

La llum com a nova eina en farmacologia

Contingut:

Els **azobenzens** són molècules constituïdes per dos anells de benzè units a través d'un doble enllaç N=N. Aquest doble enllaç pot presentar dues geometries, i en conseqüència, tenim dos isòmers diferents: el *cis* i el *trans*. Aquests isòmers es poden interconvertir entre ells mitjançant llum d'una determinada longitud d'ona (Figura 1).

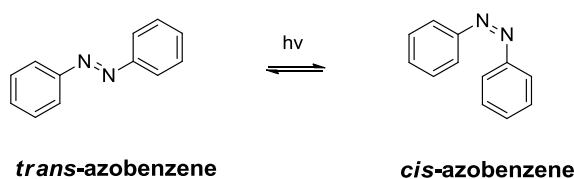


Figura 1. Reacció d'isomerització de l'azobenzè entre els estats *trans/cis*.

Aquests compostos han estat àmpliament utilitzats com a tints degut a la coloració intensa que presenten. De fet, s'ha observat que els dos isòmers poden presentar coloracions ben diferenciades. A més, els **espectres d'absorbància** que presenten els dos estats de la mateixa molècula són clarament diferents (Figura 2).

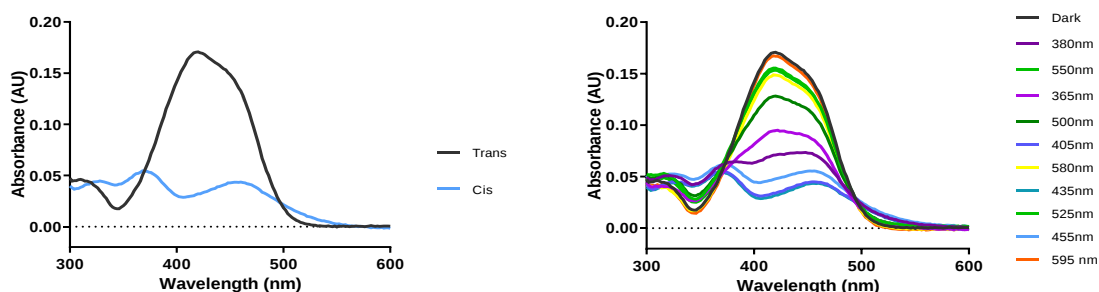


Figura 2. Espectres d'absorbància d'un azobenzè en la seva forma estable (*trans*) i excitada (*cis*).

Alhora aquests compostos s'utilitzen en un camp molt innovador i recent denominat **fotofarmacologia**. Doncs, la fotofarmacologia utilitza la llum per activar o desactivar els fotofàrmacs en cèl·lules, teixits o òrgans específics, proporcionant un alt grau de control local i temporal de l'activitat de la molècula (Figura 3). Així doncs, aquest fet la fa útil per a aplicacions terapèutiques i com a eina d'investigació. Encara que no està en fase de desenvolupament clínic, té el potencial de convertir-se en una nova teràpia en medicina. Ja que, permetria fotocontrolar de manera selectiva l'alliberació de fàrmacs en el cos humà.

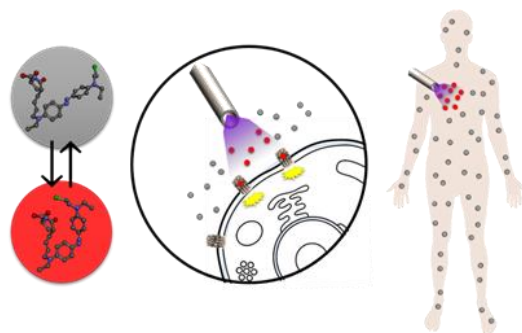


Figura 3. Funcionament dels fotofàrmacs. En un futur, el pacient ingeriria el fotofàrmac inactiu (boles grises en la figura adjunta) i aquest es distribuïria per tot el cos. Llavors, amb un dispositiu adequat s'il·luminaria el teixit o l'òrgan en el que de manera específica es vol actuar. La llum activaria el fotofàrmac (boles vermelles en la figura adjunta), de manera que faria efecte en la zona il·luminada.

Durant el desenvolupament del taller pràctic, els assistents s'endinsaran en aquest innovador món de la fotofarmacologia. Per una banda, coneixeran les característiques fotoquímiques dels **azobenzens** i alhora el seu ús en diversos camps. I per l'altra banda, estudiarem les **proteïnes** i la seva importància com a diana en diverses patologies. Per això, es durà a terme la **caracterització fotoquímica** d'un derivat d'azobenzè i un **assaig colorimètric** per conèixer la concentració proteica de les mostres.

Més informació:

web del grup: <https://www.iqac.csic.es/mcs/>

web del IQAC: <https://www.iqac.csic.es/>

Photochemical characterisation

Assay 1 using plates LED (continuous mode)

- 1) Prepare a **0.001 M solution 1** from **0.01 M stock solution (100%DMSO)** of compound X.
- 2) Prepare a 5 or 50 μM solution from **0.001 M (1 mM or 1000 μM) stock solution 1** of compound X. Prepare the following solutions:
 - Add 10 μL 0.001 M stock solution and 190 μL DMSO (condition 100% DMSO)
 - Add 1 μL 0.001 M stock solution and 199 μL DMSO (condition 100% DMSO)
 - Add 10 μL 0.001 M stock solution and 190 μL Binding buffer pH 7.5 (condition 5% DMSO in Binding buffer pH 7.5)
 - Add 1 μL 0.001 M stock solution and 199 μL Binding buffer pH 7.5 (condition 0.5% DMSO in Binding buffer pH 7.5)

Use a transparent 96-well plate to perform the assay.

- 3) Mix the samples by shaking at 250 rpm. Keep the samples in the dark.
- 4) Record the DARK absorbance spectra from 300 nm to 800 nm.
- 5) Apply a constant 380 nm light illumination 3 min at 12 V.
- 1) Record the 380 nm absorbance spectra from 300 nm to 800 nm.
- 2) Apply a constant 500 nm light illumination 3 min at 12 V.
- 3) Record the 500 nm absorbance spectra from 300 nm to 800 nm.
- 4) Apply a constant 455 nm light illumination 3 min at 12 V.
- 5) Record the 455 nm absorbance spectra from 300 nm to 800 nm.
- 6) Apply a constant 550 nm light illumination 3 min at 12 V.
- 7) Record the 550 nm absorbance spectra from 300 nm to 800 nm.

Determinación proteína hmGlu5 mediante BCA Kit

El ácido bicinconínico (BCA), sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.

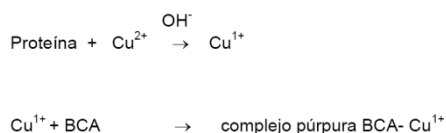


Tabla I. Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad

Método	Rango de sensibilidad (μg)	Coefficiente de extinción o Cálculo de la concentración
Métodos de Absorción		
A_{280}	100-3000	$\epsilon_{280} = 1 \text{ mL/mg cm}$
A_{205}	3-100	$\epsilon_{205} = 31 \text{ mL/mg cm}$
$A_{280} - A_{260}$	100-3000	Proteína (mg/mL) = $(1.55A_{280} - 0.76A_{260})$
$A_{235} - A_{280}$	25-700	Proteína (mg/mL) = $(A_{235} - A_{280})/2.51$
$A_{224} - A_{236}$	5-180	Proteína (mg/mL) = $(A_{224} - A_{236})/0.6$
$A_{215} - A_{225}$	2-45	Proteína ($\mu\text{g/mL}$) = $144(A_{215} - A_{225})$
Métodos Derivados Colorimétricos		
Biuret	1000-10000	$\epsilon_{545} = 0.06 \text{ mL/mg cm}$
Lowry	25-100 a 500 nm 2-30 a 660 nm 1-2 a 750 nm	Usar curva estándar
Bradford	1-15	$\epsilon_{595} = 81 \text{ mL/mg cm}$
BCA	0.5- 10	Usar curva estándar
Métodos Derivados Fluorimétricos		
o-ftalaldehído	1-5 $\lambda_{\text{excitación}}$ a 340 nm $\lambda_{\text{emisión}}$ a 475 nm	Usar curva estándar

Tabla II. Principales métodos para la cuantificación de proteínas, principales ventajas e inconvenientes

Método	Ventajas	Inconvenientes
Métodos de Absorción	No se pierden las muestras	Interfieren muchos compuestos que absorben en el UV
Métodos Derivados Colorimétricos		
Biuret	Bastante específico para proteínas Muestra pocas interferencias Es barato	Tiene poca sensibilidad
Lowry	Tiene bastante sensibilidad	No todas las proteínas reaccionan igual Muestra muchas interferencias como detergentes no iónicos, sulfato amónico etc.
Bradford	Muy sensible	Muestra interferencias con detergentes
BCA	Es el método mas sensible Es el que muestra menos interferencias	
Métodos Derivados Fluorimétricos		
o-ftalaldehído	Muy sensible	La interferencia de aminas contaminantes en la muestra No todas las muestras reaccionan igual

Listado del material necesario

- Tubos de ensayo o placa 96
- Pipetas de automáticas regulables de 20-100 μl y de 200-1000 μl
- Espectrofotómetro
- Agua destilada o MiliQ
- Soluciones estándar de proteína
- Reactivo de BCA

Método de BCA

- Preparar las diferentes diluciones de la recta patrón (BSA) y de las muestras problemas según la siguiente tabla:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	20 μ L H ₂ O MiliQ 0 mg/mL	20 μ L H ₂ O MiliQ 0 mg/mL	0	0	0	0				
B	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L C1 - 20 μ L dío final 0.03 mg/mL	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L C2 - 20 μ L dío final 0.03 mg/mL	1/64	1/64	1/64	1/64				
C	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L D1 0.06 mg/mL	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L D2 0.06 mg/mL	1/32	1/32	1/32	1/32				
D	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L E1 0.125mg/mL	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L E2 0.125mg/mL	1/16	1/16	1/16	1/16				
E	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L F1 0.25 mg/mL	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L F2 0.25 mg/mL	1/8	1/8	1/8	1/8				
F	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L G1 0.5 mg/mL	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L G2 0.5 mg/mL	1/4	1/4	1/4	1/4				
G	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L H1 1 mg/mL	20 μ L H ₂ O MiliQ + 20 μ L H2 1 mg/mL	1/2	1/2	1/2	1/2				
H	40 μ L BSA 2 mg/mL	40 μ L BSA 2 mg/mL	nontransf	nontransf	transf	transf				

- Añadir 100 μ L Mix BCA a cada pocillo (para 1 mL = 500 μ L A + 480 μ L B + 20 μ L C).
- Incubar 30 min a 37 °C.
- Leer Absorbancia a 562 nm frente al blanco.
- Representar la curva estándar y mirar valores de las muestras problema.