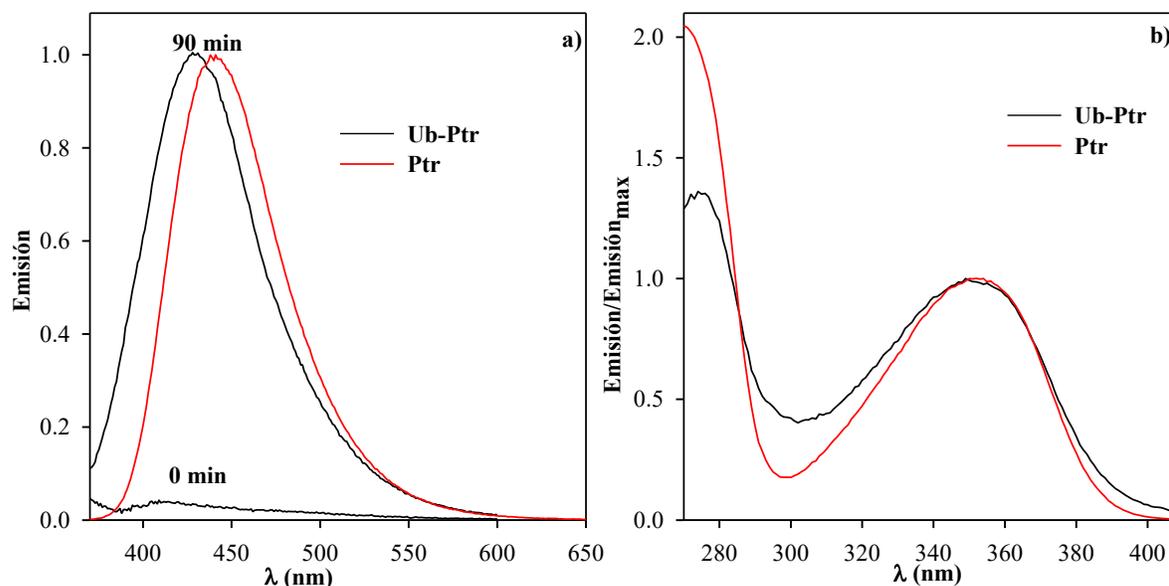
*resolving* 20%, *gel stacking* 4%, volumen de siembra: 20  $\mu$ l, tinción Azul de Coomasie Condiciones de irradiación: [Ub]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M, [Ptr]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; pH= 6,0;  $\lambda_{ir}$ = 350 nm.

## 14.2. Análisis del producto fluorescente obtenido en anaerobiosis

El aislamiento de la fracción proteica se llevó a cabo por HPLC-PDA y utilizando columnas de *sephadex* G-25 en condiciones desnaturalizantes, siguiendo el mismo procedimiento que con las muestras irradiadas en presencia de O<sub>2</sub> (*Sección 13.3.1*).

### 14.2.1. Análisis de fluorescencia

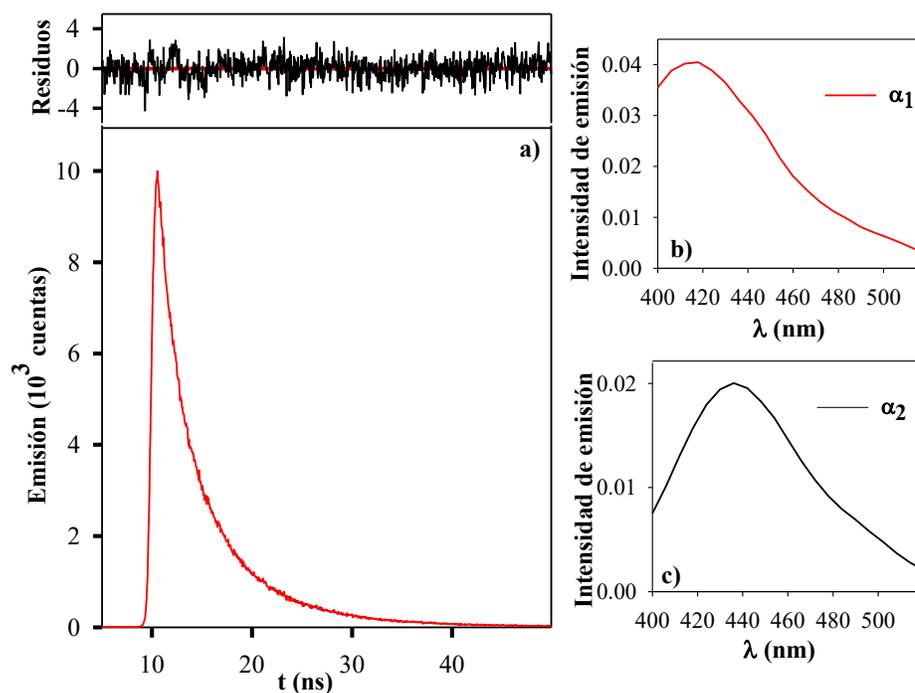
La solución mezcla de Ptr y Ub ([Ub]: 45  $\mu$ M, [Ptr]: 45  $\mu$ M, pH 6,0) se irradió en ausencia de O<sub>2</sub> durante 90 minutos (*Sistema de Irradiación II*) y luego, se registró el espectro de fluorescencia de la fracción proteica aislada desnaturalizada, excitando a 350 nm. Antes del análisis de la solución irradiada, se realizó el control de la emisión de la solución aislada a partir de la mezcla mantenida en oscuridad en ausencia de O<sub>2</sub>, para corroborar que la fracción obtenida tras la purificación con las columnas de *sephadex* no contiene Ptr libre. Efectivamente, como se ve en la Figura 14.4.a, tras registrar los espectros de emisión al excitar a 350 nm, la emisión de la solución sin irradiar es despreciable, descartando la presencia de Ptr. El espectro de la muestra irradiada presentó aumento de emisión con respecto a la muestra aislada sin irradiar, confirmando que, tanto en ausencia como en presencia de O<sub>2</sub>, se genera una proteína fluorescente (Figura 14.4.a). El espectro de emisión correspondiente a la fracción proteica aislada presenta un máximo centrado en 430 nm, el cual se aproxima al máximo en 440 nm de Ptr libre.<sup>10</sup> La comparación de este espectro con el espectro de emisión de Ptr libre sugiere que Ptr es responsable de la emisión del fotoproducto. A su vez, se registró el espectro de excitación de la fracción proteica purificada, registrando la emisión a 440 nm, donde se observó una banda centrada en 350 nm, compatible con la banda de menor energía de Ptr libre (Figura 14.4.b).



**Figura 14.4.a.** Espectros de emisión de Ptr y de la fracción proteica aislada por columnas de *sephadex* en condiciones desnaturalizantes, antes y después de 90 min de irradiación en ausencia de O<sub>2</sub> ( $\lambda_{exc}$  = 350 nm) y **b)** espectro de excitación normalizado de Ptr y de la fracción proteica aislada después de 90 min de irradiación en ausencia de O<sub>2</sub> ( $\lambda_{em}$  = 440 nm). Condiciones de irradiación: [Ub]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; [Ptr]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; [CIG]: 3M; pH= 6,0;  $\lambda_{irr}$  = 350 nm.

Por otro lado, se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia resuelta en el tiempo de soluciones acuosas de Ub y Ptr aisladas a partir del HPLC-PDA, utilizando como fuente de excitación un NanoLED de 341 nm. El decaimiento de emisión registrado a 450 nm de la solución irradiada por 90 minutos, presentó un comportamiento biexponencial, cuyo ajuste permitió obtener un tiempo de vida corto de  $\tau_{F1} = 3,5 \pm 0,5$  ns y uno largo de  $\tau_{F2} = 8,4 \pm 0,5$  ns (Figura 14.5), con sus correspondientes factores pre-exponenciales  $B_1 = 0,03$  y  $B_2 = 0,02$ . El tiempo largo coincide con el reportado para Ptr libre ( $7,6 \pm 0,54$  ns).<sup>10</sup> Para obtener el espectro de emisión y la contribución de cada componente se registró un espectro de emisión con resolución temporal (TRES) (Sección 6.2.3.1), excitando la muestra a 341 nm y registrando los decaimientos entre 400 y 530 nm. La variación de los factores pre-exponenciales ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ) de los ajustes de los decaimientos originó el espectro de emisión asociado a cada componente (Figura 14.5). El espectro correspondiente a la componente del tiempo largo presenta características similares al de Ptr, con uno máximo centrado en 440 nm. La contribución de cada componente se calculó multiplicando el área de cada espectro por el  $\tau_F$  correspondiente, obteniendo valores de 39 y 61 % para  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  respectivamente. Al

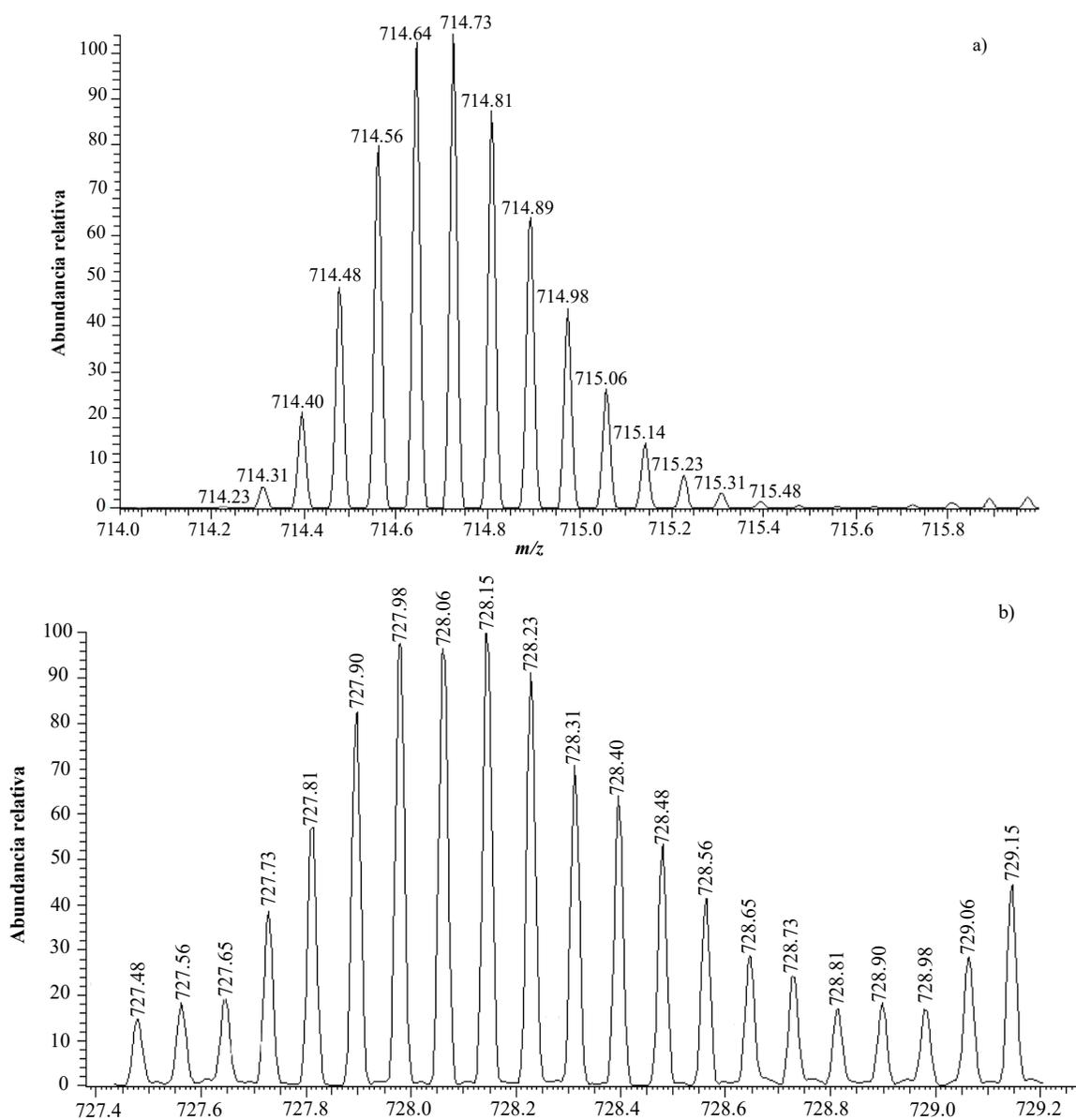
contribuir ambas componentes de igual manera en presencia y ausencia de  $O_2$  (Sección 13.3.2), no podemos adjudicar a Tyr<sub>2</sub> como el segundo componente que aporta a la emisión a 440 nm. La presencia de dos componentes podría deberse a que haya más de una estructura química del producto, debido a que el fotosensibilizador se puede unir a aminoácidos que se encuentran en entornos distintos o a distintos aminoácidos. Sin embargo, al coincidir tanto el espectro de emisión como el tiempo de vida largo con lo reportado para la Ptr libre,<sup>7</sup> se puede inferir que la emisión observada se corresponde a Ptr unida covalentemente a Ub.



**Figura 14.5.a.** Decaimiento de emisión registrado a 450 nm ( $\lambda_{exc}=341$  nm) de soluciones acuosas de Ub y Ptr aisladas por HPLC-PDA, luego de 90 min de irradiación en ausencia de  $O_2$ . Espectros de emisión resueltos en el tiempo, siendo  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  las componentes del tiempo corto (b) y largo (c), respectivamente. Condiciones de irradiación: [Ub]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; [Ptr]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; [ClG]: 3 M, pH=6,0;  $\lambda_{irr}=350$  nm.

#### 14.2.2. Análisis por espectrometría de masas

Se realizó un análisis de las muestras de Ub y Ptr por nano LC-MS (Sección 7.3.1). Primero, se registró el espectro de masas (en modo positivo) de una solución de Ub (45  $\mu$ M) y Ptr (200  $\mu$ M) antes de la irradiación, en ausencia de  $O_2$ . En la Figura 14.6.a, se puede observar la distribución de masas correspondientes al ion molecular de Ub, como  $[M+12H]^{12+}$ , comprendidas en el rango de  $m/z$  entre 714,0 y 715,8 ( $z=12$ ).



**Figura 14.6.** Distribución de masas según la abundancia isotópica relativa de una solución de Ub y Ptr en ausencia de O<sub>2</sub> antes y después de 2 hs de irradiación, comprendidas en el rango  $m/z$  entre 714,0 y 715,8 (a) y 727,4 y 729,2 (b), respectivamente. Condiciones de irradiación: [Ub]<sub>0</sub>: 45  $\mu$ M; [Ptr]<sub>0</sub>: 200  $\mu$ M; pH= 6,0;  $\lambda_{\text{irr}}$ = 350 nm.

A continuación, a partir de la fórmula química de Ub (C<sub>378</sub>H<sub>630</sub>N<sub>105</sub>O<sub>118</sub>S) y del supuesto aducto Ub-Ptr-2H (C<sub>384</sub>H<sub>633</sub>N<sub>110</sub>O<sub>119</sub>S), se obtuvo por simulación la distribución de masas según la abundancia de isótopos relativa, utilizando el programa *Chem.Draw* (Tabla 14.1). Se identificó al ion monoisotópico de Ub como  $m/z=714,40$  ( $z=12$ ), es decir, al ion de menor

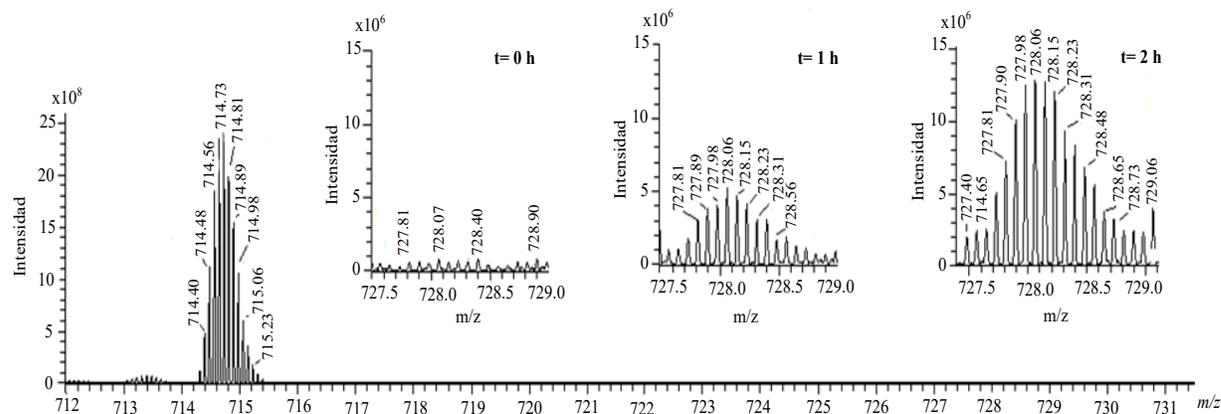
peso molecular, cuya masa coincide con la masa exacta de Ub (8560,6245 Da) y por comparación, al de Ub+Ptr-2H, como  $m/z = 727,81$  ( $z = 12$ ). Luego, se registró el espectro de masas de la solución de Ub y Ptr irradiada por 2 horas en ausencia de O<sub>2</sub> (*Sistema de Irradiación II*). Al analizar la distribución de señales obtenidas (Figura 14.6.b), en el rango de  $m/z$  entre 727,4 y 729,2 ( $z=12$ ), se puede ver la distribución de masas compatible con Ub+Ptr-2H. En ambos casos (Figura 14.6), la distribución de señales coincide con los valores de masas obtenidos según la distribución isotópica en la simulación.

<b>Abundancia (%)</b>	<b>Masa Ub</b>	<b><math>m/z</math> (<math>z=12</math>)</b>	<b>Abundancia (%)</b>	<b>Masa Ub+Ptr-2H</b>	<b><math>m/z</math> (<math>z=12</math>)</b>
100	8563,6346	714,64	100	8725,6717	728,15
96,9	8564,6380	714,73	98	8724,6684	728,06
63,5	8565,6413	714,81	68,5	8726,6751	728,23
54,9	8562,6312	714,56	53,8	8723,6650	727,98
26,6	8561,6279	714,48	26,1	8722,6617	727,90
11,1	8560,6245	714,40	10,9	8721,6583	727,81
4,5	8565,6304	714,81	7,4	8727,6784	728,31
4,4	8566,6338	714,89	4,5	8727,6675	728,31
3,3	8566,6447	714,89	4,4	8726,6642	728,23
2,9	8567,6371	714,98	3,1	8728,6709	728,40
2,5	8564,6270	714,73	2,4	8725,6608	728,15

**Tabla 14.1.** Distribución de masas según la abundancia relativa isotópica para Ub y el aducto Ub+Ptr-2H.

En la Figura 14.7, se muestra el espectro de masas obtenido para la muestra sin irradiar, en un rango de  $m/z$  más amplio (712,0 y 731,0,  $z=12$ ), donde se observa la señal correspondiente al ion de la proteína intacta con un  $m/z = 714,3957$  ( $z=12$ ). Al analizar las soluciones irradiadas durante 1 y 2 horas, en el rango de  $m/z$  comprendido entre 727,5 y 729,0 ( $z=12$ ), se puede ver un producto con un  $m/z = 727,8113$ , cuya intensidad crece en función del tiempo de irradiación (Insets Figura 14.7). Al calcular la diferencia entre las dos señales monoisotópicas ( $\Delta m/z$ ), se obtiene un valor de masa de 160,9872 Da ( $z=1$ ), la cual se

corresponde con la fórmula  $[M+Ptr+10H]^{12+}$ . Este resultado confirma la formación del aducto Ub-Ptr-2H y la pérdida de dos átomos de hidrógeno en la reacción.



**Figura 14.7.** Espectro de masa en ESI<sup>+</sup> de una solución acuosa de Ub y Ptr en ausencia de O<sub>2</sub> sin irradiar. Insets: rango de  $m/z$  de 727,0 a 729,0 antes y luego de 1 y 2 hs de irradiación, respectivamente. Condiciones de irradiación:  $[Ub]_0$ : 45  $\mu$ M;  $[Ptr]_0$ : 200  $\mu$ M; pH= 6,0;  $\lambda_{irr}$ = 350 nm.

Por lo tanto, estos resultados permiten concluir que bajo condiciones anaeróbicas, el proceso fotoquímico genera la unión covalente de Ptr a Ub, lo cual lleva a la formación de una proteína fluorescente. Teniendo en cuenta que, tanto cromatográficamente como en las corridas electroforéticas, la movilidad de Ub no se ve alterada luego de la irradiación en presencia de Ptr, se puede asumir que la proteína no sufre ningún otro cambio químico, además de la incorporación del fotosensibilizador.

## **Bibliografía**

- <sup>1</sup> M.P. Serrano, *et.al*, *Free Radical Bio Med.*, **96**, 418 -431, 2016.
- <sup>2</sup> S. Estébanez, *et.al*, *ChemPhysChem.*, **19**, 300-306, 2018.
- <sup>3</sup> S. Estébanez, *et al*, *Dyes Pigments*, **160**, 624-632, 2019.
- <sup>4</sup> C. Castaño, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **89**, 1448-1455, 2013.
- <sup>5</sup> E. Silva, J. Godoy, *Internat J. Vit. Nutr Res.*, **64**, 253-256, 1994
- <sup>6</sup> T. K. Dalsgaard, *et.al*, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 7939-7947, 2011.
- <sup>7</sup> D.I. Pattison, *et.al*, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11**, 38-53, 2012.
- <sup>8</sup> A. Michaeli, J. Feitels, *Photochem. Photobiol.*, **59** (3), 284-289, 1994.

<sup>9</sup> F. Rizzuto, J.D. Spike, *Photochem. Photobiol.*, **25**, 465-476, 1977.

<sup>10</sup> C. Lorente, A.H. Thomas, *Acc. Chem. Res.*, **39**, 395-402, 2006.

# CAPÍTULO 15

## OLIGOMERIZACIÓN DE ALBÚMINA FOTOINDUCIDA POR PTR

La exposición de proteínas a luz visible y/o a radiación UV-A en presencia de un fotosensibilizador, lleva a la oxidación de ciertos aminoácidos, como metionina (Met), Trp, Tyr, cisteína (Cys) e histidina (His).<sup>1</sup> Una de las consecuencias más comunes de este daño es la formación de dímeros de proteínas y productos de mayor peso molecular, generando agregados.<sup>2,3,4,5,6</sup> La oligomerización puede ocurrir por diversas reacciones, una de las cuales involucra especies radicalarias, como es el caso de la formación de Tyr<sub>2</sub> a partir de la reacción entre dos Tyr(-H)<sup>•</sup> (*Sección 9.1*).<sup>7</sup> También hay evidencias que muestran que los residuos de His modificados llevan a la oligomerización de proteínas.<sup>1,8,9,10,11,12</sup>

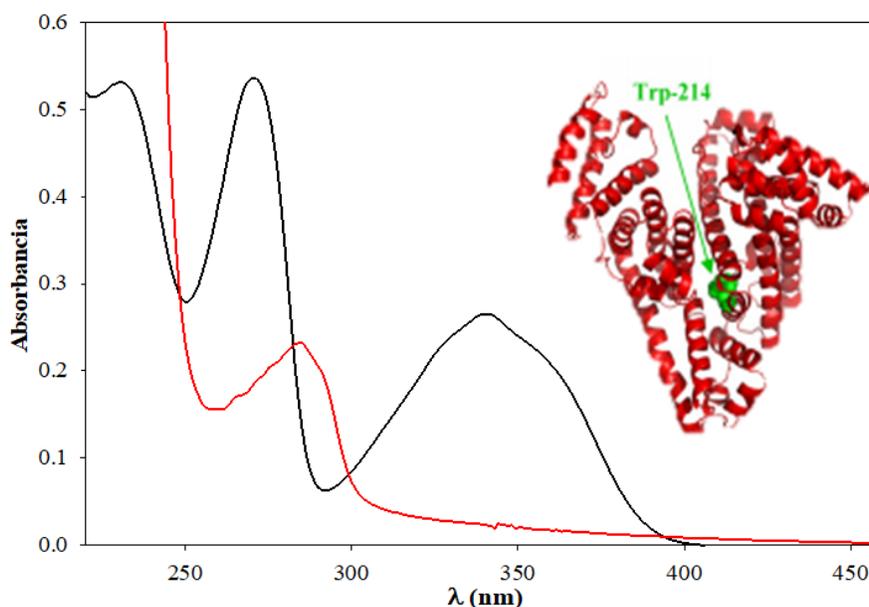
La albúmina de suero humano (HSA) es una proteína globular (66,5 kDa) compuesta por tres dominios estructurales similares (I, II y III), cada uno de los cuales posee dos subdominios (A y B), que se encuentran estabilizados por 17 puentes disulfuro.<sup>13</sup> HSA es la proteína más abundante del plasma sanguíneo y consiste en un único polipéptido de 585 aminoácidos, que posee un único residuo de Trp (Trp-214) localizado en el subdominio IIA y 18 residuos Tyr. El Trp de HSA se encuentra en el interior de la estructura tridimensional de la proteína, en una región hidrofóbica. HSA libre posee un alto contenido de  $\alpha$ -hélices (60%), 14% de láminas  $\beta$ , 8% de estructuras con giro, 8% estructuras  $\beta$ -antiparalelas y 10% de estructuras al azar.<sup>14</sup> La conformación nativa de la proteína presenta dos sitios principales de unión para moléculas aromáticas y heterocíclicas, localizados en los subdominios IIA y IIIA<sup>13</sup> y se caracteriza por su habilidad para unir y transportar una gran variedad de ligandos endógenos y exógenos.<sup>15</sup> Por otra parte, se ha encontrado que en la piel humana existe una síntesis y regulación autócrina de esta proteína y, que en las zonas depigmentadas de la piel de los pacientes con vitiligo la albúmina sufre oxidación.<sup>16</sup>

Teniendo en cuenta la relevancia biológica de HSA, los antecedentes de literatura y los resultados presentados en los capítulos anteriores, el objetivo principal de este capítulo fue estudiar la capacidad de Ptr de generar daño fotoinducido en HSA y evaluar la oligomerización

mediada por Tyr<sub>2</sub>. En particular, se estudiaron las alteraciones químicas y funcionales generadas en la proteína como consecuencia del proceso fotosensibilizado.

### 15.1. Evaluación de la capacidad de Ptr para oligomerizar a HSA

El primer objetivo de este estudio fue averiguar si Ptr era capaz de fotoinducir la dimerización de HSA en solución acuosa bajo irradiación UV-A. Para ello, soluciones acuosas que contenían Ptr y HSA fueron expuestas a irradiación (*Sistema de Irradiación II, Sección 5.4.1*) por diferentes períodos de tiempo. Los experimentos se llevaron a cabo a pH 6,0 ±0,1, para trabajar con la forma ácida de Ptr (Capítulo 3). Bajo estas condiciones experimentales sólo Ptr es excitada, ya que la proteína no absorbe a la longitud de onda de excitación (Figura 15.1). Se trabajó a concentraciones de Ptr del orden al encontrado en la piel de pacientes con vitiligo<sup>17</sup> y se utilizó KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM en las soluciones mezclas para asegurarnos de mantener el pH fijo.

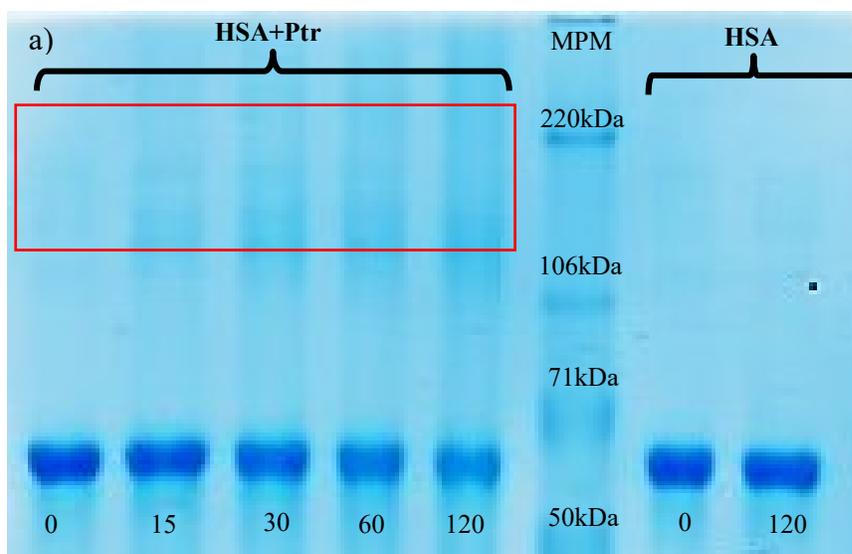


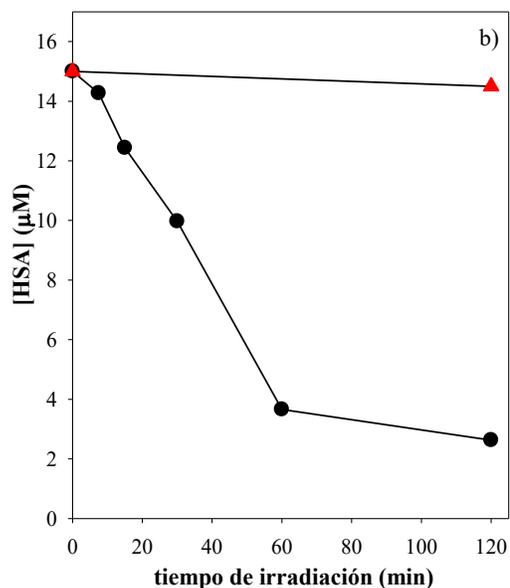
**Figura 15.1.** Espectro de absorción de soluciones acuosas aireadas de HSA (6,0 μM, línea roja) y de la forma ácida de Ptr (50 μM, línea negra). pH= 6,0. Estructura tridimensional de la HSA.

#### 15.1.1. Análisis electroforético

Con el fin de dilucidar si existe modificación estructural en HSA como resultado del daño fotoinducido por Ptr, se realizó el análisis electroforético (SDS-PAGE, *Sección 8.1*) de las soluciones irradiadas. Como se puede observar en la Figura 15.2.a, hay un descenso de la intensidad de la banda correspondiente a HSA en función del tiempo de irradiación. A su vez, si

bien no se observa la formación de nuevas bandas, aparece un bandeo inespecífico en la zona entre 106-220 kDa, indicando la formación de productos de peso molecular del doble o más que el correspondiente a HSA. La intensidad de los productos de mayor peso molecular aumenta a medida que disminuye la intensidad de la banda de HSA. Para descartar que no existan alteraciones estructurales en HSA como resultado de la exposición a la radiación en ausencia del fotosensibilizador, se analizó por SDS-PAGE una solución acuosa de HSA (15  $\mu$ M, pH 6,0) en ausencia de Ptr, irradiada durante 2 horas. En la Figura 15.2.a se muestra el perfil electroforético obtenido, en el cual se puede observar que no existe descenso significativo en la intensidad de la banda de HSA cuando es irradiada en ausencia de Ptr, confirmando que las alteraciones en su estructura son consecuencia del proceso fotosensibilizado. En la Figura 15.2.b, se grafica el perfil de concentración de HSA, estimada por la integración de cada banda por fotodensitometría (*Sección 8.1.2*), de las soluciones en presencia y ausencia de Ptr.

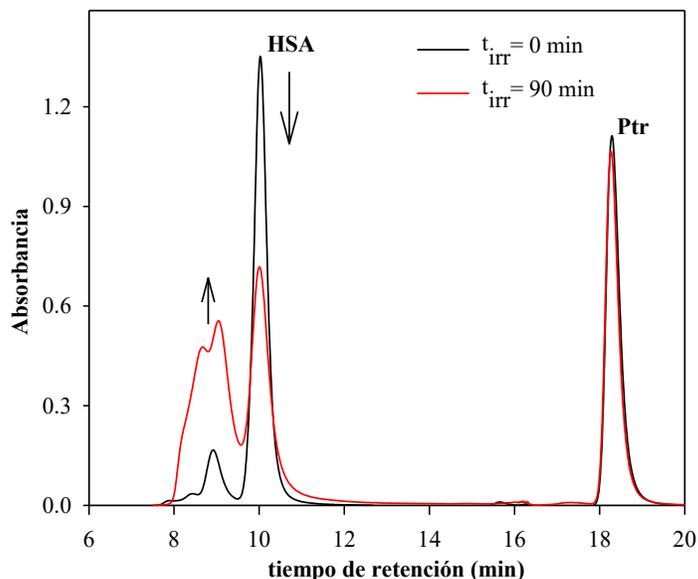




**Figura 15.2.a.** Perfil electroforético de soluciones acuosas de HSA irradiadas a distintos tiempos en presencia y ausencia de Ptr. MPM: marcador peso molecular. El tiempo de irradiación figura al pie de cada calle. **b)** Variación de la concentración de HSA, estimada por SDS-PAGE, en presencia (●) y ausencia (▲) de Ptr en función del tiempo de irradiación. Condiciones SDS-PAGE: gel *resolving* 10%, gel *stacking* 4%, volumen de siembra: 10 µl, tinción Azul de Coomassie. Condiciones de irradiación:  $[HSA]_0$ : 15 µM;  $[Ptr]_0$ : 45 µM;  $\lambda_{irr}$ = 350 nm.

### 15.1.2. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico utilizando una columna de exclusión molecular (Biosep-SEC-2000, Sección 7.1) se realizó con el equipo HPLC-PDA, utilizando Tris 25 mM pH 7,0 como fase móvil. En los cromatogramas a 280 nm, se puede observar que al aumentar el tiempo de irradiación, el pico correspondiente al monómero de HSA ( $t_{ret}$  = 10,03 min) disminuye y aparecen nuevos picos con tiempos de retención menor, lo que indica que se forman productos de mayor peso molecular (Figura 15.3). A su vez, el área del pico correspondiente a Ptr se mantiene constante, indicando que el sensibilizador no se consume en este proceso. Cabe aclarar que en el cromatograma correspondiente a la solución sin irradiar, se observa un pico de baja intensidad a un tiempo de retención más corto que el monómero, el cual se debe a una dimerización inespecífica, no covalente. Este resultado, junto con los resultados obtenidos por SDS-PAGE (Figura 15.2.a), permiten confirmar que, como consecuencia del proceso fotosensibilizado por Ptr, se forman productos de mayor peso molecular de HSA.



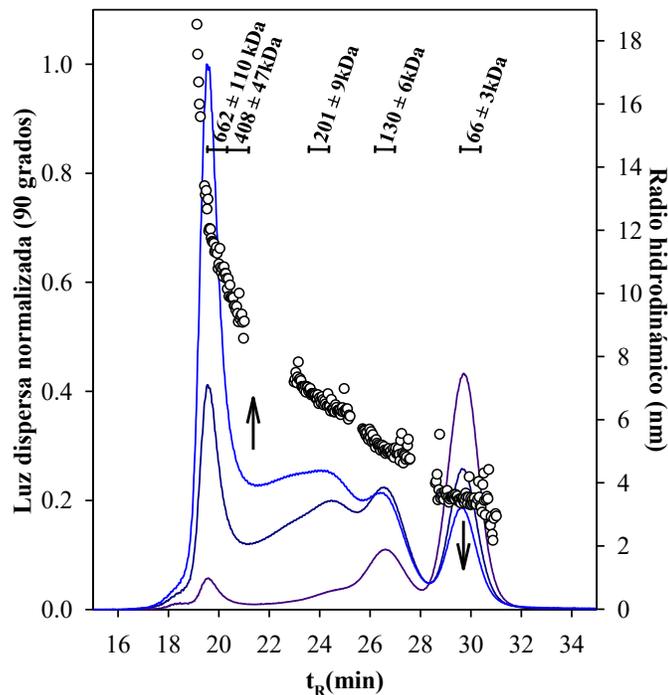
**Figura 15.3.** Cromatogramas registrados con HPLC-PDA ( $\lambda_{ana} = 280$  nm) para una solución acuosa de HSA y Ptr equilibradas en aire antes (línea negra) y después de 90 min de irradiación (línea roja). Condiciones de irradiación:  $[HSA]_0$ : 15  $\mu$ M;  $[Ptr]_0$ : 45  $\mu$ M; pH= 6,0;  $\lambda_{irr}$ = 350 nm. Condiciones cromatográficas: 100% Tris 25 mM; pH 7,0; 0,6 mL/min;  $vol_{iny}$ = 100  $\mu$ L; columna Biosep-SEC-2000.

Con el fin de profundizar el estudio de la oligomerización de HSA fotoinducida por Ptr, se analizaron las muestras por cromatografía líquida acoplada a un detector de dispersión de luz (FPLC-LS, *Sección 7.2*), utilizando una columna de exclusión molecular Superdex-200 (GE Healthcare). Para ello, se prepararon soluciones acuosas aireadas de HSA (100  $\mu$ M) y Ptr (90  $\mu$ M) a pH 6,0 y se irradiaron con el *Sistema de irradiación II* durante 2 horas. Se trabajó a concentraciones altas de proteína debido al tamaño de la columna utilizada y a la sensibilidad de la técnica. Como se puede ver en la Figura 15.4, el pico correspondiente a HSA ( $t_{ret} = 29,9$  min) disminuye en función del tiempo de irradiación, tal cual se observó en los experimentos utilizando el equipo HPLC-PDA, mientras que nuevos productos se forman con tiempos de retención menor, indicando nuevamente que el peso molecular de los fotoproductos es mayor que el de HSA.

Se llevó a cabo la determinación del peso molecular de los distintos productos a partir de los perfiles de dispersión obtenidos en los distintos tiempos de irradiación, utilizando el *software* ASTRA. Antes de la irradiación, el pico principal detectado corresponde a la especie de 66 ( $\pm 3$ ) kDa, el cual coincide con el peso molecular de la HSA (66,5 kDa) (Figura 15.4). En el cromatograma de la solución sin irradiar, se observa un pico con un tiempo de

retención menor que el correspondiente a HSA, el cual se puede adjudicar a un dímero inespecífico, que aumenta con la concentración de la proteína. Al analizar el cromatograma de la solución irradiada durante 1 hora, se observa un pico con un peso molecular de 130 ( $\pm 6$ ) kDa, compatible con la formación de un dímero. Sin embargo, al comparar con el cromatograma de la solución irradiada por 2 horas, el pico correspondiente al producto dimérico desciende ligeramente y se observa la formación de productos con tiempos de retención menores, cuya concentración aumenta con el tiempo de irradiación (Figura 15.4). Este resultado era de esperarse, considerando los resultados obtenidos previamente con HPLC-PDA y por SDS-PAGE. A altos pesos moleculares, la columna pierde resolución, por lo que el pico más intenso se corresponde a distintos productos con más de 5 unidades de HSA. Se lograron registrar productos oligoméricos formados por hasta 10 moléculas de HSA unidas. Para obtener más información de los fotoproductos de mayor peso molecular, se calcularon los radios hidrodinámicos de los productos (Figura 15.4).

A partir de este análisis, se puede concluir que el daño fotosensibilizado por Ptr lleva al entrecruzamiento de la HSA y que este proceso no es solo una dimerización, como se observó para Ub (Capítulo 13), la cual posee un único residuo Tyr, sino que es una oligomerización fotoinducida.



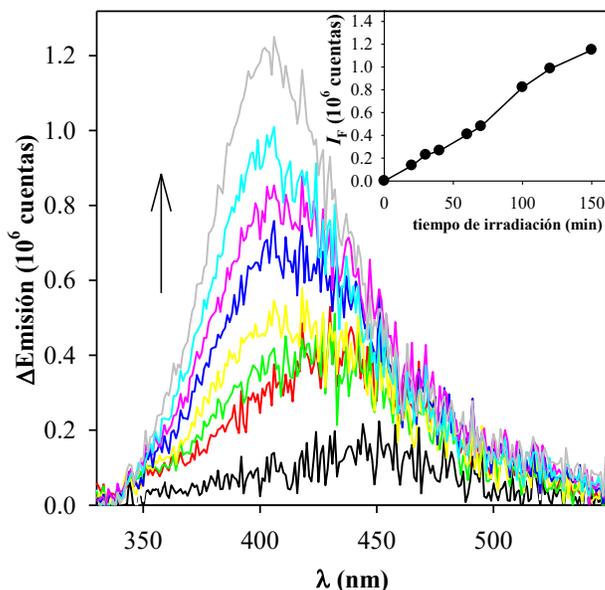
**Figura 15.4.** Cromatogramas registrados con FPLC-LS de una solución acuosa aireada de HSA irradiada en presencia Ptr durante diferentes tiempos de irradiación (0, 1 y 2 hs). Los círculos representan el radio hidrodinámico de las moléculas presentes en la solución luego de irradiar por 2 hs. El peso molecular correspondiente a los diferentes tiempos de retención se indican en la parte superior de la figura. Condiciones de irradiación:  $[HSA]_0$ : 100  $\mu$ M;  $[Ptr]_0$ : 90  $\mu$ M; pH = 6,0;  $\lambda_{irr}$  = 350 nm. Condiciones cromatográficas: 100% Tris 20 mM, NaCl 100 mM; pH 7,0; columna Superdex-200.

## 15.2. Formación de Tyr<sub>2</sub>

Teniendo en cuenta los resultados presentados en esta tesis sobre la dimerización de Tyr libre<sup>18</sup> y Ub (Capítulos 9 y 13), y los antecedentes en literatura sobre la dimerización de  $\alpha$ -MSH fotosensibilizada por Ptr,<sup>19</sup> resulta lógico suponer que la oligomerización de HSA mostrada en la sección anterior, es mediada por la formación de Tyr<sub>2</sub>. En consecuencia, el objetivo de esta sección es justamente investigar la formación de Tyr<sub>2</sub> en soluciones de HSA irradiadas en presencia de Ptr.

### 15.2.1. Análisis por fluorescencia

Aprovechando la emisión característica de Tyr<sub>2</sub> (Capítulo 10), se llevaron a cabo estudios de emisión en estado estacionario (Equipo I, Sección 6.2.2) de soluciones acuosa aireadas de HSA (15  $\mu$ M) y Ptr (5  $\mu$ M) expuestas a irradiación (*Sistema de Irradiación I*). Los espectros de emisión se realizaron excitando a 310 nm y se midió la emisión en un rango entre 330-550 nm, para tiempos de irradiación comprendidos entre 0 y 150 minutos. Se trabajó a una concentración de Ptr distinta a las utilizadas en los experimentos de HPLC-PDA y FPLC-DLS debido a que Ptr absorbe a la longitud de onda de excitación y emite en la zona donde emite Tyr<sub>2</sub>. Por lo tanto, fue necesario trabajar a una concentración de Ptr lo suficientemente baja para morigerar su interferencia. Teniendo en cuenta que Ptr no se consume durante la irradiación, se sustrajo al espectro obtenido para cada tiempo, el espectro de emisión de la solución antes de irradiar. En la Figura 15.5, se muestran los espectros diferencia en los cuales se observa una banda centrada en 405 nm cuya intensidad aumenta con el tiempo de irradiación y la cual se corresponde con la emisión característica de Tyr<sub>2</sub>, sugiriendo su formación.

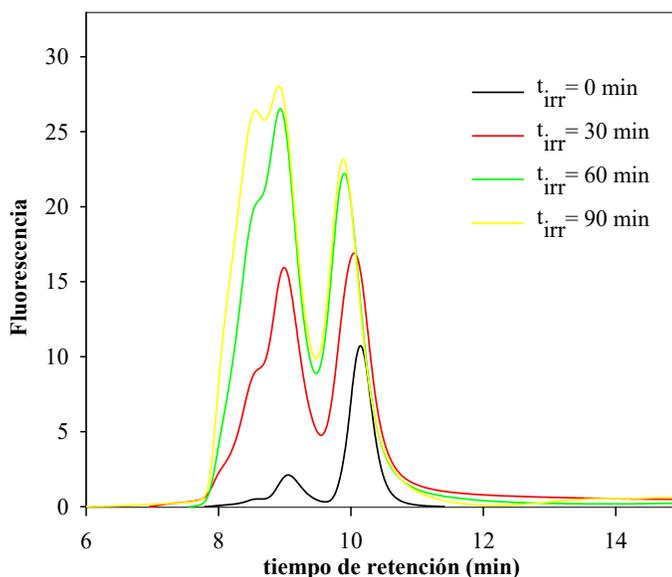


**Figura 15.5.** Espectros diferencia de emisión ( $\lambda_{\text{exc}} = 310$  nm) de soluciones acuosas aireadas de HSA y Ptr irradiadas hasta 150 min. A cada tiempo se le sustrajo el espectro del  $t_{\text{irr}} = 0$  min. Inset: incremento de la intensidad de fluorescencia a 405 nm en función del tiempo de irradiación. Condiciones de irradiación:  $[\text{HSA}]_0$ : 15  $\mu\text{M}$ ;  $[\text{Ptr}]_0$ : 5  $\mu\text{M}$ ; pH = 6,0;  $\lambda_{\text{irr}} = 350$  nm.

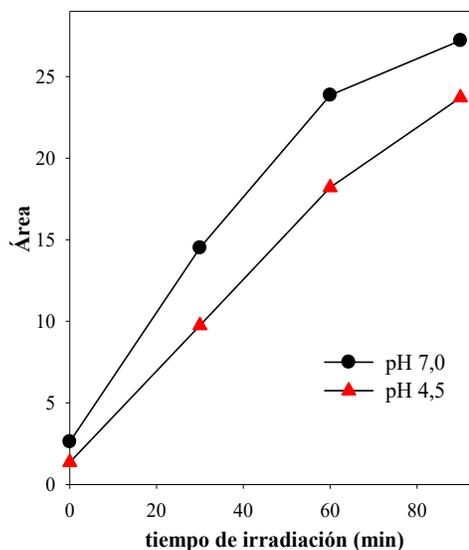
Por otro lado, se realizó un estudio cromatográfico con el equipo HPLC-FL utilizando buffer Tris 25 mM pH 7,0 como fase móvil. Al analizar el cromatograma utilizando las propiedades de emisión de Tyr<sub>2</sub> ( $\lambda_{\text{exc}} = 310$  nm/ $\lambda_{\text{em}} = 405$  nm) (Figura 15.6), se pudo observar un aumento de la emisión, tanto en la zona de los productos de mayor peso molecular como en la zona del monómero de HSA en función del tiempo de irradiación, indicando que Tyr<sub>2</sub> se forma durante el proceso fotosensibilizado. A su vez, se puede ver un corrimiento del pico correspondiente al monómero a tiempos de retención menores.

Teniendo en cuenta que la forma alcalina de Tyr<sub>2</sub> presenta una banda de absorción centrada en 315 nm que no está presente en la forma ácida (Capítulo 10), se repitió el análisis cromatográfico con el equipo HPLC-FL de la misma solución mezcla de HSA y Ptr pero utilizando como buffer de corrida  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,1 M a pH 4,5). Se realizó la integración de los picos correspondientes a la fracción proteica completa, es decir, el monómero y los productos de mayor peso molecular, en las condiciones de excitación/emisión de Tyr<sub>2</sub> ( $\lambda_{\text{exc}} = 310$  nm/ $\lambda_{\text{em}} = 405$  nm) en ambas corridas y se graficó el área en función del tiempo de irradiación. Como se puede ver en la Figura 15.7, la emisión a 405 nm es mayor a pH 7,0, sin

embargo, no se logró apagar la emisión a pH 4,5. Si bien a pH 7,0 nos acercamos al valor del  $pK_a$ , tenemos mayor contribución de la forma ácida, por lo que hay otra especie que está emitiendo. Cabe aclarar que los residuos Tyr en la proteína no son los únicos aminoácidos capaces de sufrir oxidación, generando productos fluorescentes en el proceso fotosensibilizado por Ptr. Un ejemplo es el Trp, que se oxida para dar N-formilquinurenina (NFK), la cual absorbe en el UV-A y emite en la zona donde emite Tyr<sub>2</sub>. Sin embargo, teniendo en cuenta el equilibrio ácido-base de Tyr<sub>2</sub> y que su emisión es dependiente del pH, se puede utilizar esta propiedad para identificarlos. Una limitación del HPLC fue el pH de trabajo, ya que la columna se daña si uno supera un pH de 7,0, por lo que no se pudo trabajar con una única forma ácido-base.

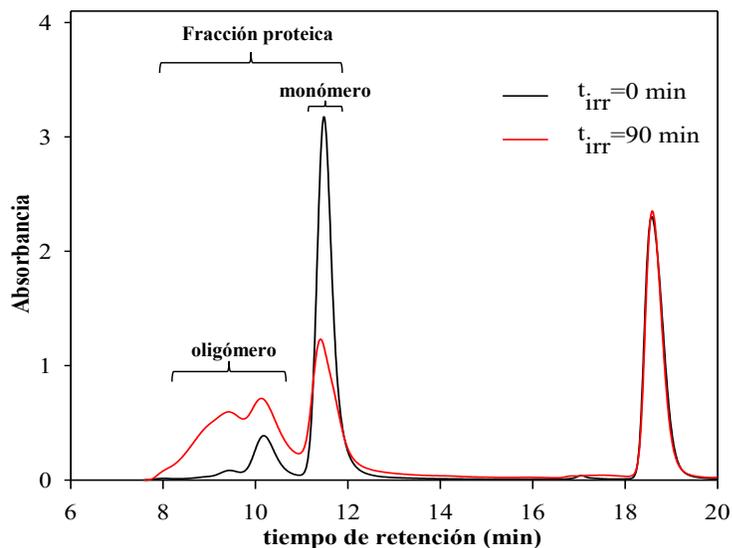


**Figura 15.6.** Cromatogramas registrados con HPLC-FL ( $\lambda_{exc} = 310$  nm,  $\lambda_{em} = 405$  nm) para una solución mezcla de HSA y Ptr equilibradas en aire irradiada durante distintos tiempos. Condiciones de irradiación:  $[HSA]_0$ : 15  $\mu$ M;  $[Ptr]_0$ : 45  $\mu$ M; pH = 6,0;  $\lambda_{irr}$  = 350 nm. Condiciones cromatográficas: 100% Tris 25 mM; pH 7,0; 0,6 mL/min;  $vol_{inj}$  = 100  $\mu$ L; columna Biosep-SEC-2000.



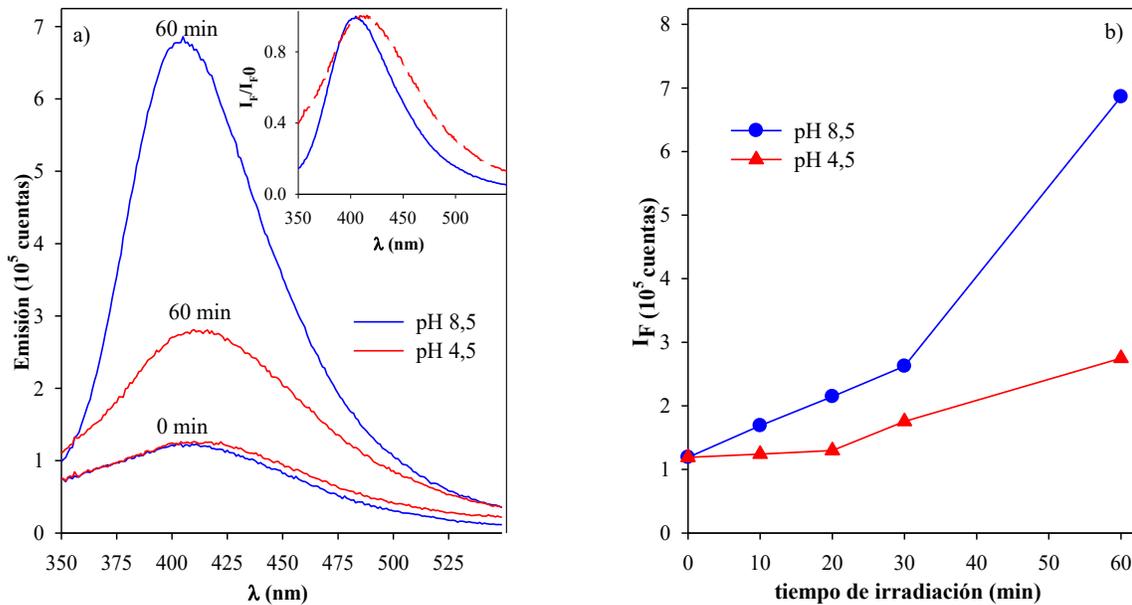
**Figura 15.7.** Evolución del área de la fracción proteica en función del tiempo de irradiación utilizando el pH de la corrida cromatográfica a pH 7,0 y pH 4,5 ( $\lambda_{exc} = 310 \text{ nm}/\lambda_{em} = 405 \text{ nm}$ ). Condiciones de irradiación:  $[\text{HSA}]_0$ : 15  $\mu\text{M}$ ;  $[\text{Ptr}]_0$ : 45  $\mu\text{M}$ ; pH = 6,0;  $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$ .

Para estudiar la fluorescencia de la proteína tratada sin la intervención de la emisión de Ptr, se aislaron las distintas fracciones proteicas, para lo cual se buscaron nuevas condiciones de corrida de HPLC. Al utilizar una solución acuosa de NaCl 50 mM (pH 7,0) como fase móvil, se logró mejorar la resolución de los productos y se llevó a cabo el aislamiento de las distintas fracciones proteicas, es decir, el monómero (fracción monomérica), los productos de mayor peso molecular (fracción oligomérica) y la proteína total (fracción proteica), como se detalla en la Figura 15.8.



**Figura 15.8.** Cromatogramas registrados con HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}} = 280 \text{ nm}$ ). Condiciones de irradiación:  $[\text{HSA}]_0$ :  $15 \mu\text{M}$ ;  $[\text{Ptr}]_0$ :  $45 \mu\text{M}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$ . Condiciones cromatográficas: 100% solución acuosa de  $\text{NaCl } 50 \text{ mM}$ ;  $\text{pH } 7,0$ ;  $0,7 \text{ mL/min}$ ;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$ ; columna Biosep-SEC-2000.

Se llevó a cabo el análisis por fluorescencia de las fracciones oligoméricas aisladas excitando a  $310 \text{ nm}$ , luego de llevarlas a  $\text{pH } 4,5$  y  $8,5$ . Como se puede ver en la Figura 15.9, a  $\text{pH}$  alcalino se observa una banda de emisión centrada a  $405 \text{ nm}$ , que crece en función del tiempo de irradiación, compatible con lo observado en la Figura 15.7. A partir de este resultado se puede confirmar que  $\text{Tyr}_2$  es responsable de la formación de oligómeros de HSA. Por otra parte, al disminuir el  $\text{pH}$ , se puede ver un descenso en la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, las soluciones a  $\text{pH}$  ácido presentan una emisión residual que no es despreciable. Al comparar el máximo de las muestras a  $\text{pH}$  ácido con respecto a las de  $\text{pH}$  alcalino, se observa un corrimiento hacia el rojo (Inset Figura 15.9.a), indicando que en la fracción oligomérica estamos en presencia de otros fotoproductos que contribuyen a la emisión.

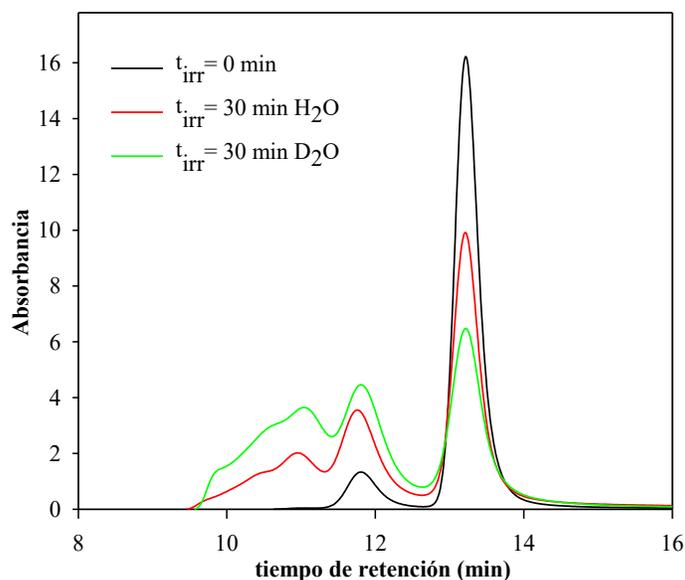


**Figura 15.9.a.** Espectros de emisión ( $\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$ ) de las fracciones oligoméricas aisladas, provenientes de soluciones de HSA y Ptr, antes y después de 60 min de irradiación, que fueron llevadas a  $\text{pH } 4,5$  y  $8,5$ . Inset: espectros normalizados de las muestras irradiadas por 60 min a  $\text{pH } 4,5$  (línea discontinua) y  $8,5$  (línea sólida). **b)** Incremento de la intensidad de fluorescencia a  $405 \text{ nm}$  en función del tiempo de irradiación.

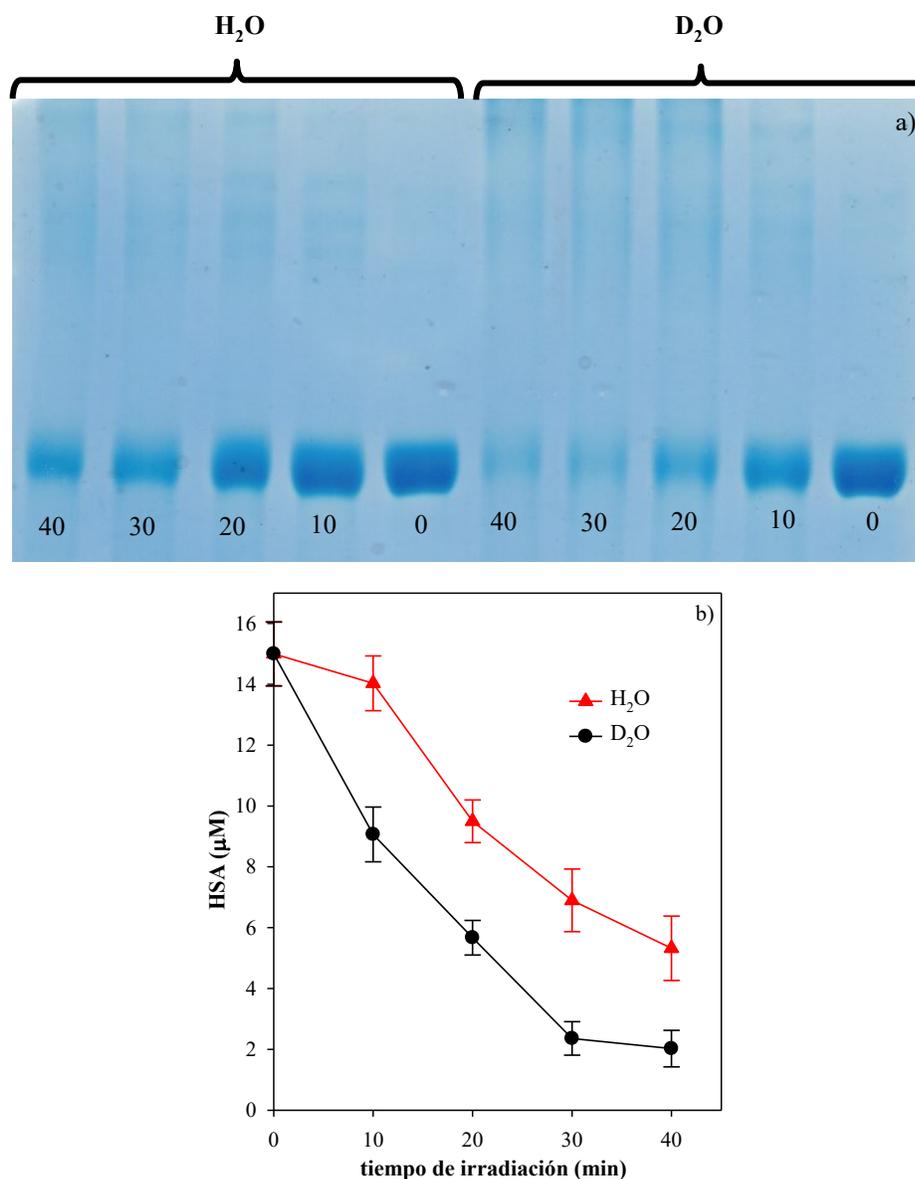
### 15.3. Fotooligomerización mediada por $^1\text{O}_2$

Considerando que la formación de Tyr<sub>2</sub> se encuentra reportada como un típico producto de un mecanismo Tipo I,<sup>20,21</sup> se estudió la formación de agregados de mayor peso molecular mediado por la oxidación de otros aminoácidos vía  $^1\text{O}_2$  (mecanismo Tipo II).<sup>1,22</sup>

Para ello, soluciones aireadas de HSA (15  $\mu\text{M}$ ) y Ptr (45  $\mu\text{M}$ ) en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O a pH/pD 6,0, fueron irradiadas bajo las mismas condiciones (*Sistema de Irradiación II*). El tiempo de vida del  $^1\text{O}_2$  ( $\tau_\Delta$ ) en D<sub>2</sub>O es mayor que en H<sub>2</sub>O por un factor de 15,<sup>23</sup> por lo que las reacciones que ocurren mediante un mecanismo Tipo II se favorecen en D<sub>2</sub>O (*Sección 5.5.5*). Al comparar los cromatogramas a 280 nm de las soluciones irradiadas en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O (Figura 15.10), se pudo ver que al utilizar D<sub>2</sub>O como solvente, la oligomerización se ve favorecida. A su vez, se complementó con un análisis por SDS-PAGE, donde se observó que el descenso de la banda correspondiente a HSA es mayor en D<sub>2</sub>O que en H<sub>2</sub>O (Figura 15.11) y que se forman productos de mayor peso molecular con el tiempo de irradiación, compatible con lo observado por HPLC. Este resultado confirma que la oligomerización de HSA fotoinducida por Ptr no solo está mediada por Tyr<sub>2</sub>, sino que otros enlaces están involucrados en el entrecruzamiento. Estos enlaces podrían adjudicarse a enlaces mediados por His y Lys.<sup>24,25</sup>



**Figura 15.10.** Cromatogramas registrados con HPLC-PDA ( $\lambda_{\text{ana}} = 280$  nm) para una solución de HSA y Ptr en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O, antes y después 30 min de irradiación. Condiciones de irradiación: [HSA]<sub>0</sub>: 15  $\mu\text{M}$ ; [Ptr]<sub>0</sub>: 45  $\mu\text{M}$ ; pH = 6,0;  $\lambda_{\text{irr}} = 350$  nm. Condiciones cromatográficas: 100% H<sub>2</sub>O, NaCl 50 mM; pH 7,0; 0,6 mL/min;  $\text{vol}_{\text{iny}} = 200$   $\mu\text{L}$ ; columna Biosep-SEC-2000.



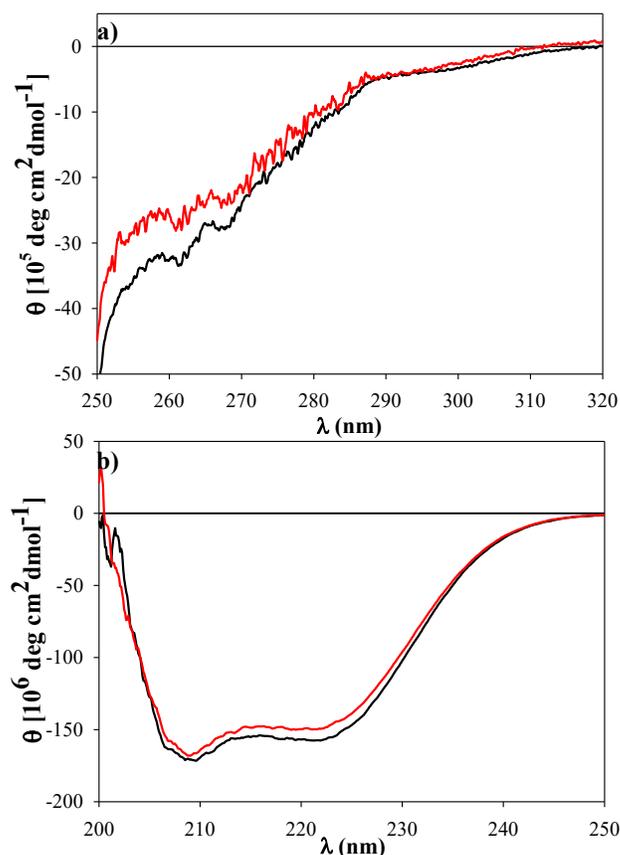
**Figura 15.11.a.** Perfil electroforético de soluciones de HSA y Ptr irradiadas a distintos tiempos en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O. El tiempo de irradiación figura al pie de cada calle. **b)** Variación de la concentración de HSA, estimada por SDS-PAGE, en D<sub>2</sub>O (●) y H<sub>2</sub>O (▲) en función del tiempo de irradiación. Condiciones SDS-PAGE: gel *resolving* 10%, gel *stacking* 4%, volumen de siembra: 10 µl, tinción Azul de Coomassie. Condiciones de irradiación: [HSA]<sub>0</sub>: 15 µM; [Ptr]<sub>0</sub>: 45 µM; pH = 6,0, λ<sub>irr</sub>= 350 nm.

#### 15.4. Estudio de la alteración de la estructura secundaria y terciaria de HSA

Se encuentra reportado que en ciertas proteínas, en particular en las globulares, la oligomerización mediada por residuos Tyr puede llevar a alteraciones en su conformación y en su actividad biológica.<sup>26</sup> Por lo tanto, con el fin de determinar si la formación fotoinducida de Tyr<sub>2</sub> en HSA genera modificaciones en la estructura terciaria y secundaria de la proteína,

soluciones acuosas aireadas de HSA (45  $\mu\text{M}$ ) y Ptr (35  $\mu\text{M}$ ) fueron analizadas por dicroísmo circular (*Sección 8.2*). Para estudiar las características espectrales de la estructura terciaria y secundaria, se registraron los espectros UV en el cercano (250-320 nm), y en el lejano (200-250 nm), respectivamente.

Como se puede observar en la Figura 15.12.b, en los espectros UV lejano se observan los mínimos característicos (208 nm y 222 nm) y el máximo a 190 nm de la estructura helicoidal  $\alpha$  de HSA. No se observan cambios en los espectros CD lejanos (Figura 15.12.b) y cercanos (Figura 15.12.a) al irradiar hasta 2 horas. Por lo tanto, la fotosensibilización por Ptr no altera de forma significativa la estructura secundaria y terciaria de HSA. Incluso a tiempos de irradiación para los cuales la oligomerización es muy importante, no se observa una alteración apreciable en la conformación de la proteína.



**Figura 15.12.** Evolución temporal de los espectros CD en el UV cercano (a) y en el UV lejano (b) de soluciones acuosas aireadas de HSA antes (línea negra) y después de 2 horas de irradiación (línea roja). Condiciones de irradiación:  $[\text{HSA}]_0$ : 45  $\mu\text{M}$ ;  $[\text{Ptr}]_0$ : 35  $\mu\text{M}$ ; pH = 6,0,  $\lambda_{\text{irr}}$  = 350 nm.

**Bibliografía**

- <sup>1</sup> V.V. Agon, *et.al*, *Free Radic Biol Med.*, **40**(4), 698-710, 2006.
- <sup>2</sup> L. Redecke, *et.al*, *Free Radical Biol. Med.*, **46**, 1353–1361, 2009.
- <sup>3</sup> S. Roy, *et.al*, *J. Pharm. Sci.*, **98**, 3182–3199, 2009.
- <sup>4</sup> J.D. Goosey, *et.al*, *Science*, **208**, 1278–1280, 1980.
- <sup>5</sup> M. F. Simpanya, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1589–1595, 2008.
- <sup>6</sup> W. Wang, *et.al*, *Int. J. Pharm.*, **390**, 89–99, 2010.
- <sup>7</sup> H. Shen, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol., A*, **133**, 115–122, 2000.
- <sup>8</sup> D. Balasubramanian, *et.al*, *Photochem Photobiol.*, **52**(4):761-768, 1990.
- <sup>9</sup> H.R. Shen, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **34**, 203-210, 1996.
- <sup>10</sup> H.R. Shen, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. A*, **130**, 1–6, 2000.
- <sup>11</sup> H. Verweij, J. van Steveninck, *Photochem. Photobiol.*, **35**, 265–267, 1982.
- <sup>12</sup> J. Dillon, R. Chiesa, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **57**, 526–530, 1993.
- <sup>13</sup> E. Alarcón, *et.al*, *Photochem. Photobiol.Sci.*, **8**, 933-943, 2009.
- <sup>14</sup> X. M. He, D.C. Carter, *Nature*. **358**,192-214, 1992.
- <sup>15</sup> D. C. Carter, J. X. Ho, *Adv. Protein Chem.*, **45**, 153-203, 1994.
- <sup>16</sup> H. Rokos, *et.al*, *J. Raman Spectrosc.*, **35**, 125-130, 2004.
- <sup>17</sup> H. Rokos, *et.al*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 805–811, 2002.
- <sup>18</sup> C. Castaño, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **89**, 1448–1455, 2013.
- <sup>19</sup> C. Castaño, *et.al*, *Org. Biomol.Chem.*, **12**, 3877–3886, 2014.
- <sup>20</sup> D. A. Malencik, S. R. Anderson, *Amino Acids*. **25**, 233–247, 2003.
- <sup>21</sup> J. D. Spikes, *et.al* , *Photochem. Photobiol.*, **70**, 130–137, 1999.
- <sup>22</sup> D. Balasubramanian, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **52**, 761–768, 1990.
- <sup>23</sup> C. S. Foote, E. L. Clennan, “*Properties and reaction of singlet dioxygen, in Active Oxygen in Chemistry*”, **vol 2**, pp.104, Chapman & Hall, New York, 1995.
- <sup>24</sup> H.R. Shen, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol., B*, , **34**, 203–210, 1996.
- <sup>25</sup> H.R. Shen, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol., A*, **130**, 1–6, 2000.
- <sup>26</sup> R. Kanwar, D. Balasubramanian, *Biochemistry*. **39**, 14976-14983, 2000.



# CAPÍTULO 16

## FOTOXIDACIÓN DEL TRP DE ALBÚMINA

En el Capítulo 15, se demostró que, como consecuencia del proceso fotosensibilizado por Ptr, HSA sufre una oligomerización mediada al menos en parte por Tyr<sub>2</sub>. Sin embargo, HSA posee otros aminoácidos oxidables, como es el caso del residuo Trp. Teniendo en cuenta que tanto el Trp libre<sup>1</sup> como el Trp presente en la  $\alpha$ -MSH<sup>2</sup> sufre modificaciones químicas debido al proceso fotosensibilizado por Ptr, se estudió las alteraciones del único residuo Trp de HSA, como así también, la formación de fotoproductos fluorescentes. A su vez, teniendo en cuenta que en el Capítulo 14 se identificó la formación de aductos Ub-Ptr, se evaluó si Ptr era capaz de generar aductos fluorescentes con HSA en presencia de O<sub>2</sub>.

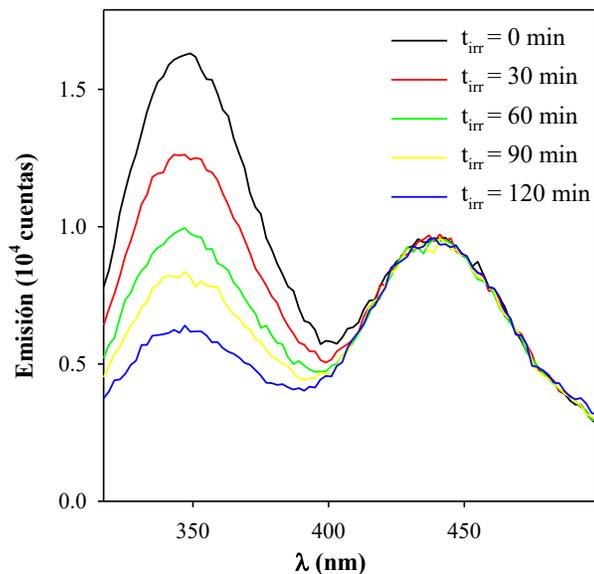
### 16.1. Modificaciones químicas en el residuo Trp de HSA

El primer objetivo de este capítulo fue averiguar si Ptr era capaz de dañar al único residuo Trp de HSA bajo irradiación UV-A. Para ello, soluciones acuosas que contenían Ptr y HSA fueron expuestas a irradiación (*Sistema de irradiación II, Sección 5.4.1*) por diferentes períodos de tiempo. Los experimentos se llevaron a cabo a pH 6,0  $\pm$ 0,1. Bajo estas condiciones experimentales sólo Ptr es excitada, ya que la proteína no absorbe a la longitud de onda de excitación (Figura 15.1).

#### 16.1.1. Fotoxidación del residuo Trp

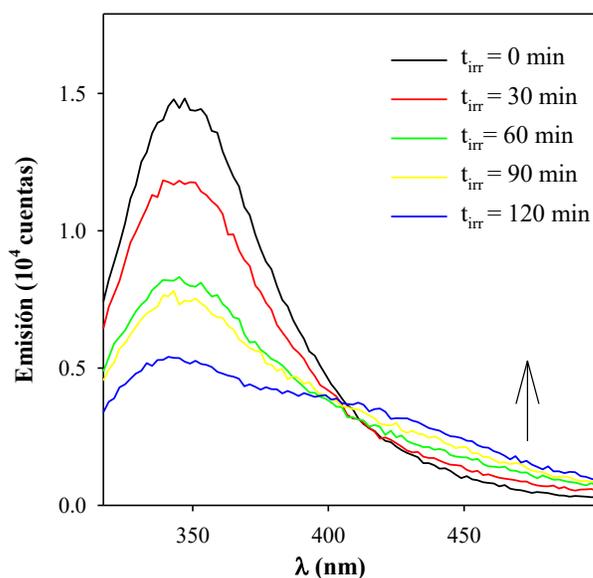
Considerando que tanto Trp como Tyr pueden actuar como sondas fluorescentes intrínsecas en proteínas, para evaluar si el único Trp presente en HSA se ve afectado en el proceso fotosensibilizado, se realizaron estudios de fluorescencia excitando a 295 nm, donde el único aminoácido que absorbe es Trp. Para ello, soluciones acuosas de HSA (15  $\mu$ M) y Ptr (15  $\mu$ M) fueron irradiadas con el *Sistema de irradiación II* durante diferentes períodos de tiempo y se registraron los correspondientes espectros de fluorescencia. En el espectro de emisión de la solución antes de la irradiación se observan dos bandas, una con un máximo

centrado en 345 nm y la otra en 440 nm (Figura 16.1), las cuales se corresponden a la emisión del Trp de HSA y de Ptr, respectivamente. Al irradiar la solución, se puede observar el descenso de la emisión del Trp, indicando una modificación en este fluoróforo, mientras que la emisión de Ptr se mantiene constante durante el tiempo de irradiación (Figura 16.1).



**Figura 16.1.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{exc}=295$  nm) de soluciones acuosas aireadas de HSA y Ptr irradiadas durante distintos tiempos. Condiciones de irradiación:  $[HSA]_0$ : 15  $\mu$ M;  $[Ptr]_0$ : 15  $\mu$ M; pH = 6,0,  $\lambda_{irr}$  = 350 nm.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Capítulo 15, donde se observó que la fracción oligomérica aislada posee una emisión residual en la misma zona donde emite Ptr cuando se excita a 310 nm, se aisló por cromatografía la fracción proteica para cada tiempo de irradiación, tal como se muestra en la Figura 15.8. Luego, se registraron los espectros de emisión de las soluciones aisladas excitando a 295 nm (Figura 16.2), donde se observa el descenso esperado de la emisión de Trp y un aumento en la zona de 400 nm a medida que aumenta la exposición a la irradiación, indicando la formación de productos fluorescentes que emiten en esa zona.

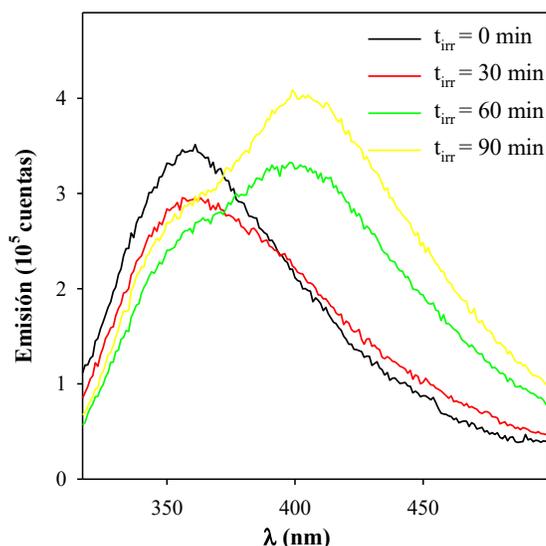


**Figura 16.2.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{exc}= 295$  nm) de la fracción proteica total aislada por HPLC de una solución de HSA (45  $\mu$ M) y Ptr (15  $\mu$ M) irradiada durante distintos tiempos.

Las características de emisión del Trp son dependientes de la polaridad del entorno en el que se encuentra el aminoácido.<sup>3</sup> Si se encuentra en un entorno apolar, como en el caso de HSA, y se expone a un ambiente polar, el máximo de emisión se corre a longitudes de onda mayores y disminuye su rendimiento cuántico de fluorescencia. Por lo tanto, los cambios espectrales mostrados en la Figura 16.2 podrían deberse no sólo a una modificación química de Trp, sino también a un cambio en su entorno provocado por modificaciones químicas en otros aminoácidos. Sin embargo, si uno considera un cambio de entorno, no se correlaciona el pequeño corrimiento del máximo observado hacia longitudes de ondas más cortas (Figura 16.2) con el gran descenso de emisión, lo cual permite inferir que el Trp es modificado químicamente en el proceso estudiado.

Con el fin de corroborar ésta hipótesis, se llevó a cabo el estudio de su fluorescencia en condiciones desnaturizantes. Para ello, luego de la irradiación de soluciones de HSA (45  $\mu$ M) y Ptr (15  $\mu$ M) y del aislamiento de las fracciones proteicas por HPLC, se llevó a cabo la desnaturización de las fracciones aisladas con cloruro de guanidinio (6 M), como agente desnaturizante, y ditioneitol (DTT) (0,5 mM), como reductor de puentes di-sulfuro. Como se puede ver en la Figura 16.3, al excitar a la proteína a 295 nm en condiciones desnaturizantes, si bien el máximo de emisión se encuentra desplazado a longitudes de

onda mayores (360 nm), no se logra observar el descenso de la emisión de la proteína a tiempos más largos, debido a que los productos de oxidación dificultan el análisis en esa zona del espectro. Por lo tanto, por esta técnica no se logró aportar información adicional sobre el daño sufrido por el Trp.

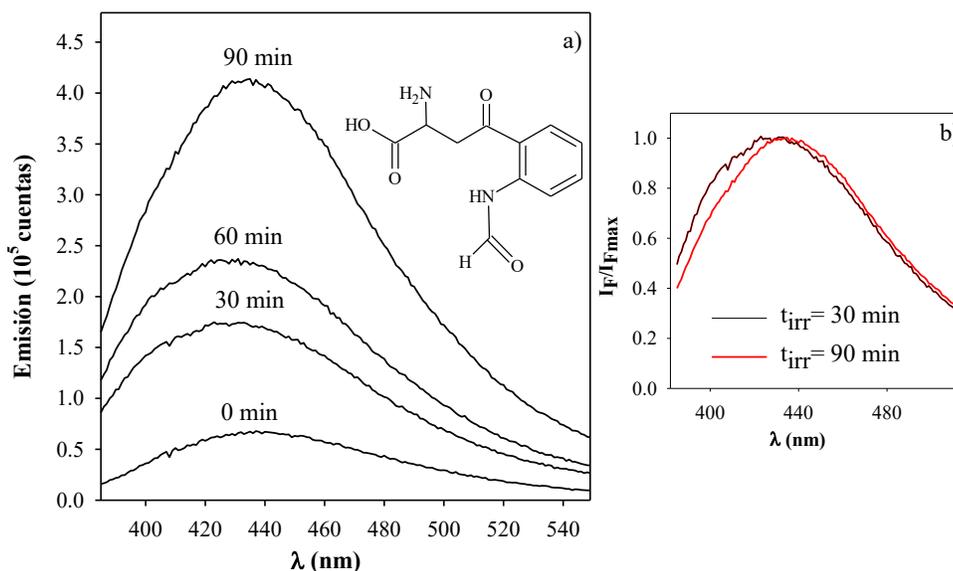


**Figura 16.3.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{exc}= 295$  nm) de la fracción proteica total aislada por HPLC en condiciones desnaturalizada en función del tiempo de irradiación.

### 16.1.2. Productos fluorescentes del Trp

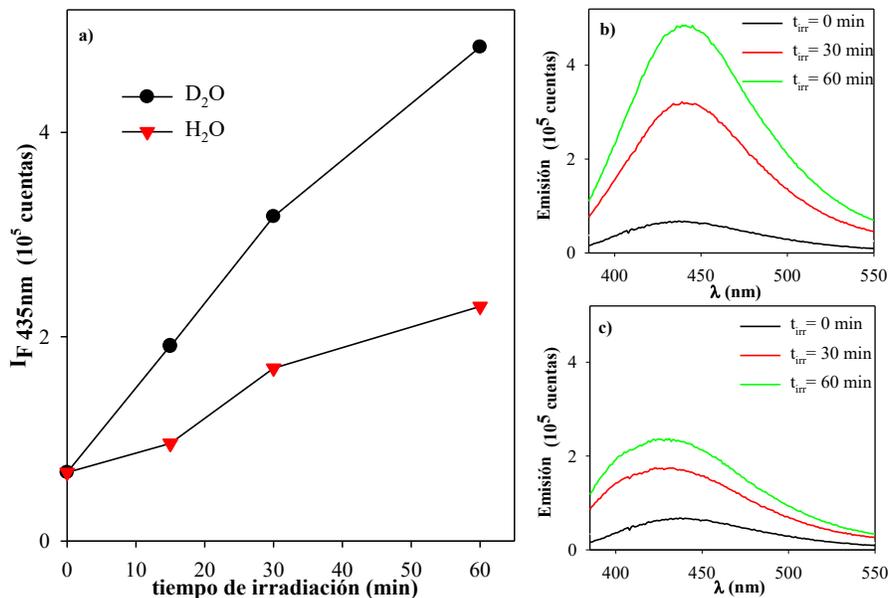
Algunos productos de oxidación del Trp, como el caso de la quinurenina y la N-formil-quinurenina (NFK), son fluorescentes con bandas de emisión centradas en 480 y 435 nm, cuando se excitan en sus bandas de menor energía comprendidas entre 280-400 nm y 280-360 nm, respectivamente.<sup>4</sup> A su vez, se encuentra reportado que la oxidación del Trp libre debido a la fotosensibilización por Ptr genera NFK.<sup>1</sup> Por lo tanto, el aumento de emisión en función del tiempo de irradiación en la región visible observada en la Figura 16.2, se podría adjudicar a la contribución de la emisión de Tyr<sub>2</sub> y de productos de oxidación del Trp. Para evaluar la formación de estos productos, se buscó eliminar la emisión de Tyr<sub>2</sub>. Para ello, las fracciones proteicas aisladas por HPLC-PDA se llevaron a pH 4,5 y luego, se registraron los espectros de emisión excitando a 360 nm, donde la forma ácida de Tyr<sub>2</sub> no absorbe. Como se observa en la Figura 16.4, hasta los 60 minutos de irradiación hay un aumento de emisión con un máximo compatible con el reportado para NFK,<sup>5</sup> sugiriendo que en la oxidación de HSA debido al proceso fotosensibilizado por Ptr se forma este producto de

oxidación del Trp. La formación de NFK justifica la emisión residual observada al excitar a la fracción oligomérica a pH 4,5 en la Figura 15.9, ya que su espectro de absorción no varía con el pH. Por otra parte, se observa que el espectro de emisión registrado a los 90 minutos de irradiación, presenta un corrimiento del máximo hacia longitudes de onda mayores, indicando que a este tiempo se está formando otro producto fluorescente además de NFK (Figura 16.4.b). Este corrimiento podría adjudicarse a que Ptr se pega a la proteína, pero que este proceso requiere más tiempo.



**Figura 16.4.a.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 360$  nm) de la fracción proteica aislada por HPLC a pH 4,5 de una solución de HSA (45  $\mu$ M) y Ptr (15  $\mu$ M), irradiada durante distintos tiempos. Estructura química de NFK. b) Espectros de emisión normalizados de la fracción proteica irradiada durante 60 y 90 min.

Con el fin de favorecer la formación de NFK, se irradiaron soluciones aireadas de HSA y Ptr utilizando  $D_2O$  como solvente, ya que NFK es un típico producto de oxidación del Trp por  $^1O_2$ .<sup>5,6</sup> La determinación de NFK se llevó a cabo utilizando la misma metodología que en la Figura 16.4, es decir, registrando los espectros de emisión ( $\lambda_{exc} = 360$  nm) de las fracciones proteicas aisladas por HPLC-PDA llevadas a pH 4,5. Como se puede ver en la Figura 16.5, la formación de NFK es mayor en  $D_2O$  que en  $H_2O$ , sin embargo, la cantidad formada no fue la esperada para un mecanismo exclusivamente Tipo II.

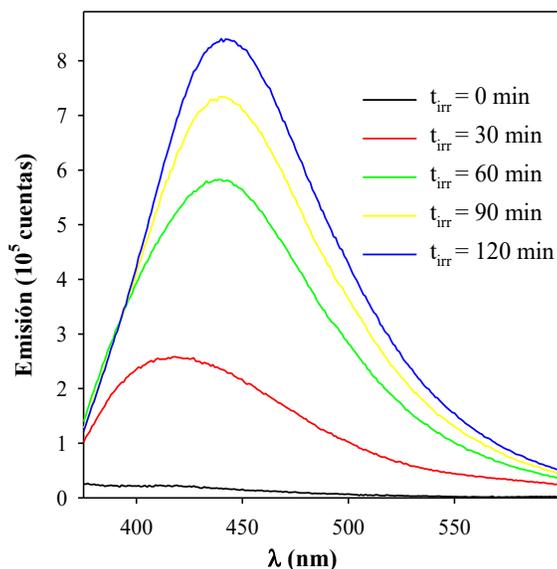


**Figura 16.5.a.** Intensidad de fluorescencia ( $I_F$ ) en función del tiempo de irradiación de la fracción proteica aislada de una solución de HSA (45  $\mu$ M) y Ptr (15  $\mu$ M) en H<sub>2</sub>O ( $\blacktriangledown$ ) y D<sub>2</sub>O ( $\bullet$ ). Espectros de emisión de la fracción proteica aislada en función del tiempo de irradiación en D<sub>2</sub>O (b) y H<sub>2</sub>O (c).  $\lambda_{exc}$  (fluorescencia)= 360 nm; pH/pD = 4,5.

## 16.2. Formación fotoaducto fluorescente HSA-Ptr

Teniendo en cuenta lo descrito en la *Sección 13.3* sobre la formación de fotoaductos fluorescentes entre Ub y Ptr en condiciones aeróbicas y los resultados de fluorescencia obtenidos en la sección anterior, se investigó si Ptr era capaz de unirse covalentemente a HSA en presencia de oxígeno. Estos experimentos no se pudieron realizar en anaerobiosis ya que HSA posee un tamaño que dificulta el burbujeo de gases en la solución. Para ello, se prepararon soluciones acuosas de HSA (15  $\mu$ M) y Ptr (45  $\mu$ M) a pH 6,0 y se irradiaron utilizando el *Sistema de Irradiación IV*. Las fracciones proteicas irradiadas se separaron de Ptr, utilizando columnas *sephadex* en condiciones desnaturalizantes, con la misma metodología usada en los experimentos con Ub (*Sección 7.4*). Como se muestra en el Figura 16.6, al registrar los espectros de emisión excitando a 350 nm con el Equipo II (*Sección 6.2.1*), se observa que a los 30 minutos de irradiación, el espectro presenta una banda centrada en 420 nm. Sin embargo, a partir de los 60 minutos, se puede ver el corrimiento del máximo a 440 nm. Este resultado indica que a tiempos cortos, se observa la emisión correspondiente a Tyr<sub>2</sub>, sin embargo, a tiempos más largos, otro proceso se vuelve relevante.

Teniendo en cuenta que la NFK absorbe a 350 nm y que su máximo de emisión está centrado a 435 nm, no podemos eliminar el aporte de emisión de este producto de oxidación del Trp y dificulta el análisis. Sin embargo, la formación del aducto HSA-Ptr a tiempos largos, justificaría el corrimiento del máximo observado a los 90 minutos en la Figura 16.4.



**Figura 16.6.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 350$  nm) de la fracción proteica total aislada por columnas de *sephadex* en condiciones desnaturalizantes, a tiempos cortos largos, en función del tiempo de irradiación. Condiciones de irradiación:  $[HSA]_0$ : 15  $\mu$ M;  $[Ptr]_0$ : 45  $\mu$ M;  $[CIG]$ : 3 M; pH = 6,0.

### **Bibliografía**

- <sup>1</sup> A. H. Thomas, *et.al*, *Free Radic. Biol. Med.*, **63**, 467-475, 2013.
- <sup>2</sup> C. Castaño, *et.al*, *Org. Biomol.Chem.*, **12**, 3877-3886, 2014.
- <sup>3</sup> J. R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", *Springer, New York*, Chapter 3, 2006.
- <sup>4</sup> Y. Fukunaga, *et.al*, *J. Biochem.*, **92**, 129-141, 1982.
- <sup>5</sup> D. Balasubramanian, *et.al*, *Photochem Photobiol.*, **52**(4), 761-768, 1990.
- <sup>6</sup> G.E. Ronsein, *et.al*, *Chem.Res.Toxicol.*, **21**, 1271-1283, 2008.



# CAPÍTULO 17

## MECANISMO DE REACCIÓN DEL DAÑO FOTOINDUCIDO A ALBÚMINA POR PTR

A partir de los resultados obtenidos hasta el momento en los Capítulos 15 y 16, donde se demostró que HSA puede ser oxidada en el proceso fotosensibilizado mediado por Ptr, se investigó el mecanismo de reacción responsable de este proceso. En particular se centró la investigación en la determinación del mecanismo de reacción que conlleva a la oxidación de Trp.

### 17.1. Interacción de HSA con Ptr

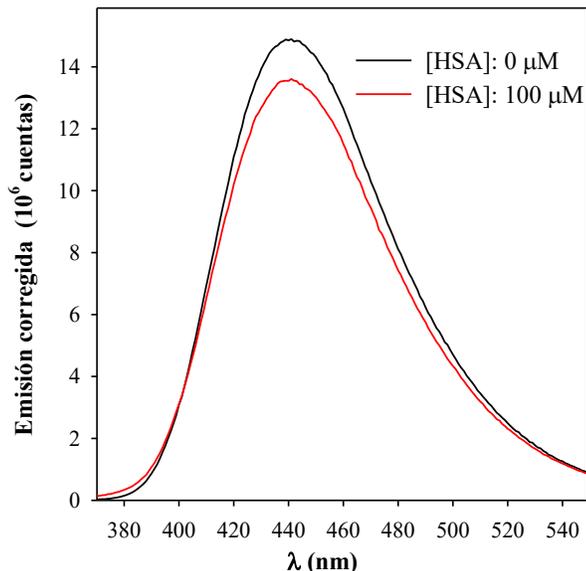
Para comenzar con el estudio se prepararon soluciones acuosas que contenían Ptr y HSA, las cuales fueron expuestas a irradiación estacionaria a 350 nm (*Sistema de irradiación II, Sección 5.4.1*) por diferentes períodos de tiempo. Los experimentos se llevaron a cabo a pH  $6,0 \pm 0,1$ , para trabajar con la forma ácida de la Ptr. Las soluciones irradiadas se analizaron por fluorescencia estacionaria, destello de fotólisis láser y SDS-PAGE.

La asociación de un fotosensibilizador a una proteína puede modificar la eficiencia y el mecanismo de fotodaño de la macromolécula. Teniendo en cuenta que HSA es una proteína que se encuentra en altas concentraciones fisiológicas (0,6 mM en el plasma sanguíneo) y que es capaz de unir diversos ligandos, se estudió por fluorescencia la interacción entre HSA y Ptr. En estudios previos, se ha reportado que la afinidad de BSA por Ptr es baja.<sup>1</sup> Por lo tanto, para evaluar si la asociación entre HSA y Ptr es significativa en nuestras condiciones experimentales, se registraron los espectros de emisión de Ptr excitando a 350 nm, entre 370 y 550 nm a 25 °C, en presencia de concentraciones crecientes de HSA. Teniendo en cuenta que a estas concentraciones de proteína existe dispersión, fue necesario corregir los espectros utilizando la Ecuación 17.1:<sup>2</sup>

$$I_{corr} = I_{obs} \times 10^{\left(\frac{Abs^{exc} + Abs^{em}}{2}\right)} \quad \text{(Ecuación 17.1)}$$

Donde  $I_{obs}$  y  $I_{corr}$  son la intensidades de fluorescencia observada y corregida a una  $\lambda$ , respectivamente;  $Abs^{exc}$  y  $Abs^{em}$  se corresponden a la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de excitación y emisión, respectivamente.

Como se puede observar en la Figura 17.1, no se observó variación significativa de la intensidad de fluorescencia en el rango de concentraciones de proteína utilizado (0-100  $\mu$ M), ya que el descenso de la intensidad de fluorescencia a 440 nm de la solución con la mayor concentración de HSA utilizada es menor al 10%. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que bajo nuestras condiciones experimentales, HSA no se encuentra asociada a Ptr. Además, como era de esperar para estos rangos de concentración de proteína, no existe un proceso de desactivación del estado excitado singlete de Ptr por HSA.

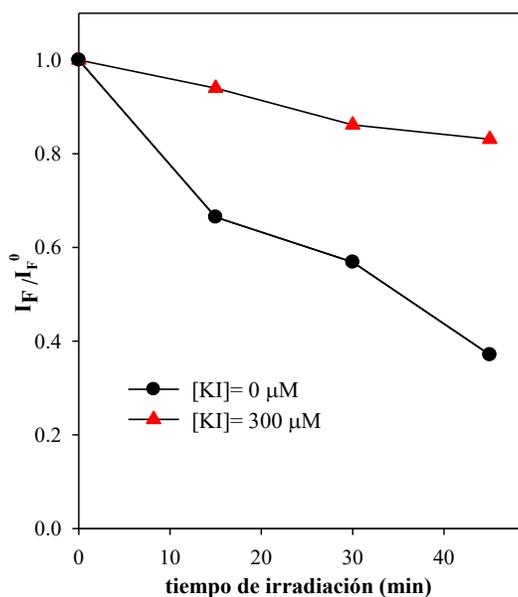


**Figura 17.1.** Espectros de fluorescencia de Ptr 17  $\mu$ M ( $\lambda_{exc}$ = 350 nm) en presencia y ausencia de HSA 100  $\mu$ M.

## 17.2. Participación del $^3\text{Ptr}^*$

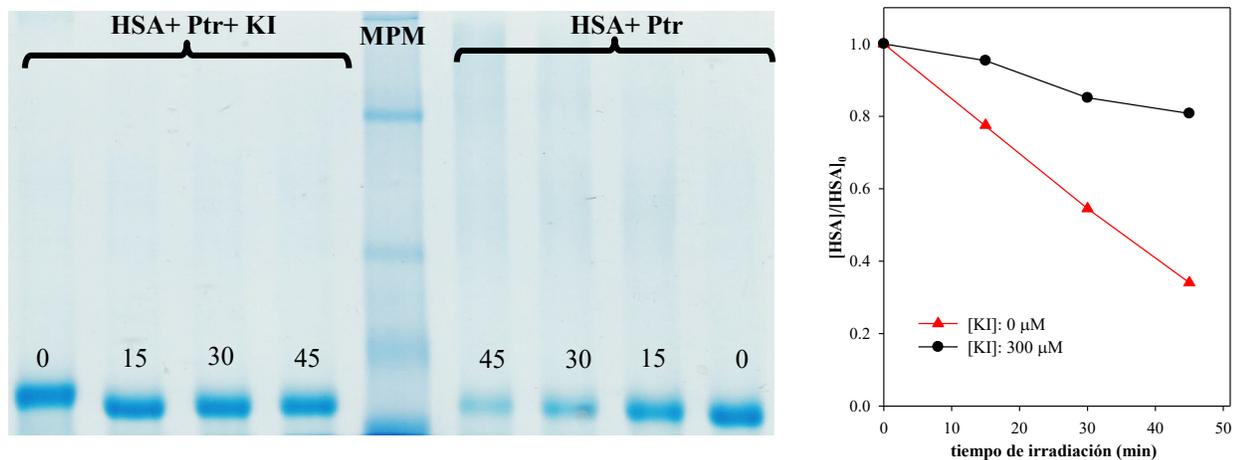
Se ha reportado que el  $^3\text{Ptr}^*$  es responsable de las reacciones fotosensibilizadas sobre distintos sustratos, como es el caso de nucleótidos,<sup>3,4</sup> aminoácidos,<sup>5,6,7</sup> péptidos<sup>8,9</sup> y proteínas.<sup>1,10,11,12</sup> Por lo tanto, para evaluar si el daño fotosensibilizado en HSA es iniciado por el  $^3\text{Ptr}^*$ , se realizaron estudios en presencia del anión ioduro de potasio ( $\text{I}^-$ ), ya que bajo ciertas condiciones de concentración (100-300  $\mu$ M), el  $\text{I}^-$  es un desactivador selectivo del  $^3\text{Ptr}^*$  (Sección 5.3.2).<sup>13,14</sup> Para ello, se evaluó si la presencia de KI era capaz de inhibir el

fotodaño en el residuo Trp de HSA, comparando la intensidad de fluorescencia a 350 nm, de las soluciones irradiadas en presencia y ausencia del desactivador ( $\lambda_{exc} = 295$  nm). Como se puede ver en la Figura 17.2, hay una disminución en el consumo de Trp en presencia del  $I^-$ , al comprar con aquellas soluciones irradiadas en ausencia del desactivador.



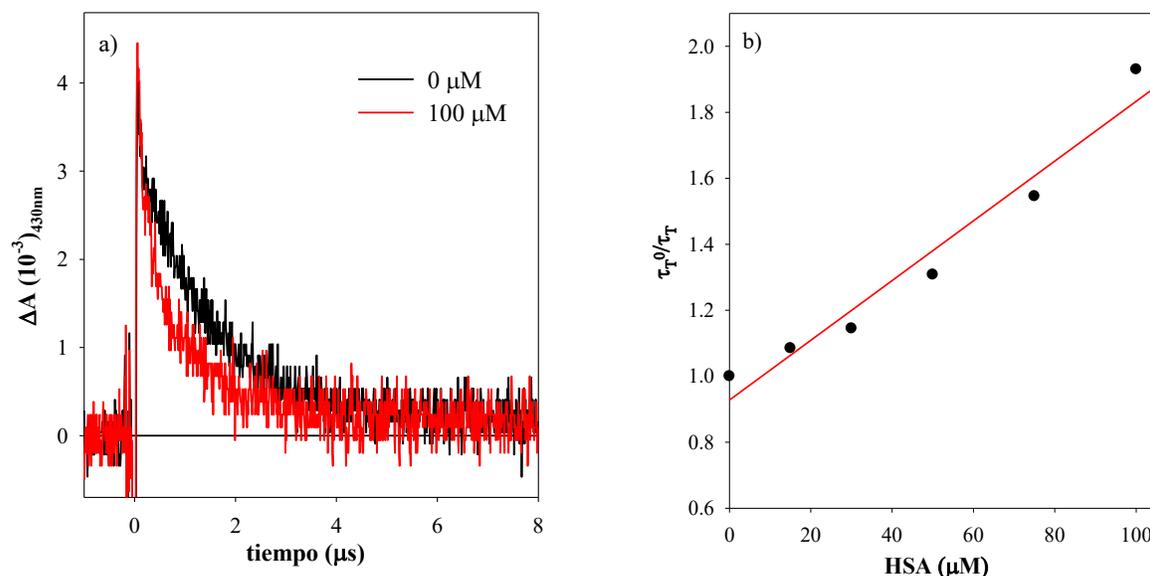
**Figura 17.2.** Evolución de la intensidad de fluorescencia relativa ( $I_F / I_F^0$ ) de una solución acuosa de HSA y Ptr en función del tiempo de irradiación, en ausencia y presencia de KI. Condiciones de irradiación:  $[HSA]_0: 10 \mu M$ ;  $[Ptr]_0: 100 \mu M$ ;  $[KI]_0: 300 \mu M$ ,  $\lambda_{irr} = 350$  nm. Condiciones de irradiación:  $\lambda_{exc} = 295$  nm.

A su vez, se evaluó la oligomerización de la proteína en presencia y ausencia de KI mediante el estudio de las soluciones irradiadas por SDS-PAGE. En el perfil electroforético que se muestra en la Figura 17.3, se puede observar que en presencia de KI no existe un descenso apreciable en la intensidad de las bandas de HSA cuando aumenta el tiempo de exposición a la radiación UV-A, a diferencia de lo observado en ausencia de KI. Es decir, que el consumo de HSA en presencia de  $I^-$  es despreciable. Estos resultados son compatibles con los obtenidos en la evaluación del daño a Trp, sugiriendo que el  $^3Ptr^*$  es el responsable del daño inducido por luz a esta proteína.



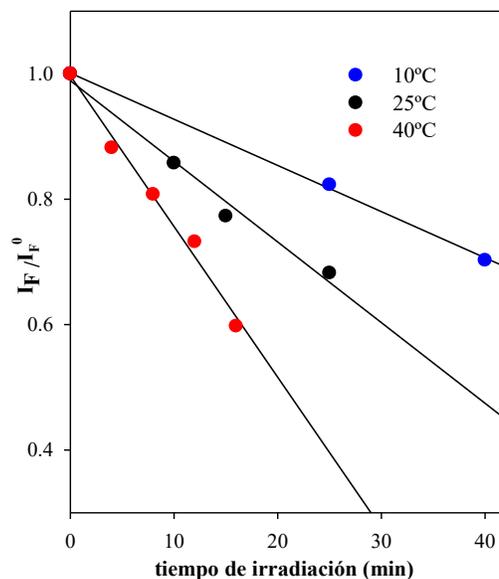
**Figura 17.3.** Perfil electroforético y evolución de la concentración relativa de HSA ( $[HSA]/[HSA]_0$ ) de soluciones de HSA y Ptr irradiadas a distintos tiempos, en ausencia y presencia de KI. MPM: marcador de peso molecular. Condiciones SDS-PAGE: gel *resolving* 10%, gel *stacking* 4%, volumen de siembra: 10  $\mu$ l, tinción Azul de Coomassie. Condiciones de irradiación:  $[HSA]_0$ : 10  $\mu$ M;  $[Ptr]_0$ : 100  $\mu$ M;  $[KI]_0$ : 300  $\mu$ M; pH = 6,0;  $\lambda_{irr}$  = 350 nm.

La participación del  $^3\text{Ptr}^*$  en el daño fotoinducido a BSA ya ha sido reportado mediante experimentos que sugieren indirectamente la participación de esta especie.<sup>1</sup> Por lo tanto, es este trabajo de tesis se evaluó la interacción entre el  $^3\text{Ptr}^*$  y HSA, mediante estudios por LFP (*Sección 6.3*) en condiciones aeróbicas. Para ello, se analizó la desactivación del  $^3\text{Ptr}^*$  en presencia de concentraciones crecientes de la proteína (0-100  $\mu$ M), de la misma forma que se hizo con Tyr (Figura 17.4.a).  $^3\text{Ptr}^*$  se caracteriza por tener dos tiempos de vida de 0,27 ( $\tau_{T1}$ ) y 3,9 ( $\tau_{T2}$ )  $\mu$ s.<sup>3</sup> Se realizó la determinación de  $\tau_{T2}$  en ausencia y presencia de las distintas concentraciones de HSA. En estas condiciones no fue posible determinar  $\tau_{T1}$ , debido a que el  $\text{O}_2$  es un *quencher* de los estados excitados tripletes y por lo tanto, disminuyen los  $\tau_T$ , además de las limitaciones del equipo previamente mencionadas (*Sección 9.1*). A partir del decaimiento en ausencia de HSA, se obtuvo un valor de  $\tau_{T2}^0$ : 1,5  $\mu$ s. A partir de la Ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 9.1), se determinó la constante de desactivación bimolecular del  $^3\text{Ptr}^*$  por HSA ( $k_q^{\text{HSA}}$ ) (Figura 17.4.b), para la cual se obtuvo un valor de  $(7,3 \pm 0,7) 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , indicando que la desactivación del  $^3\text{Ptr}^*$  por HSA es un proceso dinámico.



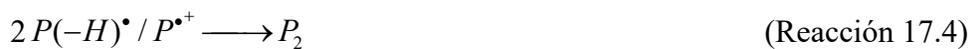
**Figura 17.4.a.** Decaimientos de  $^3\text{Ptr}^*$  registrados a partir de la evolución temporal a  $\Delta A_{430\text{nm}}$ , justo después del pulso de láser en ausencia y presencia de 100  $\mu\text{M}$  de HSA (escala: 1  $\mu\text{s}/\text{div}$ ). b) Gráfica de Stern-Volmer para la desactivación de  $^3\text{Ptr}^*$  por HSA.  $\lambda_{\text{exc}} = 355\text{ nm}$ ;  $[\text{Ptr}]$ : 75  $\mu\text{M}$ .

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados previos, pensar que la reacción se inicie por Ptr asociada a HSA, es poco probable. Para confirmar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos de irradiación a distintas temperaturas. El aumento de temperatura aumenta la velocidad molecular, y por lo tanto, hay una mayor probabilidad de colisión. Es decir, que si el proceso fotosensibilizado involucrara un mecanismo dinámico, el daño proteico debería aumentar con la temperatura. Por el contrario, si la reacción involucrara una asociación de moléculas, el aumento de la temperatura llevaría a la ruptura de los complejos formados en el estado basal y se esperaría un comportamiento opuesto al mencionado previamente, es decir, una disminución en el daño proteico. Se midieron selectivamente los espectros de emisión de Trp a temperatura ambiente, en soluciones acuosas de HSA (15  $\mu\text{M}$ ) y Ptr (45  $\mu\text{M}$ ) que fueron irradiadas a temperaturas diferentes (10, 25 y 40  $^{\circ}\text{C}$ ) durante diferentes períodos de tiempo, utilizando una lámpara de Xe ( $\lambda_{\text{exc}} = 295\text{ nm}$ , Equipo I). Como se observa en la Figura 17.5, el consumo del Trp estimado por la variación en la intensidad de fluorescencia relativa en su máximo de emisión, aumenta con la temperatura. Por lo tanto, como era de esperarse, se puede confirmar que el daño fotoinducido al residuo Trp de HSA por Ptr ocurre por un mecanismo dinámico.



**Figura 17.5.** Evolución de la intensidad de fluorescencia relativa ( $I_F/I_F^0$ ) a 25 °C de soluciones acuosas de HSA y Ptr irradiadas a distintas temperaturas por distintos periodos de tiempo. Condiciones de irradiación:  $[HSA]_0$ : 15  $\mu$ M;  $[Ptr]_0$ : 15  $\mu$ M; pH = 6,0.

A partir de los resultados previos en este capítulo y de los presentados en los Capítulos 15 y 16, se pueden plantear una serie reacciones (Reacciones 17.1-8, donde P = proteína):



${}^3Ptr^*$  puede sufrir reducción a partir de la transferencia de un electrón (ET) desde P, para formar el radical catión P ( $P^{\bullet+}$ ) y el radical anión Ptr ( $Ptr^{\bullet-}$ ) (Reacción 17.1). A

continuación, pueden ocurrir distintos procesos, representados en las Reacciones (17.3, 17.4 y 17.5): una reacción entre el radical neutro de P ( $P(-H)^{\bullet}$ ) o  $P^{\bullet+}$  con  $O_2$ , llevando a la oxidación de P; una dimerización de P y/o la formación de un aducto covalente Ptr-P. A su vez, puede ocurrir una transferencia de energía desde el  ${}^3Ptr^*$  al oxígeno molecular, lo que llevaría a la regeneración de Ptr y a la formación de  ${}^1O_2$  (Reacción 17.6), el cual puede reaccionar con la P y oxidar al sustrato (Reacción 17.7) y/o llevar a una dimerización (Reacción 17.8).

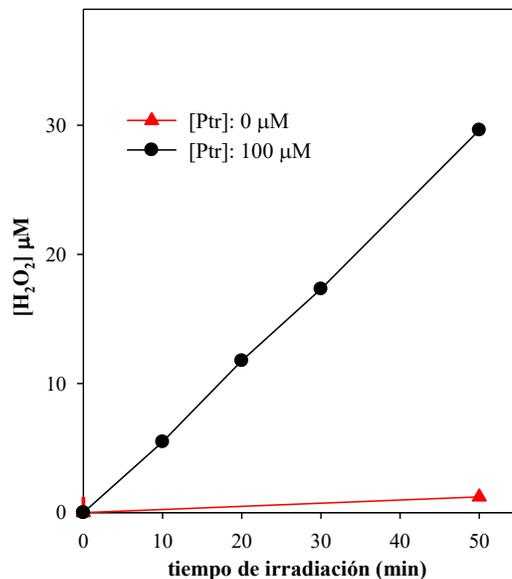
### 17.3. Determinación de la producción de $H_2O_2$

Se evaluó la generación de  $H_2O_2$  en el proceso fotoquímico. Para ello, se utilizó un kit comercial (“COLESTAT enzimático”) (Sección 6.1.2.1).

Como se puede ver en la Figura 17.6, cuando soluciones acuosas aireadas de HSA son expuestas a la radiación en presencia de Ptr se observa un aumento de la producción de  $H_2O_2$  a medida que aumenta el tiempo de exposición a la radiación. Por otra parte, no se observa producción de  $H_2O_2$  cuando la proteína es irradiada en ausencia de Ptr. Este resultado permite concluir que el  $H_2O_2$  es uno de los productos de la reacción fotosensibilizada. Teniendo en cuenta los antecedentes previos de estudios a aminoácidos libres,<sup>5,6,7</sup> se infiere que el  $H_2O_2$  viene del  $O_2^{\bullet-}$ , el cual, proviene de la reacción del  $O_2$  con el radical anión de Ptr, lo que explica que no se consuma el fotosensibilizador durante el proceso.

Como se mencionó previamente, el  ${}^3Ptr^*$  sufre una reducción por ET desde P a  ${}^3Ptr^*$  para formar  $P^{\bullet+}$  y  $Ptr^{\bullet-}$  (Reacción 17.1). La transferencia de electrones desde  $Ptr^{\bullet-}$  al  $O_2$ , regenera a Ptr y genera  $O_2^{\bullet-}$  (Reacción 17.9). Este radical puede dismutarse con su respectivo ácido conjugado  $HO_2^{\bullet}$  para formar  $H_2O_2$  (Reacción 17.10).





**Figura 17.6.** Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en soluciones acuosas aireadas de HSA en presencia y ausencia de Ptr. Condiciones de irradiación: [HSA]<sub>0</sub>= 10 µM, [Ptr]<sub>0</sub>=100 µM, λ<sub>irr</sub>= 350 nm.

### **Bibliografía**

- <sup>1</sup> A. H. Thomas, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **120**, 52-58, 2013.
- <sup>2</sup> M. Kubista, *et.al*, *Analyst*, **119**, 417-419, 1994.
- <sup>3</sup> G. Petroselli, *et.al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 3001-3011, 2008.
- <sup>4</sup> M. P. Serrano, *et.al*, *ChemPhysChem.*, **16**, 2244-2252, 2015.
- <sup>5</sup> A. H. Thomas, *et.al*, *Free Radic. Biol. Med.*, **63**, 467-475, 2013.
- <sup>6</sup> C. Castaño, *et.al*, *Photochem. Photobiol.*, **89**, 1448-1455, 2013.
- <sup>7</sup> C. Castaño, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **153**, 483-489, 2015.
- <sup>8</sup> C. Castaño, *et.al*, *Org. Biomol.Chem.*, **12**, 3877-3886, 2014.
- <sup>9</sup> C. Castaño., *et al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **164**, 226-235, 2016.
- <sup>10</sup> A. H. Thomas, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **141**, 262-268, 2014.
- <sup>11</sup> M. L. Dántola, *et.al*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **424**, 568-572, 2012.
- <sup>12</sup> M. L. Dántola, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **149**, 172-179, 2015.
- <sup>13</sup> M. S. Kritsky, *et.al*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **39**, 43-48, 1997.
- <sup>14</sup> M. P. Denofrio, *et.al*, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **13**, 1058-1065, 2014.

## CAPÍTULO 18

# DAÑO FOTOINDUCIDO DE $\alpha$ -HEMOLISINA POR PTR

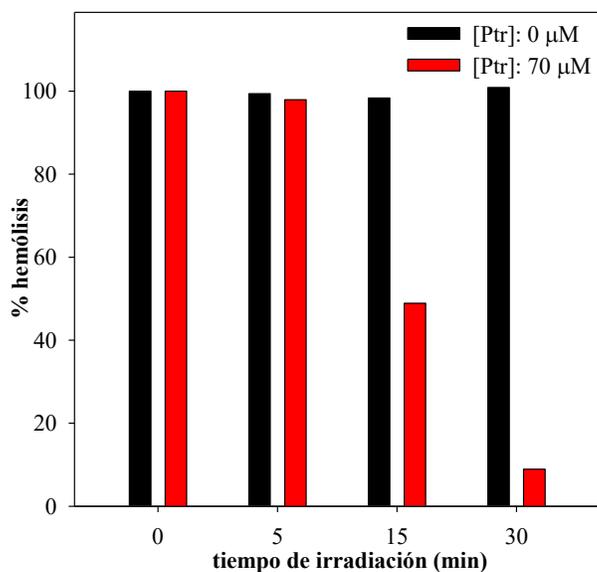
La capacidad de Ptr para fotoinactivar proteínas fue evaluada únicamente con la enzima Tirosinasa (*Sección 4.3*),<sup>1</sup> la cual posee cobre en su sitio activo, y se postuló que la inactivación podría deberse a la oxidación del metal. Por lo tanto, se buscó evaluar si Ptr era capaz de fotoinactivar proteínas que no involucran metales en sus sitios activos.

$\alpha$ -Hemolisina ( $\alpha$ -HlyA) es una exotoxina, miembro de la familia de toxinas formadoras de poros (RTX), secretada por cepas uropatogénicas de *Escherichia coli*.<sup>2,3,4</sup> El mecanismo de acción de la toxina parece involucrar tres etapas que llevan a la lisis celular: unión, inserción y la oligomerización de la toxina en la membrana.<sup>5,6</sup> La síntesis, maduración y secreción de HlyA está determinada por el operón hlyCABD.<sup>7-10</sup> El gen estructural hlyA codifica para un polipéptido de 110 kDa. Este polipéptido, denominado proHlyA, es la forma inactiva de la toxina, que se convierte en lítica luego de una activación postraduccional. La acilación de la proteína en dos residuos internos de lisina la convierte en una toxina muy virulenta al exponer regiones intrínsecamente desordenadas que son esenciales en diferentes pasos del mecanismo de acción de la misma. Específicamente, la exposición de estas regiones está involucrada en interacciones proteína-proteína dentro del proceso de oligomerización. La formación del oligómero es responsable de la permeabilidad inducida en las células blanco.  $\alpha$ -HlyA actúa sobre una gran variedad de tipos celulares de diversas especies como por ejemplo, glóbulos rojos, fibroblastos embrionarios y adultos, granulocitos, linfocitos y macrófagos.<sup>11</sup> El objetivo principal de este capítulo fue estudiar si Ptr era capaz de fotoinactivar a  $\alpha$ -HlyA cuando es expuesta a radiación UV-A y evaluar la formación de Tyr<sub>2</sub> en estructuras proteicas de gran tamaño. A su vez, se analizó el daño químico y estructural generado en  $\alpha$ -HlyA y en proHlyA como consecuencia del proceso fotosensibilizado.

## 18.1. Fotosensibilización de $\alpha$ -HlyA por Ptr

### 18.1.1. Medidas de actividad hemolítica

Se comenzó investigando si Ptr era capaz de fotoinactivar a  $\alpha$ -HlyA en solución acuosa bajo radiación UV-A. Para ello, se prepararon soluciones aireadas que contenían Ptr (70  $\mu$ M) y  $\alpha$ -HlyA (1,75  $\mu$ M) a pH 7,3  $\pm$ 0,1 en TRIS 20 mM, NaCl 150 mM y cloruro de guanidinio (ClG) 0,2 M. Luego, se expusieron a irradiación (*Sistema de Irradiación I*) por un período de hasta 30 minutos y se realizó la medida de actividad hemolítica de las muestras irradiadas en ausencia y presencia de Ptr (*Sección 6.1.2.3*). En la Figura 18.1, se observa una pérdida de actividad hemolítica en función del tiempo de irradiación en presencia de Ptr, mientras que no se observa pérdida de actividad hasta los 30 minutos irradiación en ausencia de Ptr, confirmando que Ptr es capaz de fotoinactivar a  $\alpha$ -HlyA.

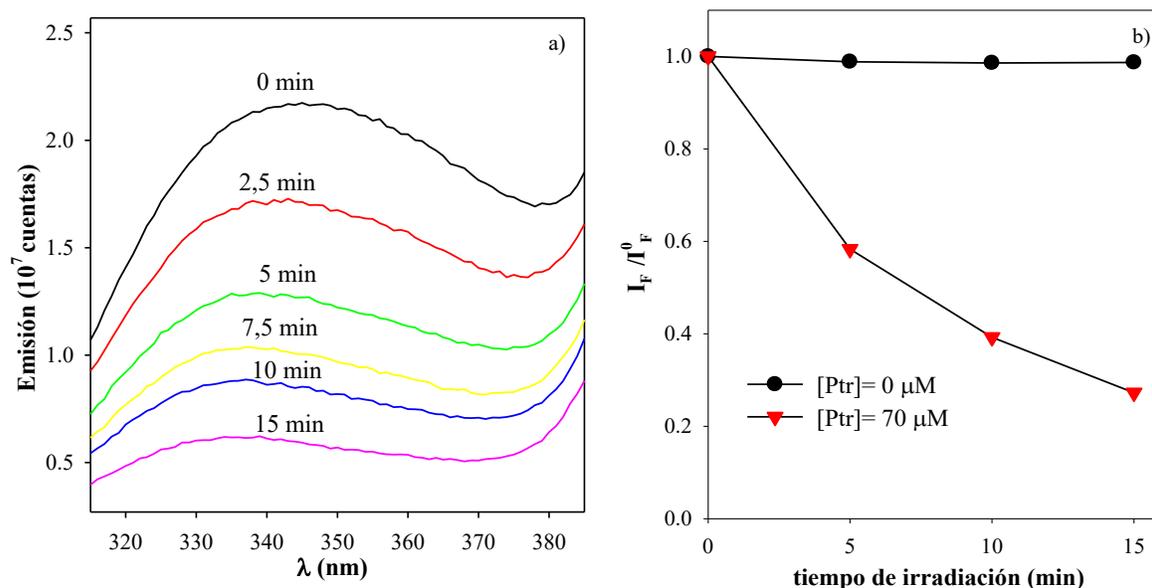


**Figura 18.1.** Porcentaje de hemólisis en función del tiempo de irradiación, en presencia y ausencia de Ptr. Condiciones de irradiación: [ $\alpha$ -HlyA]<sub>0</sub>: 1,75  $\mu$ M, [Ptr]<sub>0</sub>: 70  $\mu$ M, pH: 7,3,  $\lambda_{irr}$ = 350 nm. Condiciones de medida de actividad hemolítica: datos calculados a los 30 min de agregados los glóbulos rojos para [ $\alpha$ -HlyA]: 1,75  $\mu$ M.

### 18.1.2. Alteraciones en los residuos Trp y Tyr

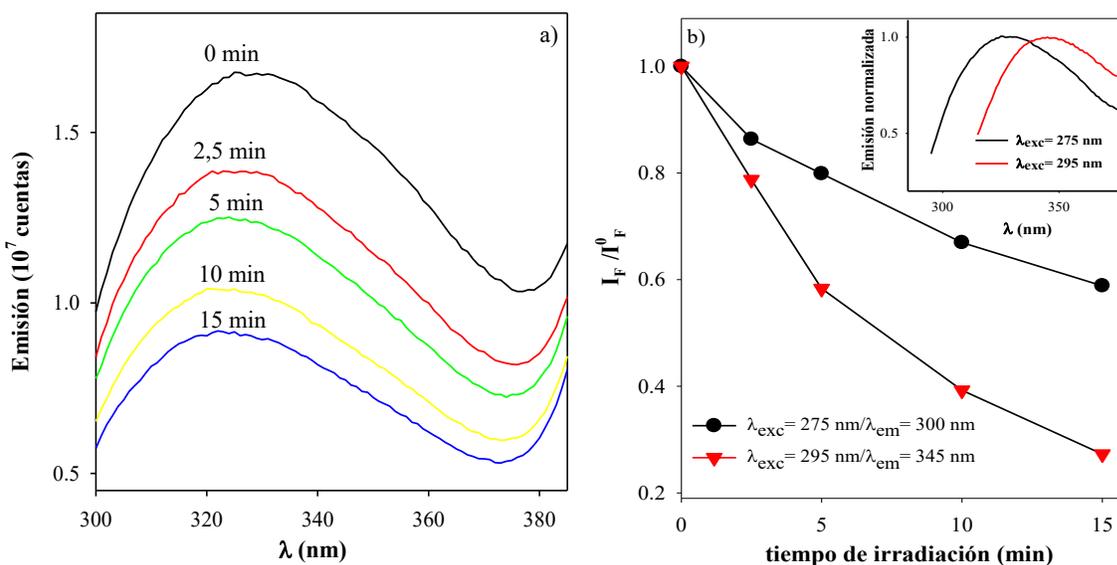
$\alpha$ -HlyA contiene 4 Trp y 40 Tyr en su estructura. Para evaluar si los residuos de Trp presentes en la  $\alpha$ -HlyA se ven afectados por el proceso fotosensibilizado, se realizaron estudios de fluorescencia excitando a 295 nm, donde el único aminoácido que absorbe es Trp. Para ello, se midieron los espectros de emisión de soluciones acuosas de  $\alpha$ -HlyA (1,75

$\mu\text{M}$ ) y Ptr ( $70 \mu\text{M}$ ) irradiadas durante diferentes períodos de tiempo, luego de dializarlas para eliminar el CIG del medio. Como se puede ver en la Figura 18.2.a, en el espectro de emisión se observa una banda, con un máximo centrado en  $345 \text{ nm}$ , la cual se corresponden a la emisión de los residuos Trp de  $\alpha$ -HlyA. Al irradiar la solución, se puede observar el descenso de la banda y un corrimiento hacia el azul del máximo de emisión, indicando una modificación en este cromóforo. Cabe destacar que los espectros se midieron en el rango de  $315\text{-}410 \text{ nm}$  con el fin de evitar observar la contribución de la fluorescencia de Ptr en las muestras analizadas. Por otro lado, a modo de control, se midieron los espectros de emisión de una solución de  $\alpha$ -HlyA ( $1,75 \mu\text{M}$ ) irradiada durante distintos períodos de tiempo en ausencia de Ptr ( $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ ) (Figura 18.2.b) y los espectros de emisión de las muestras irradiadas entre  $360$  y  $600 \text{ nm}$  excitando a  $340 \text{ nm}$ . En ambos controles, tanto la emisión de Ptr como de  $\alpha$ -HlyA, se mantienen constantes durante el tiempo de irradiación. A partir de estos resultados, se puede confirmar que, como consecuencia del proceso fotosensibilizado, Ptr daña a los residuos Trp presentes en  $\alpha$ -HlyA.



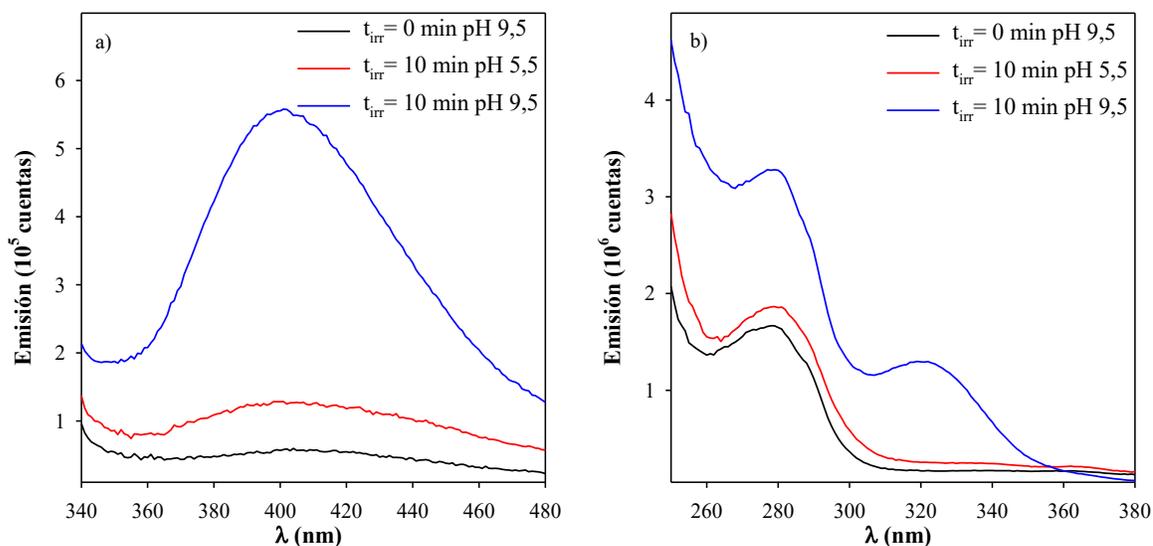
**Figura 18.2.a.** Espectros de emisión ( $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ ) de soluciones acuosas de  $\alpha$ -HlyA y Ptr irradiadas durante distintos tiempos. Los tiempos de irradiación se encuentran sobre cada espectro. **b)** Intensidad de fluorescencia relativa en función del tiempo de irradiación de una solución de  $\alpha$ -HlyA en presencia y ausencia de Ptr. Condiciones de irradiación:  $[\alpha\text{-HlyA}]_0$ :  $1,75 \mu\text{M}$ ;  $[\text{Ptr}]_0$ :  $70 \mu\text{M}$ ; pH: 7,3,  $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$ .

Para evaluar si los residuos de Tyr presentes en  $\alpha$ -HlyA también se ven afectados durante la reacción fotosensibilizada, se midieron los espectros de emisión de las soluciones irradiadas de  $\alpha$ -HlyA (1,75  $\mu$ M) y Ptr (70  $\mu$ M) pero excitando a 275 nm, donde tanto los residuos Tyr como los residuos Trp absorben. Al comparar los espectros normalizados de las soluciones sin irradiar obtenidos al excitar a 275 nm y 295 nm (Inset Figura 18.3.b), se puede ver un corrimiento del máximo hacia el azul al excitar a 275 nm, indicando una contribución de los residuos de Tyr en la emisión de  $\alpha$ -HlyA. De este gráfico comparativo, se desprende a si mismo, que la emisión de la proteína a 300 nm cuando se la excita a 275 nm, se debe solo a Tyr. Como se muestra en la Figura 18.3.a, hay un descenso de emisión correspondiente a  $\alpha$ -HlyA en función del tiempo de irradiación. Se midió la emisión a 300 nm excitando a 275 nm y a 345 nm, excitando a 295 nm. En la primera condición se evalúa la fotodegradación de Tyr, mientras que en la segunda de Trp. En este gráfico comparativo se observa claramente que el consumo del Trp es más rápido que el de Tyr (Figura 18.3.b).



**Figura 18.3.a.** Espectros de emisión de una solución acuosa de  $\alpha$ -HlyA y Ptr ( $\lambda_{exc} = 275$  nm), en función del tiempo de irradiación. Los tiempos de irradiación se encuentran sobre cada espectro. **b)** Intensidad de fluorescencia relativa a 300 y 345 nm, excitando a 275 y 295 nm, respectivamente, en función del tiempo de irradiación. Inset: Espectros normalizados de una solución aireada de HlyA y Ptr sin irradiar, excitando a 275 nm y 295 nm. Condiciones de irradiación:  $[\alpha\text{-HlyA}]_0$ : 1,75  $\mu$ M;  $[\text{Ptr}]_0$ : 70  $\mu$ M; pH = 7,3.

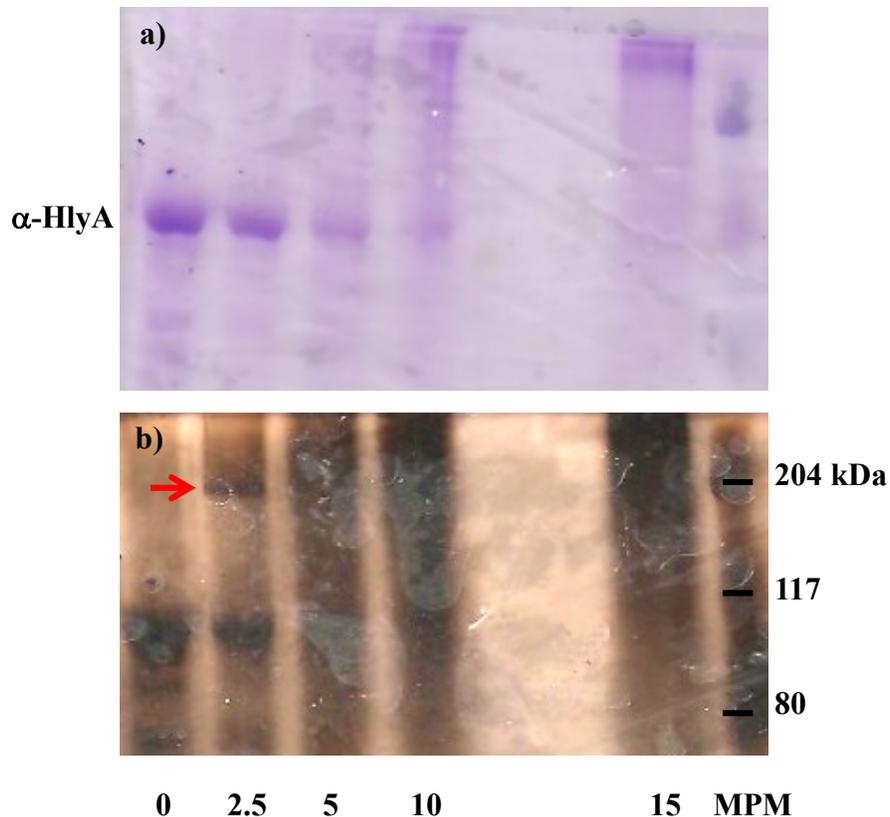
Con el fin de investigar si ocurre la formación de Tyr<sub>2</sub> en  $\alpha$ -HlyA como consecuencia del proceso fotosensibilizado por Ptr, se irradiaron muestras de Ptr (70  $\mu$ M) y  $\alpha$ -HlyA (1,75  $\mu$ M) a pH 7,3 y a continuación, se llevó a cabo la separación de la fracción proteica de Ptr, utilizando columnas *sephadex* (Sección 7.4). Se utilizó un volumen de elución de 3,5 mL, utilizando TRIS 20 mM con NaCl 150 mM a pH 7,3 como buffer de corrida y se estudió la fluorescencia de la fracción proteica aislada. Las muestras se dividieron en dos alícuotas y se llevaron a pH 5,5 y 9,5. Luego, se registraron los espectros de emisión excitando a 320 nm a estos dos valores de pH, ya que a pH < 6,0, la forma ácida de Tyr<sub>2</sub> no absorbe y por lo tanto, no se debería observar emisión, como se demostró en la Parte I de resultados. Efectivamente, como se muestra en la Figura 18.4.a, se observa la emisión característica de Tyr<sub>2</sub> centrada en 405 nm en la muestra en medio alcalino de  $\alpha$ -HlyA irradiada durante 10 minutos. Esto no ocurre cuando esta muestra se lleva a pH 5,5. Al registrar los espectros de excitación de ambas muestras, siguiendo la emisión a 405 nm, se observa que la muestra en medio alcalino posee la banda característica de Tyr<sub>2</sub> centrada en 320 nm, y la muestra en medio ácido no. (Figura 18.4.b).



**Figura 18.4** Espectros de emisión ( $\lambda_{exc} = 320$  nm, **a**) y de excitación ( $\lambda_{em} = 405$  nm, **b**) de la fracción proteica total, aislada por columnas de *sephadex*, antes y después de 10 min de irradiación, llevadas a pH 5,5 (línea roja) y pH 9,5 (línea azul).

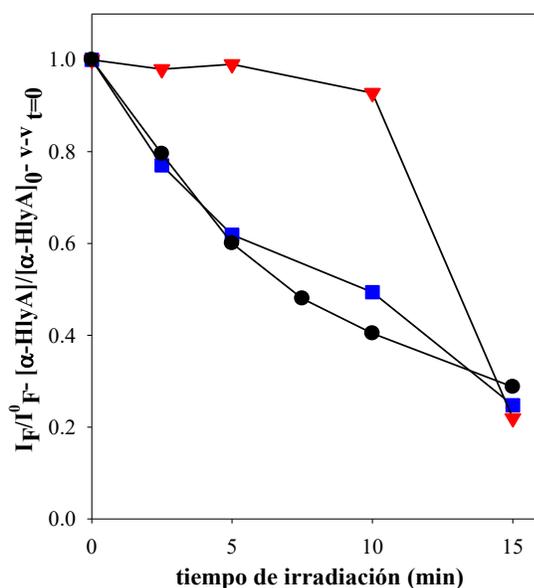
### 18.1.3. Análisis electroforético

Por otro lado, se realizó el análisis electroforético (SDS-PAGE al 8%, Sección 8.1) de las soluciones expuestas a radiación UV-A en presencia Ptr. Como se muestra en la Figura 18.5.a, hay un descenso de la intensidad de la banda correspondiente a  $\alpha$ -HlyA en función del tiempo de irradiación, compatible con una alteración en la estructura de la toxina. Para evaluar la formación de productos de mayor peso molecular, se realizó una tinción de  $\text{AgNO}_3$  del mismo gel, debido a que este método de tinción permite detectar concentraciones de proteínas más baja que con la tinción con *Coomassie Blue* (Sección 8.1.2). En la Figura 18.5.b, si bien la banda correspondiente a  $\alpha$ -HlyA satura, se puede observar que a los 2,5 min se forma una nueva banda, cuyo peso molecular se corresponde al de un dímero de  $\alpha$ -HlyA, mientras que a tiempos mayores de irradiación, se forman productos de mayor peso molecular, cuyas bandas no se llegan a resolver por esta técnica. Por lo tanto, a partir de estos resultados y lo observado en la Figura 18.4, se puede concluir que el proceso fotosensibilizado induce la oligomerización de  $\alpha$ -HlyA, siendo los dímeros de Tyr responsables, en parte, del entrecruzamiento.



**Figura 18.5.** Perfil electroforético de soluciones de  $\alpha$ -HlyA irradiadas a distintos tiempos en presencia de Ptr con tinción Coomasie Blue (a) y  $\text{AgNO}_3$  (b). MPM: marcador peso molecular. El tiempo de irradiación figura al pie de cada calle. Condiciones SDS-PAGE: gel *resolving* 8%, gel *stacking* 4%, volumen de siembra: 20  $\mu\text{l}$ . Condiciones de irradiación:  $[\alpha\text{-HlyA}]_0$ : 1,75  $\mu\text{M}$ ,  $[\text{Ptr}]_0$ : 70  $\mu\text{M}$ ;  $\lambda_{\text{irr}}= 350$ .

Los resultados presentados en esta sección muestran que cuando soluciones aireadas de  $\alpha$ -HlyA se exponen a radiación UV-A en presencia de Ptr, se produce un descenso de la emisión de fluorescencia de la toxina, una pérdida de actividad hemolítica y un descenso de la concentración del monómero de  $\alpha$ -HlyA. La Figura 18.6 compara estos tres parámetros indicando que el descenso de la intensidad de fluorescencia relativa (estimada por el daño a los residuos Trp) junto con el descenso de la concentración relativa de monómero de  $\alpha$ -HlyA (cuantificado por densidad óptica de las bandas de SDS-PAGE), ocurren simultáneamente. Ambos procesos ocurren dentro de los primeros 10 minutos de irradiación, antes que la toxina pierda su actividad hemolítica. La misma pierde abruptamente su actividad (80%) recién a los 15 minutos. Esto indicaría que al ser más lenta la fotoinactivación, la actividad hemolítica de  $\alpha$ -HlyA no se ve afectada por la oligomerización o por la oxidación de los residuos Trp. Se cree que hay actividad mientras haya monómero en solución que se pueda unir a la membrana y cuando  $\alpha$ -HlyA se encuentra oligomerizada en su totalidad, pierde la capacidad de unirse y por eso se observa la pérdida de actividad.



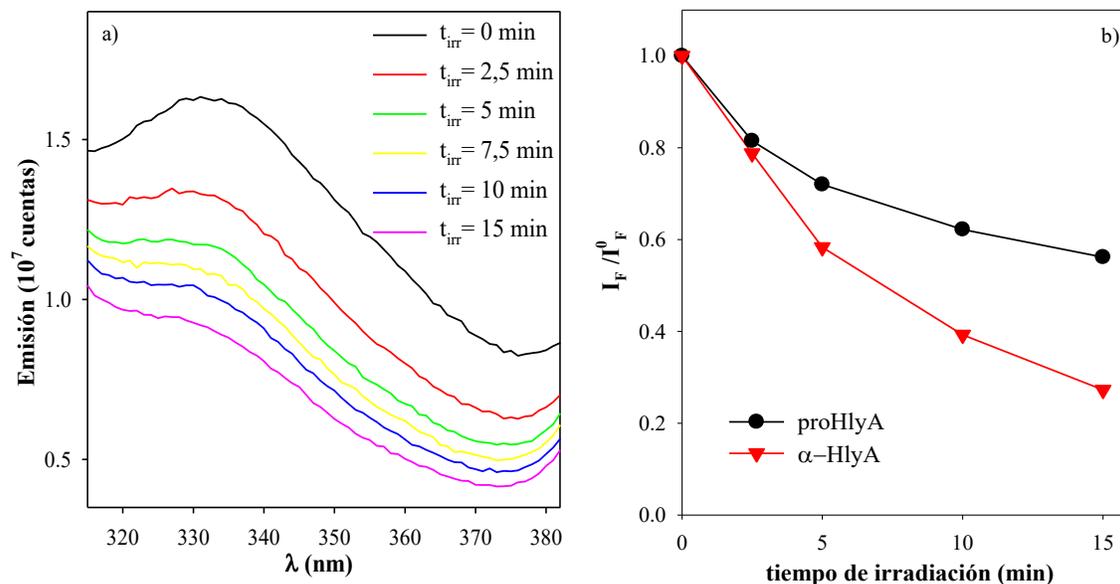
**Figura 18.6.** Evolución de la intensidad de fluorescencia relativa ( $I_F/I_F^0$ , ●), la concentración relativa de  $\alpha$ -HlyA ( $[\alpha\text{-HlyA}]/[\alpha\text{-HlyA}]_0$ , ■) estimada por SDS-PAGE y la medida de la actividad hemolítica ( $v-v_{t=0}$ , ▼) de soluciones de HlyA en presencia de Ptr en función del tiempo de irradiación. Condiciones de irradiación:  $[\alpha\text{-HlyA}]_0$ : 1,75  $\mu\text{M}$ ,  $[\text{Ptr}]_0$ : 70  $\mu\text{M}$ , en Tris 20 mM y NaCl 150 mM a pH 7,3, dializadas previamente.

## 18.2. Fotosensibilización de proHlyA por Ptr

### 18.2.1. Alteraciones en los residuos Trp

Con el fin de evaluar la influencia de la estructura de proHlyA en el proceso fotosensibilizado por Ptr, se prepararon soluciones de esta proteína (1,75  $\mu\text{M}$ ) y Ptr (70  $\mu\text{M}$ ) a pH 7,3 en Tris 20 mM y NaCl 150 mM y se expusieron a irradiación durante distintos períodos de tiempo (*Sistema de Irradiación I*). En la Figura 18.7.a se muestran los espectros de emisión registrados para los distintos tiempos de irradiación ( $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ ), donde se puede ver que el máximo de emisión se encuentra centrado en 332 nm, a diferencia del máximo centrado en 345 nm, observado para  $\alpha$ -HlyA. Este corrimiento se debe a que la fluorescencia de la proteína debido a los residuos Trp es muy sensible al ambiente en el que se encuentran. Los cambios en el espectro de emisión de Trp pueden deberse a cambios conformacionales, por la asociación de una subunidad, por la unión de un sustrato o por desnaturalización, ya que estas interacciones afectan al entorno del grupo indol y su emisión es fuertemente dependiente de la polaridad de su entorno.<sup>12</sup>

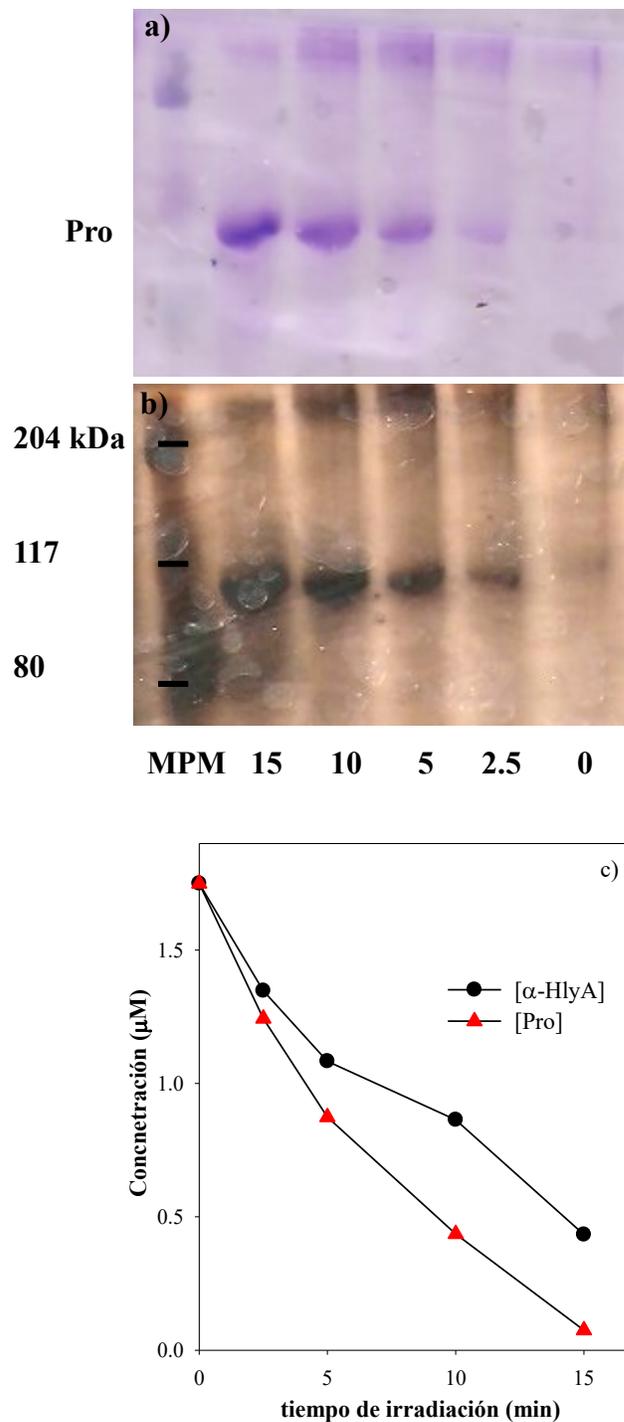
Por otro lado, el descenso de la emisión de los residuos Trp es menor (Figura 18.7.b), lo que estaría indicando que los Trp se encuentra en una posición más interna dentro de la estructura de proHlyA que en  $\alpha$ -HlyA, por lo que se fotodegradan más lentamente. Esto es esperable asumiendo un mecanismo dinámico en el cual  $^3\text{Ptr}^*$  debe chocar con un Trp. A tiempos cortos, las velocidades son iguales, lo que podría indicar que alguno de los Trp está más expuesto.



**Figura 18.7.a.** Espectros de emisión ( $\lambda_{exc} = 295$  nm) de soluciones de proHlyA y Ptr irradiadas durante distintos tiempos. **b)** Intensidad de fluorescencia relativa a 332 y 345 nm de proHlyA y HlyA, respectivamente, en función del tiempo de irradiación ( $\lambda_{exc} = 295$  nm). Condiciones de irradiación: [proHlyA] $_0$ : 1,75  $\mu$ M, [Ptr] $_0$ : 70  $\mu$ M; pH: 7,3,  $\lambda_{irr}$ = 350 nm.

### 18.2.2. Análisis electroforético

Por otro lado, se realizó el análisis electroforético (SDS-PAGE). En la Figura 18.8.a, se observa el descenso de la intensidad de la banda correspondiente a proHlyA en función del tiempo de irradiación, compatible con una alteración en su estructura. Al comparar estos resultados con los de  $\alpha$ -HlyA, se puede observar que si bien los residuos de Trp están más afectados en la toxina, el daño estructural es mayor en la proHlyA (Figura 18.8.c). Al analizar los geles con tinción de  $AgNO_3$ , a los 2,5 minutos no se observa la formación de un producto dimérico en las soluciones irradiadas de proHlyA como en el caso de lo observado para  $\alpha$ -HlyA (Figura 18.8.b), sino que se observan productos de mayor peso molecular. Este resultado sugiere que la oligomerización inducida en el proceso fotosensibilizado por Ptr se encuentra favorecida en la proHlyA, debido a que la estructura proteica influye en la velocidad de la oxidación fotoinducida de Tyr y Trp.



**Figura 18.8.** Perfil electroforético de soluciones de proHlyA irradiadas a distintos tiempos en presencia de Ptr con tinción Coomassie Blue (a) y AgNO<sub>3</sub> (b). MPM: marcador peso molecular. El tiempo de irradiación figura al pie de cada calle. c) Variación de la concentración de proHlyA y HlyA en función del tiempo de irradiación, estimada por SDS-PAGE, de los geles con tinción Coomassie Blue. Condiciones SDS-PAGE: gel *resolving* 8%, gel *stacking* 4%, volumen de siembra: 20 μl. Condiciones de irradiación: [proHlyA]<sub>0</sub>: 1,75 μM, [Ptr]<sub>0</sub>: 70 μM;  $\lambda_{irr}$ = 350.

**Bibliografía**

- <sup>1</sup> M.L. Dántola, *et.al*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **424**, 568-572, 2012.
- <sup>2</sup> S. Majd, *et.al*, *Curr. Opin. Biotechnol*, **21**, 439-476, 2010.
- <sup>3</sup> T.J. Wiles, M.A. Mulvey, *Future Microbiol*, **8**, 73-84, 2013.
- <sup>4</sup> R.A. Welch, *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 257, 85-111, 2001.
- <sup>5</sup> L. Bakas, *et.al*, *Acta Bioquím Clín Latinoam.*, **47** (2), 353-361, 2013.
- <sup>6</sup> L. Bakas, *et.al*, *Biophys. J*, **71**, 1869-1876, 1996.
- <sup>7</sup> T. Felmlee, *et.al*, *J. Bacteriol.*, **163**(1), 88-93, 1985.
- <sup>8</sup> J.P. Issartel, *et.al*, *Nature*, **351** (6329), 759-761, 1991.
- <sup>9</sup> V. Koronakis, *et.al*, *Mol Microbiol.*, **23**(3), 617-626, 1997.
- <sup>10</sup> J.M. Nieto, *et.al*, *Mol Microbiol.*, **19**(4), 705-713, 1996.
- <sup>11</sup> S.J. Cavalieri, *et.al*, *Microbiol Rev.*, **48**(4), 326-343, 1984.
- <sup>12</sup> J. R. Lakowicz, “*Principles of Fluorescence Spectroscopy*”, Tercera Edición, Springer, 2006.



## **CONCLUSIONES**



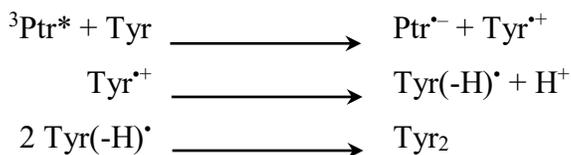
# CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de tesis doctoral se estudió la generación fotosensibilizada con pterina (Ptr) de dímeros de tirosina (Tyr<sub>2</sub>) a partir de tirosina (Tyr) y se desarrolló un método de preparación simple y económico basado en este proceso. A su vez, se investigó la fotodegradación de las formas ácida y alcalina de Tyr<sub>2</sub> bajo radiación UV-B y UV-A, respectivamente, y se estudiaron sus propiedades fotosensibilizadoras. Por otro lado, se evaluó la formación fotosensibilizada de Tyr<sub>2</sub> en dos proteínas: Ubiquitina (Ub) y Albúmina de suero humano (HSA). En estos sistemas además de la formación de Tyr<sub>2</sub> se observaron otros procesos fotosensibilizados que ocurren en forma paralela. Los dos más importantes fueron la oxidación de residuos de triptófano (Trp), para el caso de HSA y la formación de aductos covalente Ptr-proteína. Por último, para investigar si estos procesos fotosensibilizados producen efectos en la función proteica, se analizó la fotoinactivación inducida por Ptr de  $\alpha$ -Hemolisina de E. Coli ( $\alpha$ -HlyA).

A continuación se detallan las conclusiones más relevantes obtenidas durante el desarrollo de esta tesis:

## Preparación de Tyr<sub>2</sub>

- ✓ Ptr fotoinduce la formación de Tyr<sub>2</sub> bajo radiación UV-A. Se identificaron espectroscópicamente las dos especies radicalarias que participan en el mecanismo propuesto:



- ✓ Se optimizó un método para la formación fotoquímica de Tyr<sub>2</sub>, donde una solución Tyr se expone por 10 minutos a radiación UV-A, en presencia de Ptr y luego se separa el producto cromatográficamente, obteniéndose un rendimiento del 19 ( $\pm 1$ )%.
- ✓ El isómero obtenido es el o,o'-Tyr<sub>2</sub> (Figura 1) y su identificación se realizó por Espectroscopía de Masas y Resonancia Magnética Nuclear.

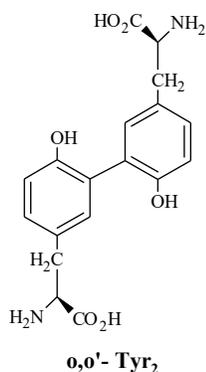


Figura 1.

### Propiedades espectroscópicas de Tyr<sub>2</sub>

- ✓ Se midieron los espectros de absorción las dos formas ácido-base de Tyr<sub>2</sub> y se determinó el pK<sub>a</sub> (7,25 (±0,05)). Sus respectivos espectros de emisión resultaron idénticos, con un máximo de emisión centrado en 410 nm, lo que indica que la especie emisora es la misma.
- ✓ Se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) para la forma ácida y alcalina en distintas atmósferas.
- ✓ Se registraron los decaimientos de emisión de fluorescencia de las soluciones acuosas de Tyr<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla:

Forma ácido-base	$\lambda_F$ (nm) (± 2)	$\Phi_F$ (O <sub>2</sub> )	$\Phi_F$ (Ar)	$\Phi_F$ (Aire)	$\tau_F$ (ns) (± 0,1)
Ácida	410	0,29(±0,02)	0,29(±0,02)	0,28(±0,02)	4,0
Básica	410	0,42(±0,02)	0,46(±0,03)	0,46(±0,02)	4,4

### Fotoquímica de Tyr<sub>2</sub>

- ✓ Las formas ácida y alcalina de Tyr<sub>2</sub> sufren fotodegradación por absorción directa radiación UV-B y UV-A, respectivamente. Los rendimientos cuánticos de fotodegradación ( $\Phi_{Tyr_2}$ ) de la forma alcalina y ácida obtenidos fueron de 0,023 (±0,003) y 0,0053 (±0,0005), respectivamente. En ausencia de O<sub>2</sub>, Tyr<sub>2</sub> es fotoestable.
- ✓ Se identificaron distintos productos de oxidación que conservan la estructura dimérica. Se encontraron al menos cuatro productos que han incorporado un

átomo de oxígeno ( $[M + O]$ ,  $[M + O - 2H]$ ) o dos átomos de oxígeno ( $[M + 2O]$ ,  $[M + 2O - 2H]$ ). Se propusieron estructuras diméricas, compuestas por una unidad de Tyr intacta y la otra unidad de Tyr oxidada o dos unidades de Tyr oxidadas. A un producto con peso molecular menor al de Tyr<sub>2</sub>, se le asignó una estructura dimérica, con un residuo de Tyr intacto y el otro ciclado.

- ✓ Se evaluó la producción de especies reactivas de O<sub>2</sub> (EROs) por Tyr<sub>2</sub>, confirmando la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, cuando la forma alcalina de Tyr<sub>2</sub> se expone a radiación UV-A. El rendimiento cuántico de generación de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ( $\Phi_{\Delta}$ ) obtenido fue de 0,15 ( $\pm$  0,05).
- ✓ Se demostró que la forma alcalina de Tyr<sub>2</sub> es capaz de fotoinducir la degradación de Tyr bajo radiación UV-A. Este resultado es interesante porque muestra que el producto de una reacción fotosensibilizada puede actuar como un fotosensibilizador intrínseco, ampliando el daño de la radiación UV en sistemas biológicos.

### **Ubiquitina**

- ✓ En presencia de O<sub>2</sub>, como consecuencia de la fotosensibilización de Ub por Ptr bajo radiación UV-A, ocurren tres procesos químicos distintos (Figura 2): una dimerización mediada por Tyr<sub>2</sub>, una fragmentación de Ub y la formación de un fotoaducto Ub-Ptr-2H.

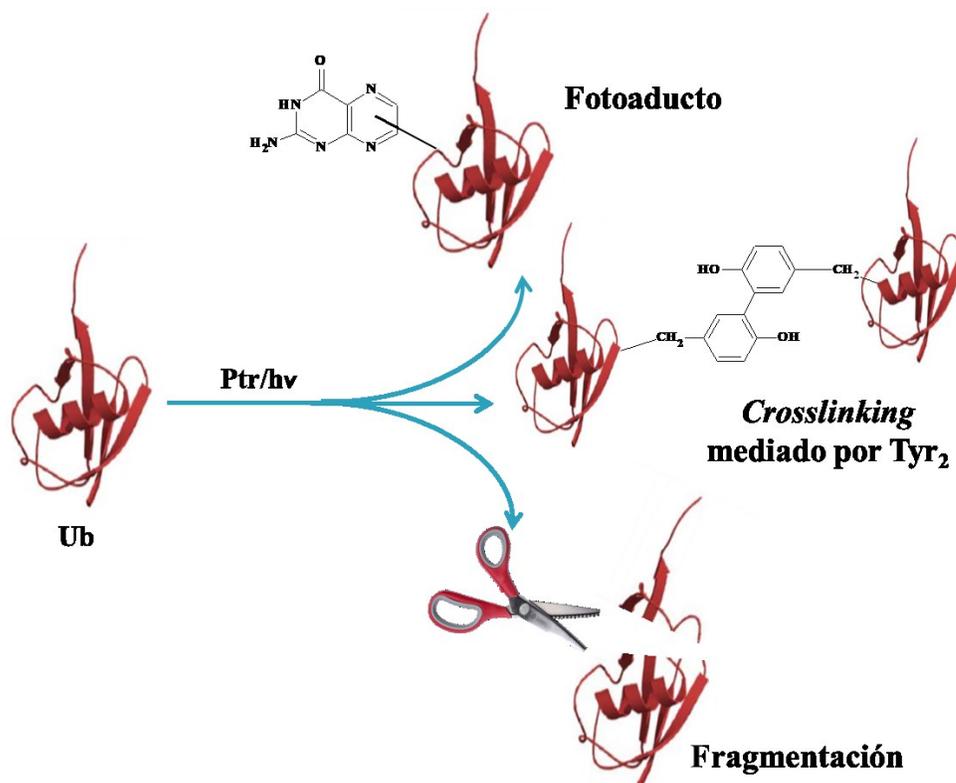


Figura 2.

- ✓ En ausencia de O<sub>2</sub>, en el proceso fotoquímico no se observa la dimerización ni la fragmentación de Ub, pero se confirma la unión covalente de Ptr a Ub, con la pérdida de dos hidrógenos, que lleva la formación de una proteína fluorescente.
- ✓ El fotoaducto Ub-Ptr-2H, generado en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, mantiene las propiedades espectroscópicas del fotosensibilizador.

#### Albúmina de suero humano

- ✓ Bajo radiación UV-A, HSA sufre daño fotoinducido por Ptr y el proceso fotosensibilizado induce cambios químicos, en al menos, dos aminoácidos: Trp y Tyr.
- ✓ El daño fotosensibilizado por Ptr lleva al entrecruzamiento de HSA y este proceso no es solo una dimerización, mediada por Tyr<sub>2</sub>, sino que implica la formación de oligómeros cuyo peso molecular va aumentando con el tiempo de irradiación.
- ✓ La estructura secundaria y terciaria de HSA no se ve afectada en el proceso fotosensibilizado.

- ✓ El único residuo de Trp se consume durante el proceso fotosensibilizado y se identificó la formación de un producto de oxidación con propiedades espectrales similares a las reportadas para N-formilquinurenina.
- ✓ Se identificó la formación de un producto con propiedades fluorescentes, que se adjudicó a la formación de un fotoaducto Ptr-HSA.

#### **$\alpha$ -Hemolisina**

- ✓ Ptr es capaz de fotoinactivar a  $\alpha$ -HlyA cuando se la expone a radiación UV-A y este proceso no se debe a la oxidación de un metal en su sitio activo.
- ✓ La degradación del Trp se observa en el descenso rápido de la intensidad de fluorescencia. La oxidación del Trp junto con la oligomerización de la toxina, mediada en parte por Tyr<sub>2</sub>, no son los responsables de la pérdida de actividad hemolítica.
- ✓ ProHlyA, la forma inactiva de  $\alpha$ -HlyA, al presentar una estructura más compacta y al no exponer ciertas regiones como consecuencia de la acilación, es más resistente al daño fotosensibilizado por Ptr. Sin embargo, la oligomerización inducida en el proceso se encuentra favorecida.