



Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR-CONICET-UNLP), 120 N° 1465 (1900) La Plata, Argentina.

Correo electrónico de contacto: carojanetsi@quimica.unlp.edu.ar

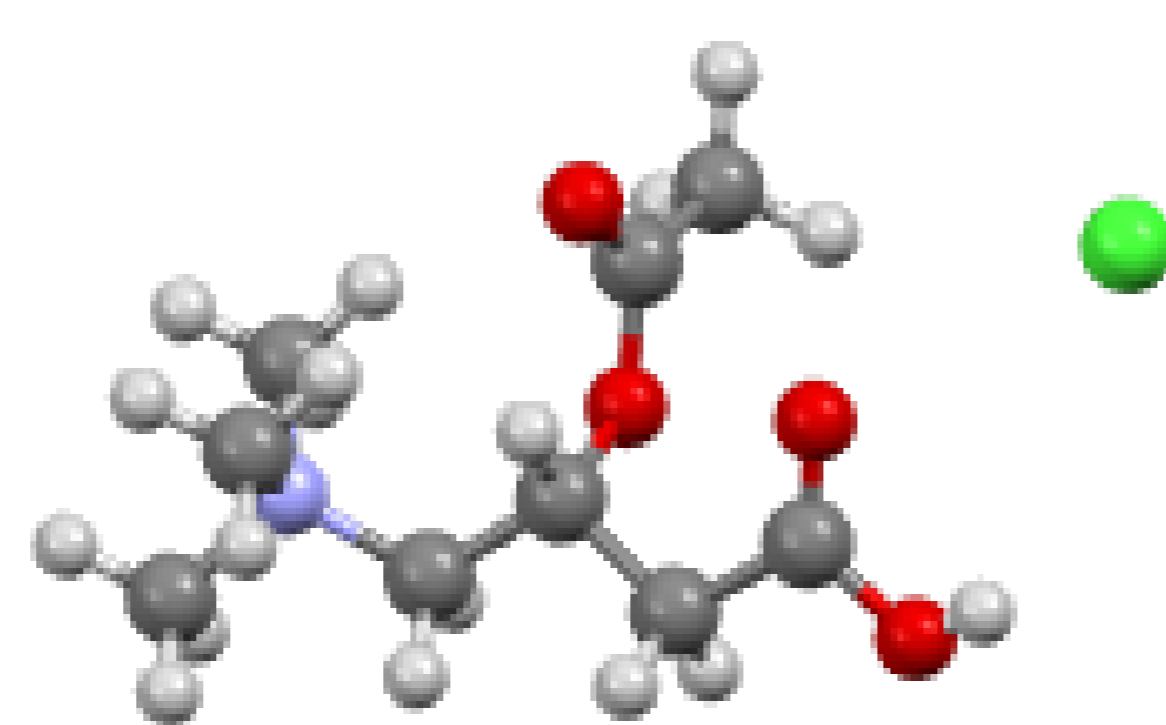
Introducción

La acetil-L-carnitina (ALC) es un derivado acetilado de la L-carnitina involucrada en el metabolismo energético, presentando además propiedades antioxidantes, neuroprotectoras y angiogénicas y modulando neurotransmisores cerebrales como la acetilcolina, la serotonina y la dopamina. Actualmente, han sido reportados resultados positivos del estudio de ALC en la diabetes, depresión, Alzheimer, y enfermedades cardiovasculares, entre otras afecciones. A fin de profundizar los estudios acerca de las posibles actividades biológicas de este compuesto, se realizaron estudios *in vitro* de actividad antitiroidea. En general, los fármacos antitiroideos pueden controlar la sobreproducción de las hormonas tiroideas por los siguientes mecanismos de acción: 1) formando complejos donante-aceptor de electrones muy estables con el iodo molecular de la glándula tiroidea, 2) inhibiendo a la enzima tiroideo-peroxidasa (TPO) probablemente coordinándose al centro metálico de la misma, 3) eliminando el sustrato agua oxigenada con la finalidad de impedir la formación de la forma oxidada de la TPO.

Materiales y métodos

Análisis teórico vibracional

Se obtuvo la geometría optimizada de ALC a partir de una estructura de partida obtenida por difracción de rayos X con las herramientas proporcionadas por el paquete de programas de Gaussian 09 y haciendo uso de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).



CCDC: 126038

La geometría se calculó con el método híbrido conocido como B3LYP y se utilizaron las bases de Pople de calidad 6-311+(2d,p). Se calcularon las frecuencias vibracionales en el infrarrojo y Raman con el mismo nivel de teoría. Los datos obtenidos del cálculo de frecuencias se procesaron con el programa VEDA.

Determinación de la Actividad Biológica

Interacción con Iodo

Se registraron los espectros de una mezcla una solución de iodo (400 μM) y ALC (40-2000 μM) en una celda espectrofotométrica termostata a 25°C, a fin de observar la formación de un nuevo complejo de transferencia de carga.

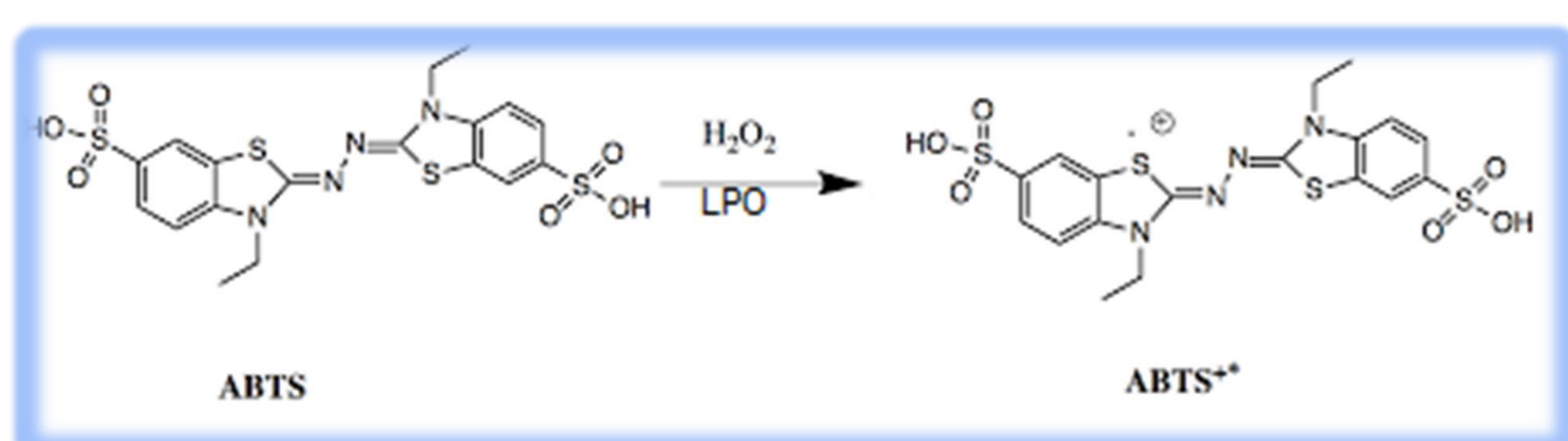
Se realizó una titulación espectrofotométrica iodo-ALC. Se procedió a hallar la constante de formación, entre la especie en estudio y el iodo. Para determinar esta interacción se usó el Método de Lang:

$A_0 = [\text{iodo}]$, $D_0 = [\text{ALC}]$
 $d_c = \text{absorbancia}$,
 $\epsilon_c = \text{coeficiente de extinción molar}$
 $K_c = \text{constante de formación del complejo}$.

$$[A_0][D_0]/d_c = ([A_0] + [D_0] - d_c/\epsilon_c) / \epsilon_c + 1/(K_c \epsilon_c)$$

Inhibición de la enzima lactoperoxidasa (LPO)

Se utilizó una técnica espectrofotométrica basada en la determinación del producto de la oxidación del ABTS a 411 nm. Se incubó la mezcla de reacción (LPO bovina - ALC 5-50 μM , - H_2O_2) en buffer fosfato pH=6 a 25°C. La reacción comienza con la adición del sustrato ABTS. La actividad enzimática se expresa como el porcentaje observado en ausencia de inhibidores.



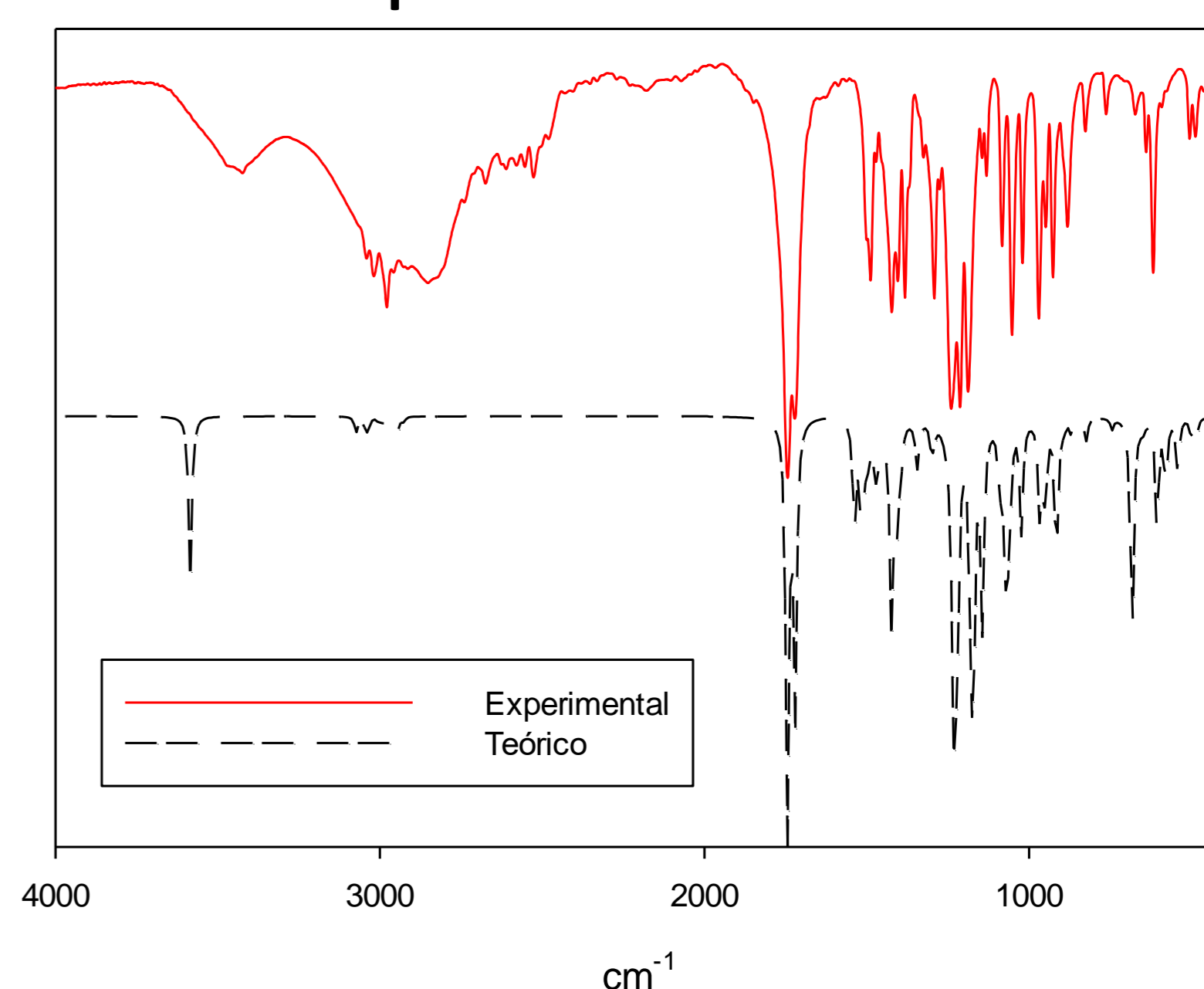
Resultados y discusión

| Experimental FTIR (cm-1) | Raman (cm-1) | Teórico cm-1 (escalado) | Asignaciones /PED $\geq 10\%$ |
|--------------------------|--------------|-------------------------|--|
| 3438 a,d | | 3584 | vOH(100) |
| 1743 mf | 1725 | 1745 | vOC(86) |
| 1721 mf | 1713 | 1720 | vOC(87) |
| 1489 f | 1485 | 1514 | $\delta\text{HCH}(56) + \tau\text{HCNC}(15)$ |
| 1423 f | 1419 | 1424 | $\tau\text{HCOC}(12) + \tau\text{HCOC}(13)$ |
| 1404 f | 1407 | 1409 | $\delta\text{HCO}(24) + \delta\text{HCC}(11) + \delta\text{HCH}(41)$ |
| 1383 f | | 1397 | $\delta\text{HCO}(25) + \delta\text{HCC}(16) + \delta\text{HCH}(37)$ |
| 1293 f | 1289 | 1300 | $\delta\text{HOC}(12) + \delta\text{HCC}(13) + \tau\text{HCOC}(15)$ |
| 1188 f | 1189 | 1175 | vOC(30) + $\delta\text{HOC}(22)$ |
| 970 f | 967 | 966 | vNC(43) |
| 949 m | 945 | 953 | vNC(49) |
| 763 d | 759 | 744 | vNC(78) |
| 673 d | 670 | 683 | $\tau\text{HOCC}(82)$ |
| 618 f | 614 | 606 | $\delta\text{CCO}(21) + \omega\text{OCOC}(43)$ |

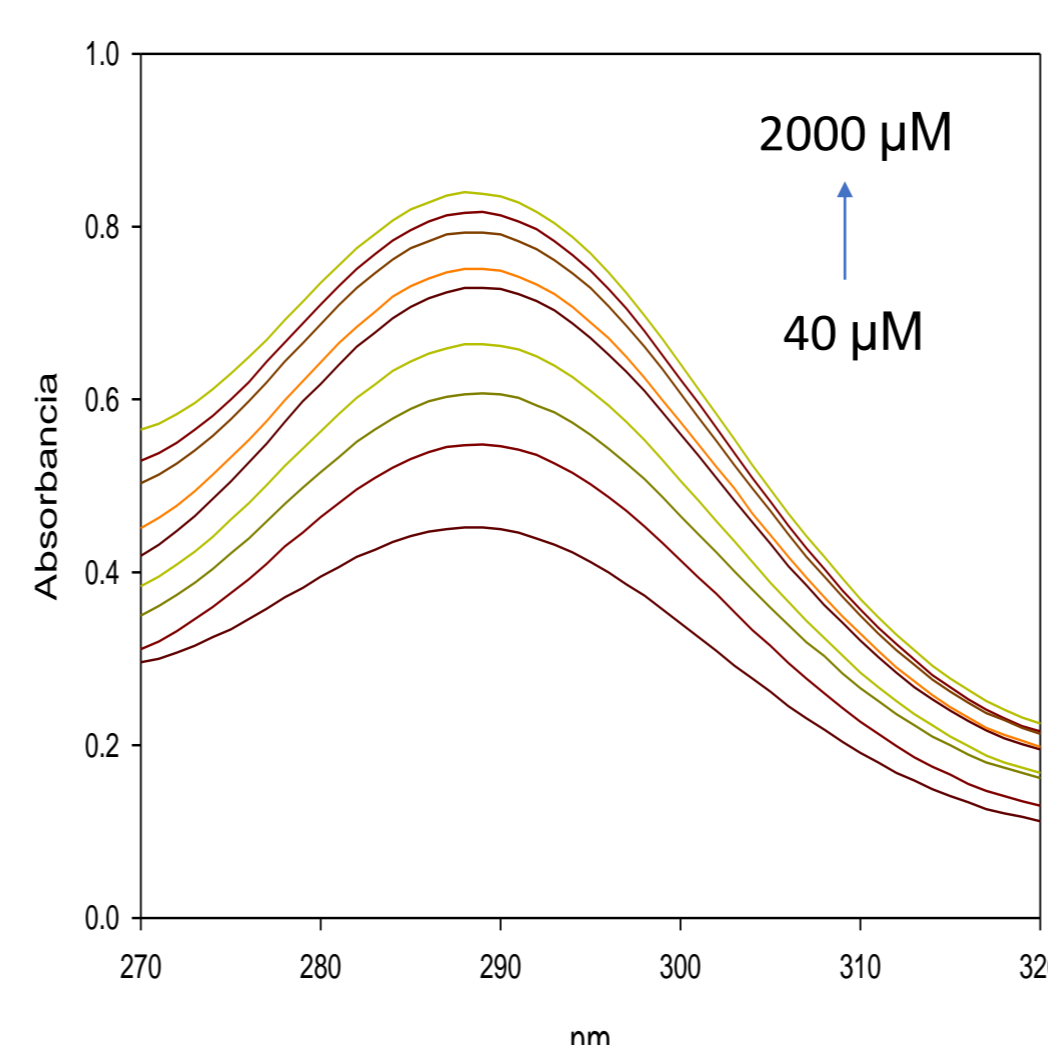
mf=muy fuerte, f=fuerte, m=medio, d=débil, a=ancha

*Escala: 0,97, Rango: 4000-1700nm

Espectro FT-IR ALC

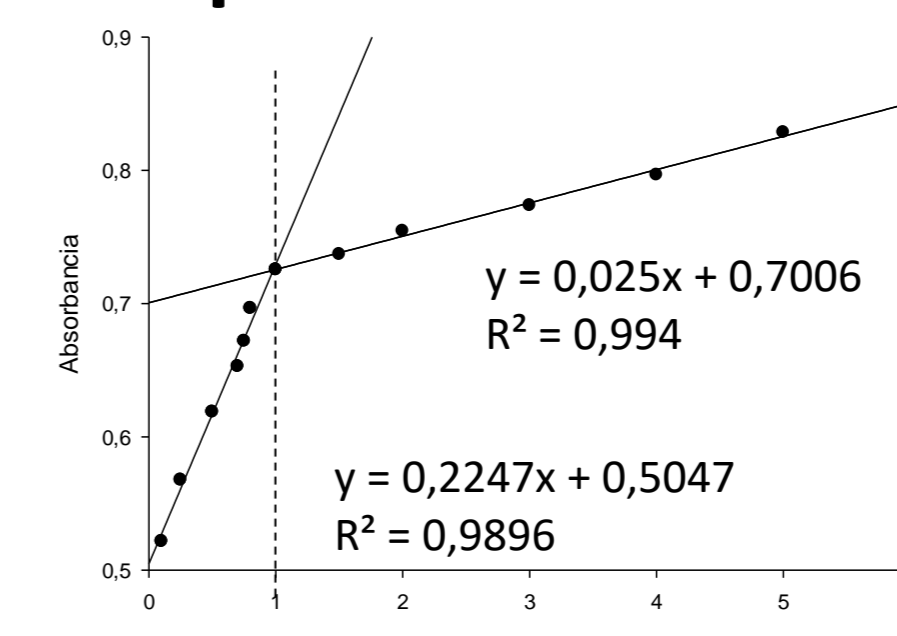


Interacción con Iodo

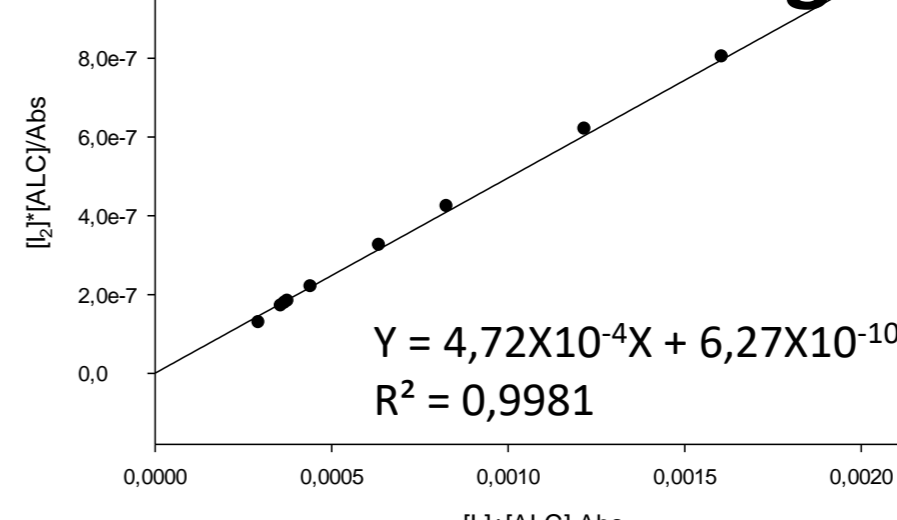


[Iodo] = 400 μM , [ALC] = 0, 40, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1200, 1600 y 2000 μM

Titulación espectrofotométrica



Método de Lang

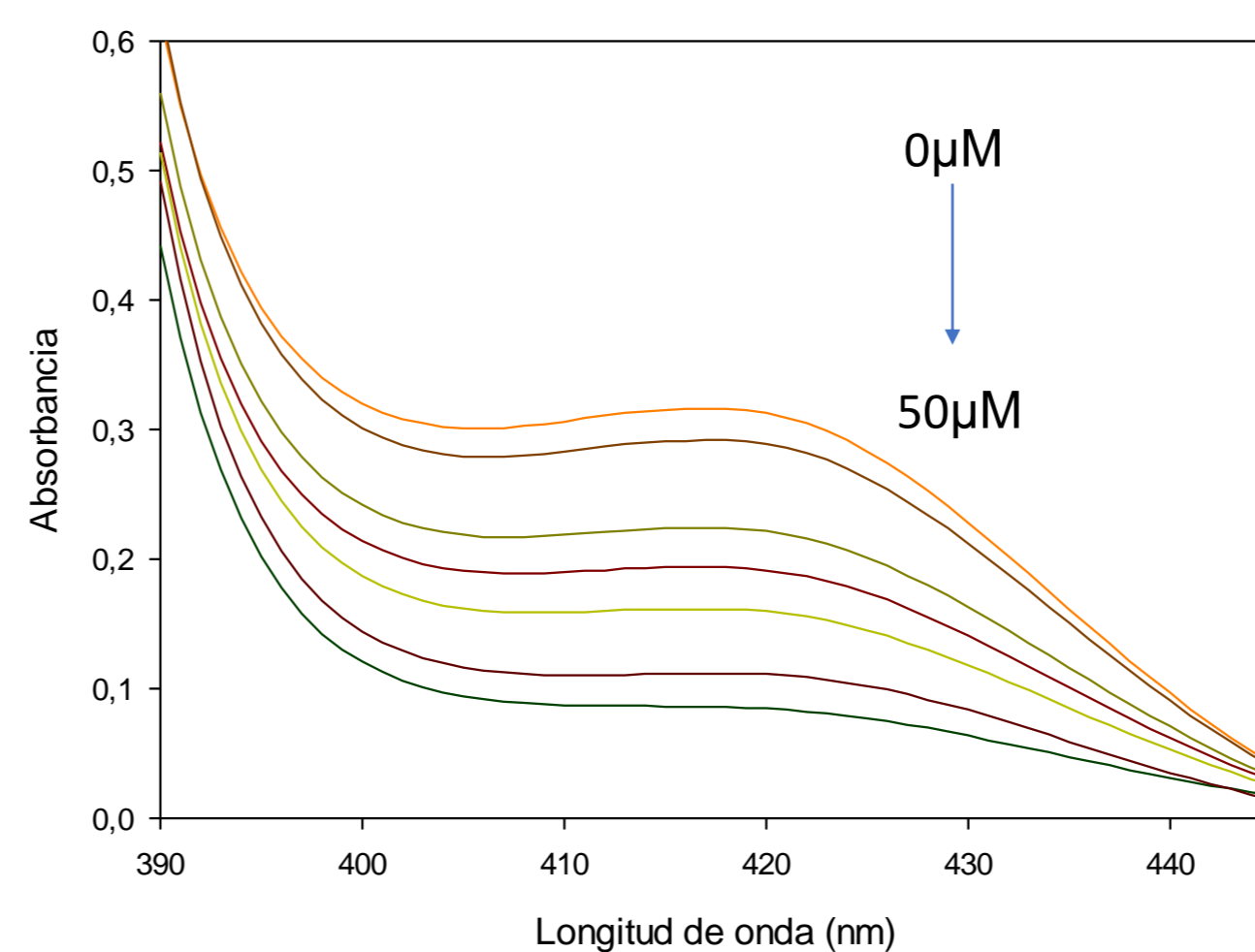


A partir de la gráfica del método de Lang se obtiene una línea recta con pendiente $1/\epsilon_c$ y ordenada al origen de $1/(K_c \epsilon_c)$.

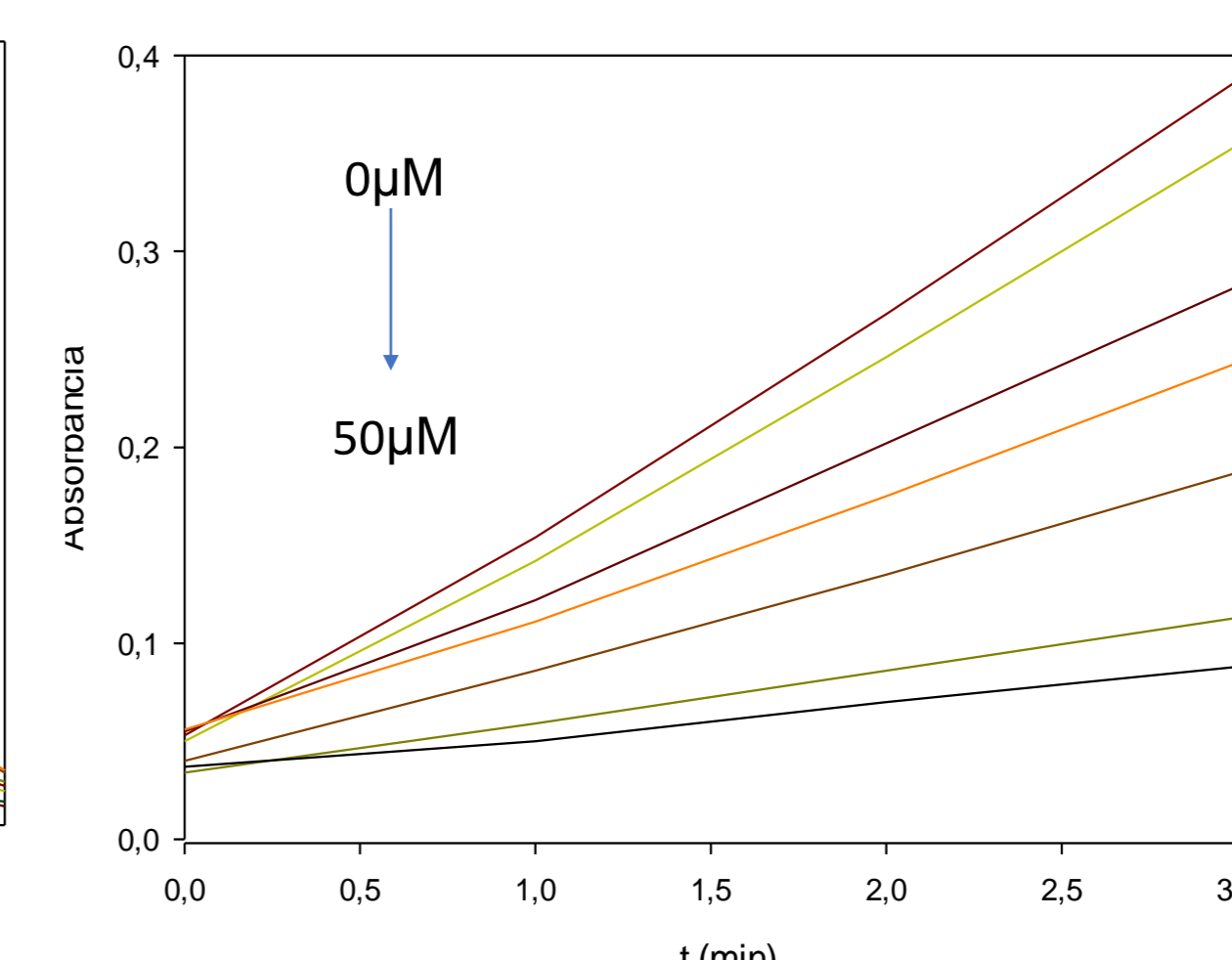
| Parametro | Valor |
|---|---------------------|
| $\epsilon^\circ \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ | $1996,78 \pm 67,90$ |
| $K_c \times 10^5 \text{M}^{-1}$ | $8,07 \pm 0,32$ |
| $\Delta G^\circ (\text{KJ/mol})$ | $-33,69 \pm 0,24$ |

Se observa la formación de un nuevo complejo de transferencia de carga, evidenciándose en el aumento de intensidad de la banda del iodo en 288 nm.

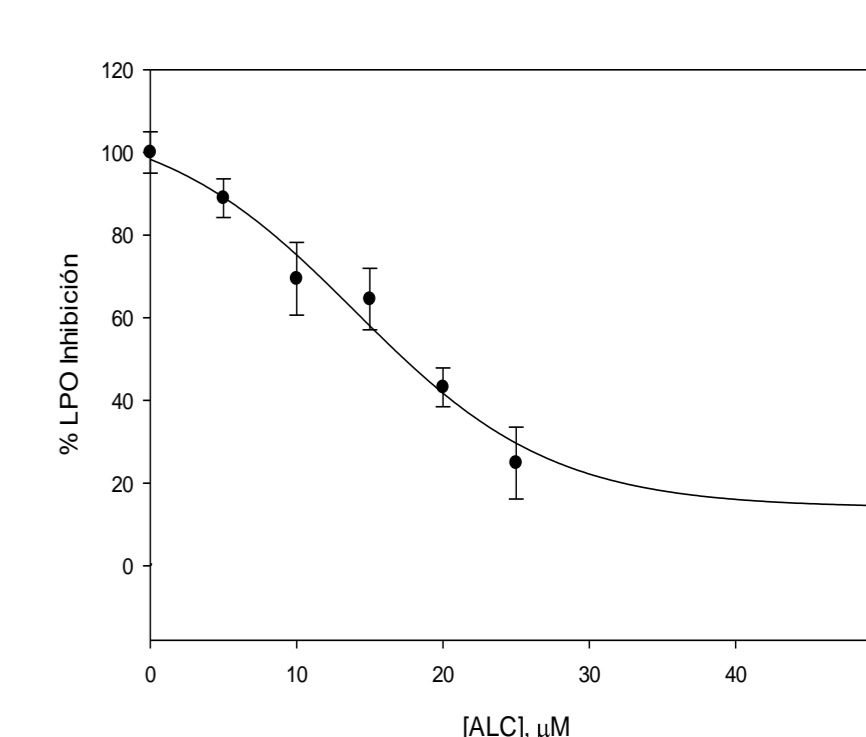
Inhibición de la LPO bovina



[LPO]=12,9nM, H_2O_2 =28,7 μM , [ABTS]=1,4mM y [ALC]=0, 5, 10, 15, 20, 25 y 50 μM



[LPO]=12,9nM, H_2O_2 =28,7 μM , [ABTS]=1,4mM y [ALC]=0, 5, 10, 15, 20, 25 y 50 μM



$\text{IC}_{50} 17,60 \pm 0,76 \mu\text{M}$.

A medida que aumenta la concentración de inhibidor, disminuye la formación del radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, debido al efecto inhibitorio de la ALC sobre la enzima LPO.

Conclusiones

- Los cálculos teóricos permitieron realizar la asignación de los modos vibracionales más importantes de la ALC.
- De las observaciones experimentales se puede destacar el comportamiento dual mostrado por la acetil-L-carnitina, ya que por un lado actúa capturando al iodo ($K_c = 8,07 \pm 0,32 \times 10^5 \text{M}^{-1}$) y por otro inhibiendo a la enzima LPO ($\text{IC}_{50} = 17,6 \pm 0,76 \mu\text{M}$), por tanto, se puede proponer como un potencial agente antitiroideo.

Referencias

- [1] Efimova, E. V.; Guskova, T. A.; Kopelevich, V. M.; Gunar, V. I. Pharm. Chem. J., 2002, 36, 111-115.
 [2] Traina, G. Front Biosci. 2016, 21, 1314-1329..