

QUÍMICA DE LA FOTOSENSIBILIZACIÓN POR FÁRMACOS

1. INTRODUCCION.

Los fármacos que actualmente utilizamos han sido diseñados para el tratamiento de las enfermedades y son, en general, seguros y eficaces; sin embargo, con bastante frecuencia también dan lugar a la aparición de determinados efectos secundarios, que conviene tener en cuenta para poderlos evitar o reducir en lo posible. En todo caso, lo que importa es elegir la mejor alternativa entre varios fármacos disponibles para el mismo tratamiento y llegar a una dosificación y a unas condiciones de uso que minimicen los efectos no deseados, optimizando la relación beneficio / riesgo.

Entre los efectos secundarios asociados al uso de fármacos, los procesos de fotosensibilización se están describiendo de forma cada vez más frecuente. Consisten en la aparición de diferentes tipos de lesiones cutáneas (quemaduras solares exageradas, ampollas, erupciones, eczemas, etc) en pacientes tratados que se han expuesto a la luz solar. Típicamente, ni el fármaco ni la exposición solar por separado, a las mismas dosis, son capaces de producir estas reacciones cutáneas adversas.^{1,2}

La acción fotosensibilizante de los fármacos puede desencadenar efectos no inmediatos, debidos a la modificación química de biomoléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos. Por ejemplo, la unión fotoquímica covalente a proteínas está en el origen de los fenómenos de fotoalergia, mientras que el daño fotosensibilizado al ADN (oxidación, formación de dímeros de timina, etc.) puede conducir a la aparición de tumores. Existen muchos casos documentados de fotoalergia mediada por fármacos; sin embargo, todavía no se ha demostrado en ningún caso la fotocarcinogenicidad de fármacos en humanos (aunque sí en modelos animales). Por su gravedad, esta posibilidad es la que actualmente resulta más preocupante.

Todavía no se han establecido relaciones estructura / actividad que permitan predecir la aparición de este tipo de efectos secundarios. Sin embargo, entre los fármacos más fotoactivos están los antiinflamatorios no esteroideos, en especial los ácidos 2-arilpropiónicos



Miguel A. Miranda

Departamento de Química/Instituto de
Tecnología Química UPV-CSIC
Universidad Politécnica de Valencia
Avenida de los Naranjos s/n
46022-Valencia
mmiranda@qim.upv.es

(ver **Figura 1**). También se han descrito efectos similares en las fluoroquinolonas antibacterianas. Otras familias de fármacos fotosensibilizantes son las tetraciclinas, los fibratos, las benzodiazepinas, las fenotiazinas, las sulfamidas, etc.³

2. UNA APROXIMACIÓN MECANÍSTICA

Cuando un fármaco absorbe luz solar se promueve a un estado excitado singlete. Tras cruce intersistemático se puede alcanzar también un estado excitado triplete. Las reacciones químicas unimoleculares, para dar fotoproductos estables (de fragmentación, isomerización, ciclación, etc.), pueden ocurrir desde cualquiera de los dos estados, mientras que las bimoleculares suelen ser reacciones de triplete, ya que la difusión requiere mayores tiempos de vida. En muchos casos están implicadas especies de existencia transitoria (p. ej., radicales) como intermedios reactivos. El oxígeno atmosférico puede interactuar con los tripletes o con diferentes intermedios, generando oxígeno singlete y otras especies activas del oxígeno. Tanto los estados excitados como los fotoproductos estables, los intermedios reactivos o las especies activas de oxígeno pueden ser mediadores del daño a biomoléculas (lípidos, proteínas o ácidos nucleicos), participando en la etapa clave de los procesos de fotosensibilización.

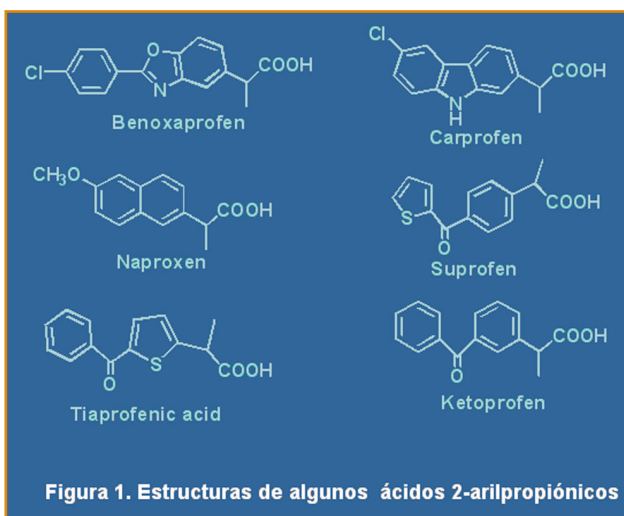


Figura 1. Estructuras de algunos ácidos 2-arilpropiónicos

Por tanto, es de gran relevancia aclarar la naturaleza de los cromóforos responsables, la multiplicidad de los estados excitados implicados, la estructura de los intermedios reactivos, las reacciones fotoquímicas que tienen lugar y las interacciones más importantes en las que están implicadas las biomoléculas diana.

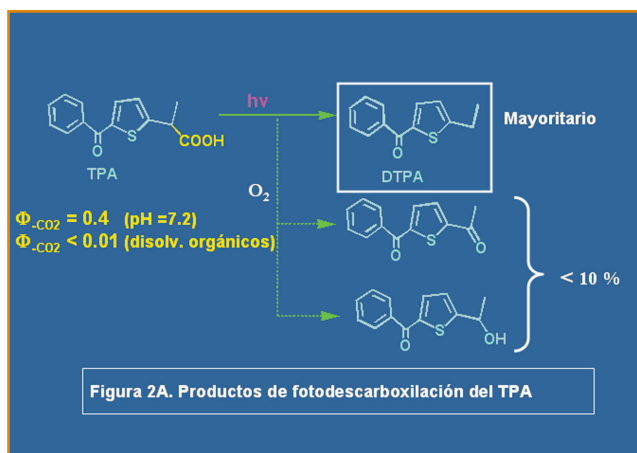
Sobre esta base, una aproximación mecanística a la fotosensibilización por fármacos debe constar idealmente de las siguientes etapas:

- Estudios fotoquímicos: fotoestabilidad, aislamiento e identificación de fotoproductos, racionalización mecanística.
- Estudios fotofísicos: espectros de absorción y emisión (fluorescencia), fotólisis de destello láser (observación directa de tripletes, radicales, etc.), detección y cuantificación de oxígeno singlete.
- Estudio de las interacciones fármaco-biomolécula: propiedades fotofísicas en las sitios de unión, modificaciones fotosensibilizadas (daño oxidativo, formación de aductos covalentes).

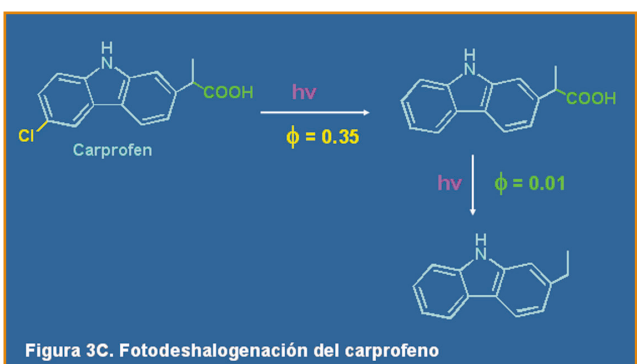
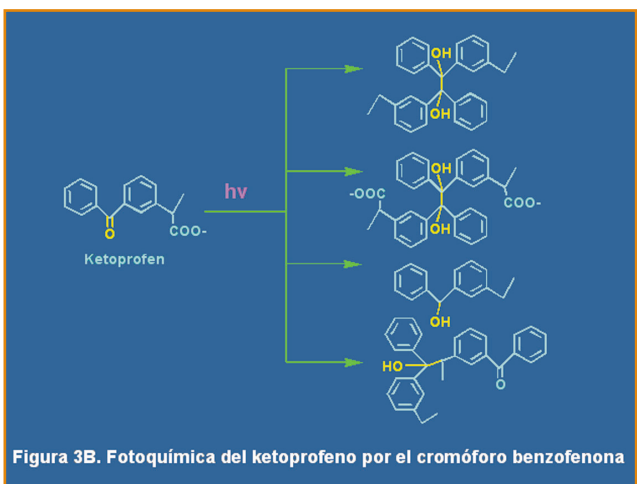
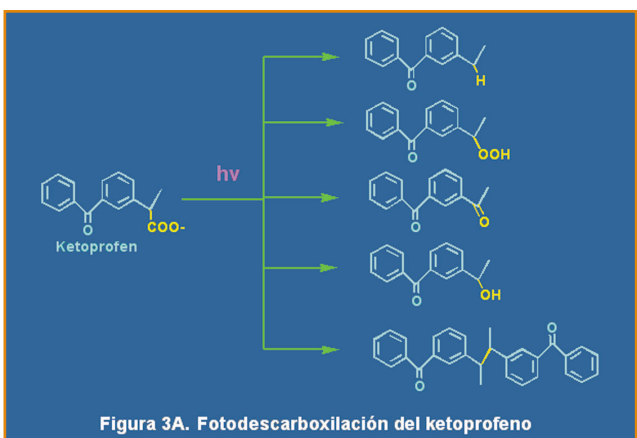
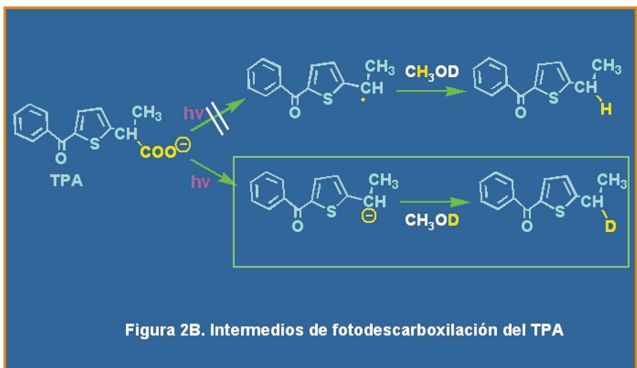
3. FOTOQUÍMICA DE FÁRMACOS

Como se ha dicho en la introducción, los ácidos 2-arilpropiónicos antiinflamatorios son un grupo modelo para estudiar la fotosensibilización por fármacos. Por ello, a partir de ahora tomaremos este grupo como ejemplo para ilustrar la metodología a seguir.

En general, los ácidos 2-arilpropiónicos sufren descarboxilación al ser irradiados. Un caso concreto (el del ácido tiaprofénico, TPA) puede verse en la **Figura 2A**. En atmósfera inerte, el único producto que se forma es el derivado con cadena lateral tipo etilo (DTPA). En presencia de oxígeno también se forman en pequeña proporción una cetona y un alcohol. El rendimiento cuántico de fotodescarboxilación es mucho mayor en medio acuoso tamponado que en disolventes orgánicos; ello se debe a que el ión carboxilato reacciona de manera más eficiente que el ácido carboxílico libre. El hecho de que el fotoproducto DPTA incorpore deuterio (y no hidrógeno) al irradiar el carboxilato en CH₃OD (**Figura 2B**) indica que el intermedio es un carbanión bencílico.⁴



En algunos casos ocurren reacciones fotoquímicas competitivas. Por ejemplo, el ketoprofeno, además de productos de descarboxilación (**Figura 3A**) da lugar a otros que se explican por la reactividad típica del cromóforo benzofenona (**Figura 3B**).^{4,5} Algo parecido le ocurre al carprofeno, en el que la deshalogenación



ocurre con una eficiencia 30-40 veces mayor que la descarboxilación (**Figura 3C**).⁶

4. ESTUDIOS FOTOFÍSICOS

El estado excitado más relevante en los procesos de fotosensibilización es el triplete de más baja energía (T_1). Por su tiempo de vida relativamente largo (del orden de microsegundos o mayor) puede participar en procesos intermoleculares, dando lugar a las principales interacciones con oxígeno y/o con biomoléculas. Esta duración también hace posible su detección directa mediante técnicas de fotólisis de destello láser con resolución temporal de nanosegundos, así como el estudio de su reactividad bajo diferentes condiciones experimentales.

La **Figura 4** (izquierda) muestra los espectros de absorción transitoria obtenidos cuando el TPA se fotoliza a 355 nm, transcurridos dos tiempos distintos después del pulso del láser.⁷ A tiempos cortos la especie detectada es el estado excitado triplete (T_1 , de naturaleza $n\pi^*$), con máximos de absorción a ca. 380 y 630 nm, mientras que a tiempos más largos se observa el espectro del anión descarboxilado, en el que la banda en la zona visible ha desaparecido prácticamente. Además de confirmar mediante una evidencia directa el mecanismo de la **Figura 2B**, este experimento indica que la fotodescarboxilación ocurre desde el triplete, ya que su desaparición va asociada a la formación del intermedio aniónico. De hecho, mediante fotólisis de destello láser del DTPA (que posee el mismo cromóforo de 2-benzoiltiofeno pero carece de la función ácido carboxílico)⁸ sólo se observa la absorción triplete-triplete, que tiene un tiempo de vida más largo por su menor reactividad (**Figura 4**, derecha). Estudios

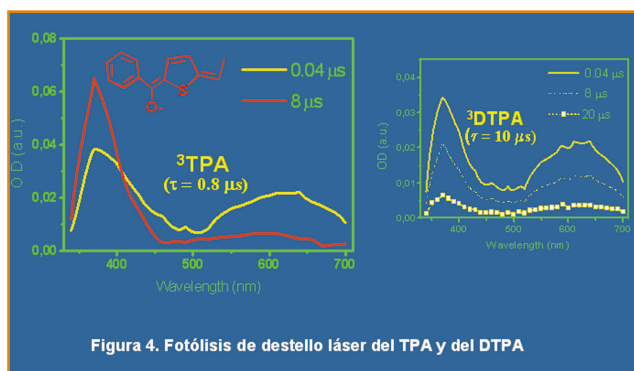


Figura 4. Fotólisis de destello láser del TPA y del DTPA

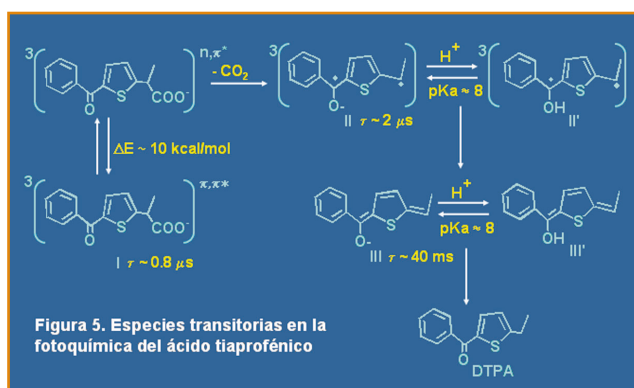


Figura 5. Especies transitorias en la fotoquímica del ácido tiaprofenico

fotofísicos más detallados sobre el TPA, a diferentes tiempos, han permitido detectar todos los intermedios de reacción (**Figura 5**), entre los que se encuentran un triplete superior (T_2 , de naturaleza $\pi\pi^*$) y el anión descarboxilado en su estado excitado.⁷

El oxígeno reacciona con el estado excitado T_1 del TPA a velocidad próxima a la de difusión (k ca. $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). El resultado es la producción de oxígeno singlete (rendimiento cuántico 0.62 en disolventes orgánicos, frente a 0.22 en medio acuoso neutro), que se detecta mediante su emisión en el infrarrojo cercano a 1270 nm.⁹

5. FOTOPEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La lisis de la membrana, que tiene como resultado la muerte celular, puede ocurrir como consecuencia de la peroxidación de los lípidos que la componen. Los fármacos pueden actuar como fotosensibilizadores en este proceso a través de dos mecanismos: Tipo I (vía radicales) y Tipo II (a través de oxígeno singlete).

El TPA es un potente agente fotohemolítico, que fotosensibiliza eficientemente la peroxidación del ácido linoleico (LA).¹⁰ Esta reacción se puede seguir de manera sencilla mediante la aparición en el espectro UV de una banda a 233 nm, característica de los dienos conjugados (**Figura 6**). Mediante fotólisis de destello láser se ha comparado la reactividad del TPA en su estado T_1 con el LA y con oxígeno, para determinar si el mecanismo de la reacción es Tipo I o Tipo II. Las constantes de velocidad de todos los procesos relevantes se indican en la **Figura 7**; de ellas se deduce que en el caso del TPA ambos mecanismos contribuyen de forma similar.¹¹ Esta conclusión contrasta con la obtenida para la benzofenona (ver también datos en **Figura 7**), que a pesar de ser un cromóforo análogo opera casi exclusivamente a través de un mecanismo radicalario (Tipo I), debido a que su T_1 es de naturaleza $n\pi^*$.¹²

6. REACCIONES FOTOSENSIBILIZADAS DE PROTEÍNAS

Las proteínas pueden sufrir reacciones fotoquímicas en presencia de fármacos que actúen como sensibilizadores. Continuando con el mismo ejemplo, se ha

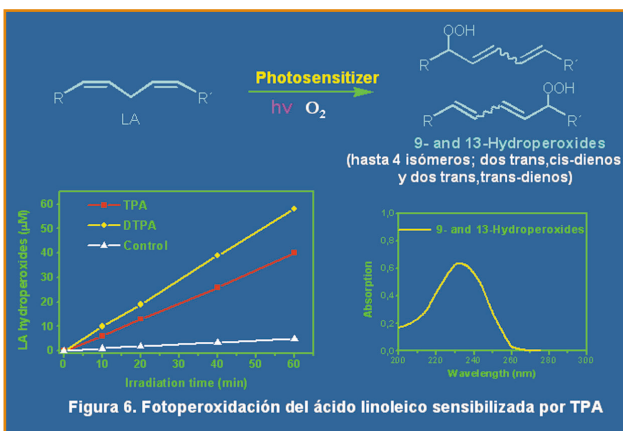
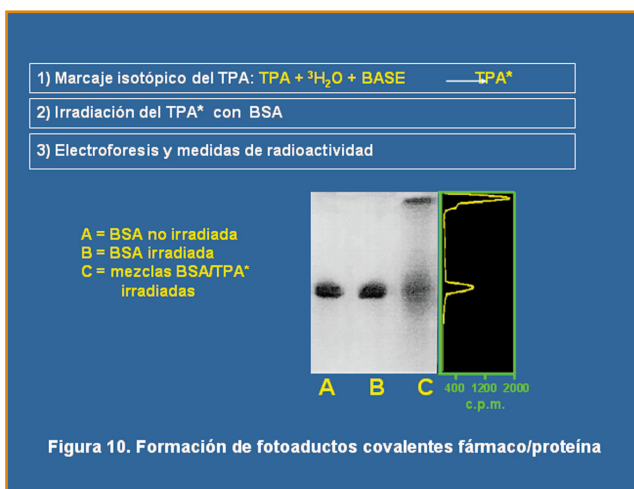
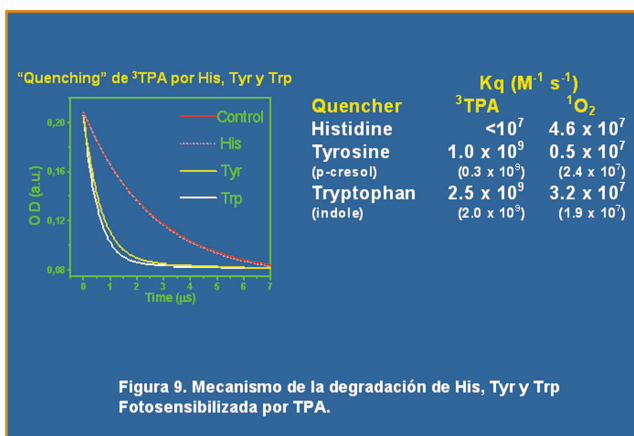
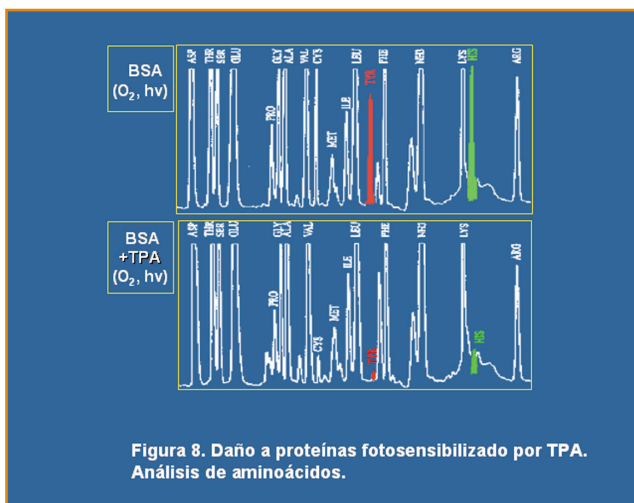
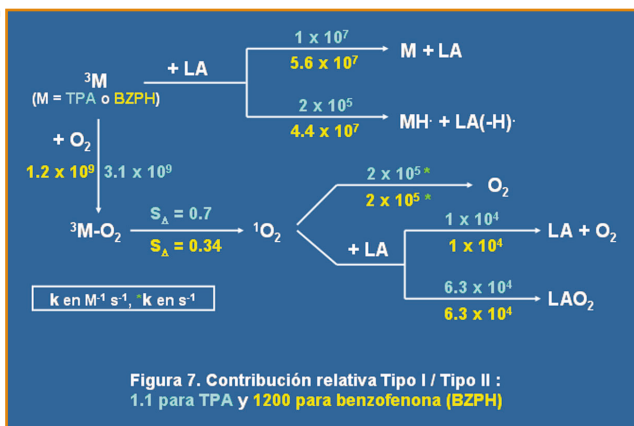


Figura 6. Fotoperoxidación del ácido linoleico sensibilizada por TPA



descrito que la irradiación de albúmina sérica bovina (BSA) en presencia de TPA conduce a la fotodegradación oxidativa de algunos aminoácidos tales como la tirosina (Tyr), la histidina (His) y el triptófano (Trp).¹³ Esto resulta evidente cuando se analiza, después de hidrolizar la proteína, el perfil de aminoácidos de una muestra irradiada en condiciones aeróbicas y se compara con controles irradiados en las mismas condiciones, pero en ausencia de TPA (Figura 8). El Trp se destruye en estas condiciones; sin embargo, su desaparición se puede seguir fácilmente mediante los espectros de fluorescencia de la proteína sin hidrolizar. Los resultados obtenidos con BSA se han confirmado en experimentos realizados con los aminoácidos aislados, tanto a nivel de fotodegradación como mediante fotólisis de destello láser.

Así, el triplete del TPA (cuya absorción T-T se muestra en la Figura 4) sufre desactivación ("quenching") por Tyr y Trp, pero no por His. Ello se aprecia claramente en las cinéticas de desaparición ("decay") que se muestran en la Figura 9. Por otra parte, el oxígeno singlete reacciona más rápidamente con Trp y His que con Tyr. Un tratamiento cuantitativo de todas las constantes de velocidad obtenidas (tabla de la Figura 9) permite llegar a la conclusión de que en la Tyr predomina la fotooxidación Tipo I, en la His la Tipo II y en el Trp los dos mecanismos contribuyen de manera similar.¹³ Estudios llevados a cabo con fenoles e indoles (como modelos de Tyr y Trp), tanto en estado estacionario como mediante técnicas de resolución temporal, han mostrado que se produce transferencia formal de hidrógeno, para dar radicales fenoxi o indolilo, junto con el radical cetilo derivado del TPA. El mecanismo implica transferencia electrónica acoplada con transferencia protónica.¹⁴

Pero los fármacos no solamente son capaces de fotosensibilizar procesos oxidativos en proteínas, sino que también pueden dar lugar a fotoaductos covalentes ("photobinding"). Estos fotoaductos se han detectado mediante marcaje isotópico con ³H.^{13,15} Así, la Figura 10 muestra la incorporación del fármaco a todas las fracciones que contienen proteína, en una muestra de BSA que se ha sometido a irradiación en presencia de TPA marcado, seguida de análisis mediante electroforesis y medidas de radioactividad. Otra forma de detectar los fotoaductos covalentes es mediante anticuerpos diseñados específicamente para reconocer subestructuras presentes en el fármaco (epitopos).^{16,17} Los fotoaductos actúan como antígenos y su formación constituye el primer paso para que se produzcan efectos fotoalérgicos.

7. DAÑO FOTOQUÍMICO AL ADN

La genotoxicidad fotosensibilizada por fármacos ha atraído bastante atención, ya que puede implicar una importante expansión de la fracción del espectro solar con potencial carcinogénico. Ello es debido a que los cromóforos presentes en los fármacos son capaces de absorber luz con longitudes de onda más largas que los ácidos nucleicos.

El daño fotosensibilizado al ADN celular se ha puesto claramente de manifiesto mediante el ensayo "Comet", cuyos resultados con el TPA se pueden ver en la **Figura 11**. Cuando las células se irradian en presencia del fármaco, el ADN se fragmenta y migra al realizar una electroforesis; como consecuencia, aparecen unas manchas con forma de cometa. En la figura se ve con claridad que es necesaria la acción combinada de la luz y el fármaco, ya que en los controles donde falta alguno de los dos factores no se observan cometas. Mediante el uso de enzimas de reparación (Fpg, Endo III, Endo V, etc.) se ha demostrado que los mecanismos de daño al ADN son múltiples, implicando tanto oxidación de guaninas y timinas como formación de dímeros de timina.¹⁸

Se han llevado a cabo estudios fotoquímicos con los nucleósidos aislados, para obtener información sobre el tipo de productos que pueden formarse al oxidarse las bases del ADN. Por ejemplo, en la **Figura 12** se pueden ver los resultados obtenidos al irradiar timidina (Thd) en presencia de TPA; todos ellos se pueden explicar a través del catión radical de Thd como un intermedio común.¹⁸

En el caso de la desoxiguanosina (dGuo) también se forman productos de oxidación. La velocidad de reacción es mayor en este caso, lo que se explica porque su potencial de oxidación es menor. Además, estudios mediante fotólisis de destello láser han puesto de manifiesto que la dGuo reacciona con el estado excitado triplete del TPA con una constante de velocidad k ca. $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que la Thd lo hace más lentamente (k ca. $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹⁸

8. ESTEREODIFERENCIACIÓN

Muy frecuentemente, la actividad farmacológica es estereoselectiva, debido a que los receptores implicados y las moléculas mensajeras biológicas son quirales. Ello ha justificado la sustitución progresiva de un gran número de fármacos racémicos por sus formas enantioméricamente puras ("racemic switching"). Para evaluar la posible conveniencia de una sustitución de este tipo se debe tener en cuenta que los efectos secundarios también pueden ser estereoselectivos. La situación ideal se produce cuando el enantiómero activo es el menos tóxico, pero a menudo no ocurre así.

Los ácidos 2-arilpropiónicos antiinflamatorios tienen un centro quiral. Aunque su actividad farmacológica es estereoselectiva, la mayor parte de ellos todavía se emplean como mezclas racémicas, con algunas excepciones como el S-naproxeno y el S-ketoprofeno. Se han estudiado las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de una serie de diadas constituidas por un ácido 2-arilpropiónico y una subestructura quiral presente en los lípidos, las proteínas o los ácidos nucleicos, como modelos simplificados de los sistemas fármaco / biomolécula. En varios casos se ha encontrado que la

reactividad de los estados excitados depende notablemente de la configuración del fármaco.¹⁹⁻²⁴

Recientemente se ha estudiado la interacción entre el carprofeno (S y R) y la albúmina sérica humana (HSA) mediante fotólisis de destello láser. El análisis de los resultados obtenidos ha demostrado que existen dos tipos distintos de tripletes para cada enantiómero, con diferentes tiempos de vida. Esta observación se ha correlacionado con la existencia de dos diferentes sitios de unión (I y II) en la HSA (**Figura 13**). La estereodiferenciación es mayor en el sitio I, que es donde está el único Trp de esta proteína y donde se inicia la reacción fotoquímica por transferencia electrónica desde este aminoácido al TPA en su estado excitado. La reactividad fotoquímica (fotodeshalogenación) en estado estacionario está de acuerdo con los resultados obtenidos mediante técnicas de resolución temporal.²⁵

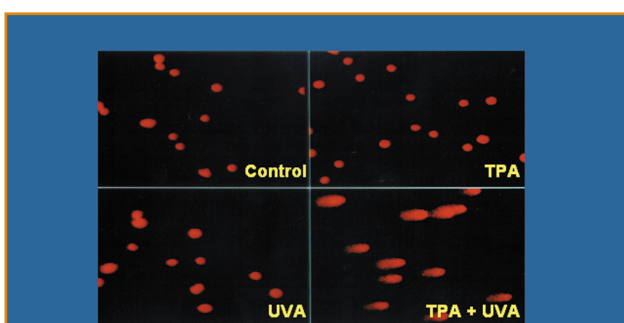


Figura 11. Daño al ADN celular fotosensibilizado por TPA (Ensayo "Comet")

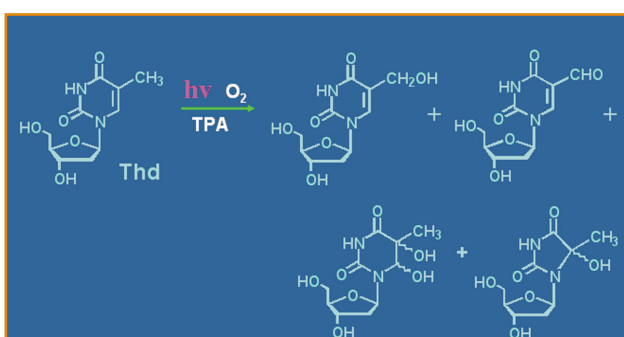


Figura 12. Productos de fotooxidación de timidina sensibilizados por TPA

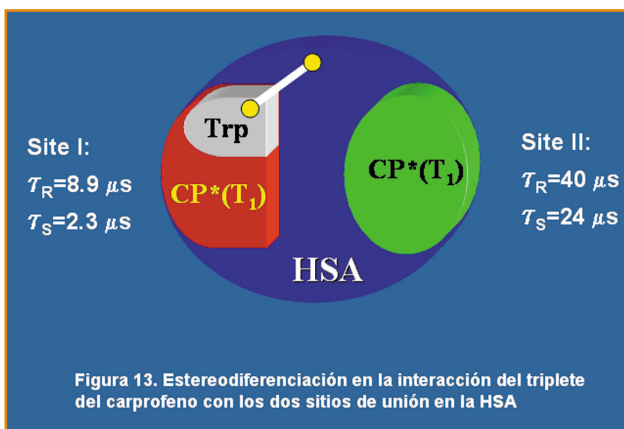


Figura 13. Estereodiferenciación en la interacción del triplete del carprofeno con los dos sitios de unión en la HSA

9. CONCLUSIONES

Una aproximación mecanística al estudio de los procesos de fotosensibilización por fármacos conduce a la identificación de los cromóforos responsables, los estados excitados implicados, las biomoléculas diana y las

reacciones fotoquímicas que pueden tener lugar. Además, permite anticipar una posible esterodiferenciación en el caso de fármacos quirales. Todo ello puede contribuir a una mejor comprensión de estos procesos y al establecimiento de relaciones estructura / actividad predictivas.

REFERENCIAS

1. M. A. Miranda "Phototoxicity of Drugs" in "In vitro Methods in Pharmaceutical Research", Eds. J. V. Castell and M. J. Gómez-Lechón, Academic Press, London, 1997, Capter 13, pp. 289-315.
2. M. A. Miranda. "Photosensitization by drugs". *Pure Appl. Chem.* **73**, 481 (2001).
3. H. Spielmann, W. W. Lovell, E. Hölzle, B. E. Johnson, T. Maurer, M. A. Miranda, W. J. W. Pape, O. Sappora, D. Sladowski "In vitro phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop-2", ATLA, *Alternatives to Laboratory Animals* **22**, 314 (1994).
4. F. Boscá, M. L. Marín, M. A. Miranda. "Photoreactivity of the non-steroidal anti-inflammatory 2-arylpropionic acids with photosensitizing side effects". *Photochem. Photobiol.* **74**, 637 (2001).
5. F. Boscá, M. A. Miranda, G. Carganico, D. Mauleón "Photochemical and photobiological properties of ketoprofen associated with the benzophenone chromophore", *Photochem. Photobiol.* **60**, 96 (1994).
6. F. Boscá, S. Encinas, P. F. Heelis, M. A. Miranda "Photophysical and photochemical characterization of a photosensitizing drug. A combined steady state photolysis and laser flash photolysis study on carprofen", *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 820 (1997).
7. S. Encinas, M. A. Miranda, S. Monti "Transient species in the photochemistry of tiaprofenic acid and its decarboxylated photoproduct", *Photochem. Photobiol.* **68**, 633 (1998).
8. J. V. Castell, M. J. Gómez-Lechón, D. Hernández, L. A. Martínez, M. A. Miranda "Molecular bases of drug phototoxicity: photosensitized damage by the major photoproduct of tiaprofenic acid", *Photochem. Photobiol.* **60**, 586 (1994).
9. D. de la Peña, C. Martí, S. Nonell, L. A. Martínez, M. A. Miranda "Time-resolved near infrared studies on singlet oxygen production by the photosensitizing 2-arylpropionic acids", *Photochem. Photobiol.* **65**, 828 (1997).
10. A. Samadi, L. A. Martínez, M. A. Miranda, I. M. Morera. "Mechanism of lipid peroxidation photosensitized by tiaprofenic acid: product studies using linoleic acid and 1,4-cyclohexadienes as model substrates". *Photochem. Photobiol.* **73**, 359 (2001).
11. F. Boscá, M. A. Miranda, I. M. Morera, A. Samadi. "Involvement of Type I and Type II mechanisms in the linoleic acid peroxidation photosensitized by tiaprofenic acid". *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* **58**, 1 (2000).
12. F. Boscá, M. A. Miranda "Photosensitizing drugs containing the benzophenone chromophore (Invited Review)", *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* **43**, 1 (1998).
13. M. A. Miranda, J. V. Castell, Z. Sarabia, D. Hernández, M. J. Gómez-Lechón, I. M. Morera "Drug-photosensitized protein modification: identification of the reactive sites and elucidation of the reaction mechanism with tiaprofenic acid/albumin as model system", *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 172 (1998).
14. J. Pérez-Prieto, F. Boscá, R. E. Galian, A. Lahoz, L. R. Domingo, M. A. Miranda. "Photoreaction between 2-benzoylthiophene and phenol or indole". *J. Org. Chem.* **68**, 5104 (2003).
15. M. A. Miranda, J. V. Castell, M. J. Gómez-Lechón, D. Hernández, L. A. Martínez "Photobinding of drugs to cells as an indicator of potential photoallergy", *Toxicol. in vitro* **9**, 499 (1995).
16. M. A. Miranda, Z. Sarabia, D. Hernández, I. M. Morera, M. J. Gómez-Lechón, J. V. Castell. "An in vitro approach to drug photoallergy: Use of drug-directed antibodies to assess photobinding of non-steroidal anti-inflammatories to skin cells". *Toxicol. in vitro* **13**, 701 (1999).
17. A. Lahoz, D. Hernández, M. A. Miranda, J. Pérez-Prieto, I. M. Morera, J. V. Castell. "Antibodies directed to drug epitopes to investigate the structure of drug-protein photoadducts. Recognition of a common photobound substructure in tiaprofenic acid/ketoprofen cross-photoreactivity". *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1486 (2001).
18. C. Agapakis-Caussé, F. Boscá, J. V. Castell, D. Hernández, M. L. Marín, L. Marrot, M. A. Miranda. "Tiaprofenic acid-photosensitized damage to nucleic acids: A mechanistic study using complementary in vitro approaches". *Photochem. Photobiol.* **71**, 499 (2000).
19. M. A. Miranda, A. Lahoz, R. Martínez-Máñez, F. Boscá, J. V. Castell, J. Pérez-Prieto. "Enantioselective discrimination in the intramolecular quenching of an excited state aromatic ketone by a ground state phenol". *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11569 (1999).
20. M. A. Miranda, A. Lahoz, F. Boscá, M. R. Metni, F. B. Abdelouahab, J. V. Castell, J. Pérez-Prieto. "Regio- and stereoselectivity in the intramolecular quenching of the excited benzoylthiophene chromophore by tryptophan". *Chem. Commun.* 2257 (2000).
21. M. A. Miranda, L. A. Martínez, A. Samadi, F. Boscá, I. M. Morera. "Stereoselective intramolecular hydrogen abstraction by a chiral benzophenone derivative". *Chem. Commun.*, **280** (2002).
22. F. Boscá, I. Andreu, I. M. Morera, A. Samadi, M. A. Miranda. "Chiral discrimination in the intramolecular abstraction of allylic hydrogens by benzophenone triplets". *Chem. Commun.* 1592 (2003).
23. U. Pischel, S. Abad, L. R. Domingo, F. Boscá, M. A. Miranda. "Diastereomeric differentiation in the quenching of excited states by hydrogen donors". *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 2531 (2003).
24. J. Perez-Prieto, A. Lahoz, F. Boscá, R. Martínez-Manez, M.A. Miranda. "Stereo-differentiation in the decay of triplets and biradicals involved in intramolecular hydrogen transfer from phenols or indoles to aromatic ketones". *J. Org. Chem.* **69**, 374 (2004).
25. V. Lhiaubet-Vallet, Z. Sarabia, F. Boscá, M. A. Miranda "Human serum albumin-mediated stereodifferentiation in the triplet state behavior of (S)- and (R)-carprofen" *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9538 (2004).