



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**“ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE ENZIMAS
QUE REGULAN LA GLICEMIA Y EFECTO
ANTIOXIDANTE DE UNA SERIE NUEVA DE
CUMARINAS SINTÉTICAS”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al
grado de Doctora en Ciencias Farmacéuticas por:**

CATALINA PAZ FIGUEROA BENAVIDES

Directores de tesis:

Dra. Carla Delporte Vergara

Dr. Claudio Olea Azar

Santiago, Chile
2018

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis dos directores de tesis, la profesora Carla Delporte y el profesor Claudio Olea por toda la confianza y ayuda brindada durante el desarrollo de este trabajo, estoy muy agradecida de ambos por el apoyo, acogida y cariño demostrado durante estos años. También agradezco a Paola, David y todos mis compañeros del lindo grupo de trabajo del Laboratorio de Productos Naturales, por sus palabras incondicionales, consejos, el tiempo brindado y los buenos momentos, tengo muchas lindas instancias compartidas con todos ustedes que recordaré por siempre y espero que sigan siendo más. Les doy las gracias a Mauricio y Michel por la ayuda brindada en los experimentos de actividad antioxidante, por su paciencia y por la buena disposición que tuvieron siempre conmigo. También agradezco al profesor Gerald Zapata y a Montserrat por enseñarme y ayudarme con los aspectos computacionales del proyecto; por la bienvenida y por la cercanía que me entregaron siempre.

Agradezco enormemente a toda mi familia -hermanos, sobrinos, tíos, Nona- por apoyarme y acompañarme durante este y muchos otros procesos. Agradezco sobre todo y de manera muy especial a mis amados padres, María Alejandra y Enrique, ambos me han enseñado y formado desde siempre; gracias a su compañía y amor incondicional he logrado cumplir con todos mis desafíos, espero que entiendan lo agradecida que estoy y que estaré siempre de ustedes.

Les doy las gracias a mis grandes amigos y a mi amado compañero de vida, Fabrizio, por ser todos tan incondicionales, han estado junto a mi siempre; gracias por las alegrías, amor y experiencias, sin ustedes todo sería mucho más difícil y son todos muy importantes para mi.

Finalmente agradezco a todos los que me han ayudado a crecer y convertirme en una persona más íntegra.

FINANCIAMIENTO

La investigación de esta tesis fue financiada gracias a las siguientes becas:

- Beca Facultad, Facultad de Ciencias Químicas Farmacéuticas de la Universidad de Chile.
- Beca Doctorado Nacional de CONICYT
- Apoyo de Gastos Operacionales de CONICYT
- Beca de Pasantía de CONICYT

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	ii
TABLA DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Marco Teórico.....	1
1.1.1. Antecedentes de diabetes mellitus tipo dos.....	1
1.1.2. Receptor de insulina y su cascada de señalización	2
1.1.3. Enzimas que participan en el control de la glicemia.....	4
1.1.4. Cinética de inhibición enzimática	10
1.1.5. Cumarinas y sus efectos en el control glicémico y en el estrés oxidativo	13
1.1.5.1. Cumarinas	13
1.1.5.2. Actividad de las cumarinas frente al control glicémico	14
1.1.5.3. Actividad antioxidante de las cumarinas.....	16
1.1.5.4. Antecedentes de la serie de cumarinas a estudiar	17
1.2. Serie de cumarinas a estudiar.....	19
1.3. Hipótesis.....	23
1.4. Objetivos	24
1.4.1. Objetivo General	24
1.4.2. Objetivos Específicos.....	24
2. METODOLOGÍA	25

2.1. Selección de las muestras a estudiar.....	25
2.2. Inhibición enzimática <i>in vitro</i>	26
2.2.1. Ensayo de inhibición de α -glucosidasa.....	26
2.2.2. Ensayo de inhibición de GPa.....	27
2.2.3. Ensayo de inhibición de la PTP-1B.....	30
2.3. Cinética de Inhibición enzimática.....	32
2.3.1. Para α -glucosidasa.....	33
2.3.2. Para GPa.....	33
2.3.3. Para PTP-1B.....	33
2.4. Análisis computacional mediante Docking.....	34
2.4.1. Para α -glucosidasa.....	34
2.4.2. Para GPa.....	35
2.4.3. Para PTP-1B.....	35
2.5. Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	35
2.5.1. Ensayo ORAC-FL.....	35
2.5.2. Ensayo de resonancia paramagnética electrónica (EPR).....	37
2.6. Actividad antioxidante celular (AAC).....	39
2.7. Análisis estadístico.....	40
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
3.1. Ensayo preliminar de inhibición de la actividad enzimática sobre α -glucosidasa y GPa.....	41
3.2. Estudios frente a α -glucosidasa.....	45
3.2.1. Ensayo de inhibición de la actividad de α -glucosidasa.....	45
3.2.2. Cinética de inhibición enzimática de la α -glucosidasa.....	48
3.2.3. Estudio computacional por Docking de dos sitios de unión de los inhibidores de la α -glucosidasa.....	53

3.3. Estudios frente a glicógeno fosforilasa a (GPa)	59
3.3.1. Ensayo de inhibición de la actividad de GPa.....	60
3.3.2. Cinética de inhibición enzimática de GPa	62
3.3.3. Estudio computacional por Docking de la GPa	65
3.4. Estudios frente a tirosina fosfatasa 1B	76
3.4.1. Ensayo de inhibición de la actividad de PTP-1B.....	76
3.4.2. Cinética de inhibición enzimática frente PTP-1B.....	80
3.4.3. Estudio computacional por Docking de unión de los inhibidores al sitio catalítico y sitio alostérico de la PTP-1B	84
3.5. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> frente a radical peroxilo, ORAC-FL	91
3.6. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> frente a radical hidroxilo, EPR.....	95
3.6.1. EPR no catalítico	95
3.6.2. EPR fotolítico	98
3.7. Actividad antioxidante celular (AAC).....	100
4. CONCLUSIONES	105
5. PROYECCIONES.....	107
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cascada de señalización del receptor de insulina	3
Figura 2. Acción de la α -glucosidasa sobre los oligosacáridos	4
Figura 3. Acción de la GPa sobre el glicógeno	6
Figura 4. Acción de la Tirosina fosfatasa-1B	8
Figura 5. Representación del gráfico Lineweaver-Burk.....	10
Figura 6. Tipos de inhibición enzimática	12
Figura 7. Núcleo básico de cumarinas.....	13
Figura 8. Sustituyentes comunes a cumarinas con actividades antidiabéticas demostradas	25
Figura 9. Fundamento químico para el ensayo de inhibición de α -glucosidasa.....	26
Figura 10. Fundamento químico para el ensayo de inhibición de GPa	28
Figura 11. Fundamento químico para el ensayo de inhibición de PTP-1B	30
Figura 12. Porcentaje de inhibición de la actividad de α -glucosidasa.....	41
Figura 13. Porcentaje de inhibición de la actividad de GPa.....	42
Figura 14. Porcentajes de inhibición de la actividad de α -glucosidasa vs concentración (μ M) del inhibidor.....	45
Figura 15. CI_{50} de los inhibidores para α -glucosidasa y análisis estadístico	47
Figura 16. Gráficos de Lineweaver-Burk para la acarbosa y las cumarinas frente a la α -glucosidasa	52
Figura 17. Sitios de unión para los inhibidores estudiados mediante docking en α -glucosidasa .	52
Figura 18. Interacciones observadas entre algunas cumarinas y la α -glucosidasa	57
Figura 19. Representación en 2D de las interacciones desarrolladas por la acarbosa en el sitio activo de α -glucosidasa.....	59
Figura 20. Porcentajes de inhibición de la actividad de GPa vs concentración (μ M) del inhibidor.....	60
Figura 21. CI_{50} de los inhibidores de GPa y análisis estadístico	61
Figura 22. Gráficos de Lineweaver-Burk para la cafeína y las cumarinas.....	64
Figura 23. Bolsillos estudiados mediante docking en GPa	61
Figura 24. Interacciones observadas en el sitio catalítico de GPa.....	64
Figura 25. Interacciones observadas en el sitio alostérico de GPa	71
Figura 26. Interacciones observadas en el sitio de interfaz dimérica de GPa	73

Figura 27. Interacciones observadas en el sitio inhibidor de GPa.....	75
Figura 28. Porcentajes de inhibición de PTP-1B vs concentración (μ M) del inhibidor.....	77
Figura 29. CI_{50} de los inhibidores de la actividad de la PTP-1B y análisis estadístico	79
Figura 30. Gráficos de Lineweaver-Burk para el ortovanadato sódico y las cumarinas.....	84
Figura 31. Sitios de unión de los inhibidores en la PTP-1B mediante docking	84
Figura 32. Interacciones observadas en el sitio catalítico de PTP-1B.....	84
Figura 33. Interacciones observadas en el sitio alostérico de PTP-1B	84
Figura 34. Decaimiento de la fluorescencia de la fluoresceína en presencia del trolox.....	92
Figura 35. Decaimiento de fluorescencia y ecuaciones lineales obtenidas por CUM 11 y CUM 16	92
Figura 36. Índices ORAC-FL y análisis estadístico	93
Figura 37. Resultados de EPR no catalítico y análisis estadístico.....	96
Figura 38. Espectro de resonancia de espín electrónica obtenido en EPR no catalítico	98
Figura 39. Resultados de EPR fotolítico y análisis estadístico.....	99
Figura 40. Fundamento del ensayo AAC	101
Figura 41. Porcentajes de actividad antioxidante celular y análisis estadístico	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo de inhibición de α -glucosidasa.....	27
Tabla 2. Protocolo de inhibición de GPa.....	29
Tabla 3. Protocolo de inhibición de PTP-1B.....	31
Tabla 4. Protocolo del ensayo ORAC-FL	36
Tabla 5. Protocolo del ensayo EPR no catalítico.....	38
Tabla 6. Protocolo del ensayo EPR fotolítico.....	39
Tabla 7. Concentración inhibitoria cincuenta (CI_{50}) de las muestras frente a α -glucosidasa	46
Tabla 8. Valores de V_{max} y K_m de los inhibidores de la actividad de α -glucosidasa	49
Tabla 9. Energías de afinidad de las cumarinas para los sitios SCAT y sitio 2 de α -glucosidasa	54
Tabla 10. Potencia inhibitoria (CI_{50}) de las muestras frente a GPa	60
Tabla 11. Valores de V_{max} y K_m obtenidos en la inhibición de la actividad de GPa	63
Tabla 12. Energías de afinidad de unión de las cumarinas para GPa.....	67
Tabla 13. Potencia inhibitoria de las muestras frente a PTP-1B	77
Tabla 14. Valores de V_{max} y K_m obtenidos en la inhibición de PTP-1B.....	81
Tabla 15. Energías de afinidad de unión para PTP-1B.....	85
Tabla 16. Pendientes e índices ORAC-FL.....	93
Tabla 17. Porcentajes de apagamiento para el radical hidroxilo en EPR no catalítico	96
Tabla 18. Porcentajes de apagamiento para el radical hidroxilo en EPR fotolítico	99
Tabla 19. AAC de las cumarinas a 1 μ M	102
Tabla 20. AAC de las cumarinas a 10 μ M	102

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Fórmula utilizada para calcular los porcentajes de inhibición enzimática	32
Ecuación 2. Cálculo de los índices ORAC	37

ABREVIATURAS

A	:	Absorbancia
A°	:	Armstrong
AAPH	:	2,2-azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro
ABC	:	Área bajo la curva
AChE	:	Acetilcolinesterasa
ARE	:	Elemento de respuesta antioxidante
BRB	:	Barrera retinal sanguínea
CAT	:	Catalasa
CI₅₀	:	Concentración inhibitoria cincuenta
DCF	:	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	:	Dicloro-dihidro-fluorosceína diacetato
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
DMT2	:	Diabetes mellitus tipo dos
DNS	:	Ácido dinitrosalicílico
DTT	:	Ditiotreitol
eNOS	:	Óxido nítrico sintasa endotelial
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	:	Ácido tetraacético etilenglicol
EPR	:	Resonancia paramagnética electrónica
ERN	:	Especies reactivas del nitrógeno
EROs	:	Especies reactivas del oxígeno
FL	:	Fluoresceína
Glucosa-1P	:	Glucosa uno fosfato

GP_a	:	Glicógeno fosforilasa A
GP_x	:	Glutación peroxidasa
GS	:	Glicógeno sintasa
GSK3	:	Glucógeno sintasa cinasa 3
HEPES	:	Ácido 4 - (2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfónico
iNOS	:	Óxido nítrico sintasa inducible
IDF	:	Federación de Diabetes Internacional
IR	:	Receptor de insulina
IRS	:	Sustrato del receptor de insulina
K_m	:	Constante de Michaelis-Menten
MAO	:	Monoaminoxidasa
NOS	:	Óxido nítrico sintasa
O₂⁻	:	Anión superóxido
OH[·]	:	Radical hidroxilo
OMS	:	Organización mundial de la salud
ORAC	:	Oxygen radical absorbance capacity
pNPG	:	p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido
pNPP	:	p-nitrofenilfosfato
PBS	:	Tampón fosfato salino
PTP-1B	:	Tirosina fosfatasa-1B
pTyr	:	Fosfotirosina
PI3K	:	fosfatidilinositol 3-cinasa
PI4-P	:	Fosfatidilinositol4-fosfato
PI4,5-P₂	:	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP₂	:	PI3,4-bisfosfato

PIP₃	:	PI3,4,5-trisfosfato
REE	:	Espectros de resonancia de espín electrónica
SALO	:	Sitio alostérico
SCAT	:	Sitio catalítico
SID	:	Sitio de interfaz dimérica
SIN	:	Sitio inhibidor
SOD	:	Superóxido dismutasa
TNF- α	:	Factor de necrosis tumoral α
ρ-NPP	:	ρ -nitrofenilfosfato
V_{max}	:	velocidad máxima enzimática

RESUMEN

“Actividad inhibitoria sobre enzimas que regulan la glicemia y efecto antioxidante de una serie nueva de cumarinas sintéticas”

La diabetes mellitus de tipo dos (DMT2) es una enfermedad metabólica caracterizada por un incremento crónico de la glicemia y un desequilibrio oxidativo que a largo plazo conllevan a la aparición de una serie de complicaciones fisiopatológicas, las que se traducen en un elevado costo social y económico. Para el tratamiento de la DMT2 han surgido nuevos blancos farmacológicos de importancia en el control glicémico, como la glicógeno fosforilasa A (GPa) que aumenta la glucogenólisis, la α -glucosidasa que cataliza la hidrólisis de disacáridos a monosacáridos absorbibles; y la proteína tirosina fosfatasa- 1B (PTP-1B) que participa en la internalización del receptor de insulina, aumentando la resistencia a dicha hormona en los órganos periféricos. La DMT2 es una patología compleja y multietiológica, de gran impacto mundial, a pesar de los esfuerzos realizados para encontrar un tratamiento adecuado, la mayoría de los fármacos actuales dirigidos a un solo blanco farmacológico, han sido inadecuados para alcanzar un control glicémico completamente satisfactorio. En los años recientes, fármacos dirigidos a múltiples blancos farmacológicos, han permitido estrategias más efectivas para el tratamiento de la DMT2 (Zhang et al., 2012).

Las cumarinas, compuestos químicos formados por la unión de un benceno y una α -pirona, son una familia de moléculas con diversas actividades farmacológicas, entre ellas, han demostrado poseer efectos hipoglicemiantes y capacidad de aumentar los niveles de insulina plasmática en ratas diabéticas. También han demostrado poseer actividad inhibitoria *in vitro* sobre la α -glucosidasa, PTP-1B u otras enzimas de importancia en la DMT2. Además, a las cumarinas se le han atribuido considerables efectos antioxidantes lo que secundariamente podría atenuar el progreso clínico y las manifestaciones fisiopatológicas de la hiperglicemia crónica observada en la diabetes.

Con la finalidad de encontrar nuevas moléculas que pudiesen conseguir beneficios en el tratamiento de la DMT2, en este trabajo se estudió una serie de nuevas cumarinas previamente sintetizadas, con el fin de estudiar sus efectos inhibitorios sobre las enzimas glicógeno fosforilasa A, α -glucosidasa y la proteína tirosina fosfatasa-1B; junto con analizar la capacidad

antioxidante, debido a la importancia del estrés oxidativo en el desarrollo y progresión de la DMT2. Para la selección de éstas, se dispuso de una biblioteca de cumarinas previamente sintetizadas y se realizó un análisis bibliográfico con el objetivo de relacionar dichas estructuras propuestas en la biblioteca, con otras cumarinas o moléculas similares que demostraran beneficios frente a la diabetes y así, seleccionar una serie que compartiera los mismos sustituyentes o bioisómeros de éstos, que podrían tener mejor actividad que las moléculas reportadas en literatura. Considerando además para la selección, las cumarinas con estructuras químicas con potencial efecto antioxidante. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la potencia inhibitoria, el tipo de inhibición y las interacciones inhibidor-enzima más importantes (mediante docking), frente a GPα, α-glucosidasa y PTP-1B. Además, determinar el efecto antioxidante *in vitro* frente a los radicales peroxilos (mediante ORAC-FL) e hidroxilos (mediante EPR) y evaluar la capacidad antioxidante celular (células RAW 264.7) de las cumarinas seleccionadas.

Como resultado se obtuvo que varias cumarinas (CUM 11,16,17,18 y 19) inhibieron de forma potente a α-glucosidasa y a PTP-1B en un rango micromolar, siendo significativamente más potentes que los inhibidores estándar utilizados; CUM 16 y 17 además lograron inhibir a GPα. Todas las cumarinas se unieron al sitio catalítico de α-glucosidasa, en una zona más externa que el sustrato, pero de importancia para su anclaje, logrando de esta forma, la inhibición de la enzima sin competir de forma directa con el sustrato. Para GPα y PTP-1B no se pudo determinar el sitio de unión de las cumarinas, pero es probable que se unan en el sitio alostérico. En todas las enzimas se describieron diversas interacciones aromáticas e hidrofóbicas con las cumarinas, teniendo gran importancia los sustituyentes tipo aromáticos. Todas las cumarinas demostraron actividad antioxidante moderada frente a ambos radicales, peroxilo e hidroxilo, además de cierta actividad antioxidante celular logrando atravesar las membranas citoplasmáticas celulares. En la serie de cumarinas analizadas, destacan como inhibidoras enzimáticas las bromotiofeno cumarinas, especialmente CUM 16, ya que inhibe con gran potencia a las tres enzimas en estudio, α-glucosidasa (CI₅₀: 2,19 μM ± 0,17), GPα (CI₅₀: 5,21 μM ± 0,51) y PTP-1B (CI₅₀: 2,10 μM ± 0,28), además, esta cumarina manifestó un índice ORAC-FL de 1,59 ± 0,01; atrapamiento del radical hidroxilo en 29,3 % ± 7,5 mediante EPR no catalítico y un 56,9 % ± 15,6 mediante EPR fotolítico y actividad antioxidante celular de 27,2 % ± 0,4. Por lo tanto, es una excelente candidata para proseguir con estudios preclínicos como tratamiento farmacológico para DMT2.

SUMMARY

"Inhibitory activity on enzymes that regulate the glycemia and antioxidant effect of a new series of synthetic coumarins"

Diabetes mellitus type two (DMT2) is a metabolic disease characterized by a chronic increase in glycaemia and an oxidative imbalance that in the long term lead to the appearance of a series of physiopathological complications, which leads to a higher economic and social cost. For the treatment of DMT2, new pharmacological targets of importance in glyceemic control have emerged, such as glycogen phosphorylase A (GPa) that increases glycogenolysis, α -glucosidase that catalyzes the hydrolysis of disaccharides to absorbable monosaccharides; and the protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) that participates in the internalization of the insulin receptor, increasing the resistance to said hormone in the peripheral organs. DMT2 is a complex and multietiological pathology, with great global impact, despite the efforts made to find an adequate treatment, most of the current drugs focused to a single pharmacological target, have been inadequate to achieve a completely satisfactory glyceemic control. In recent years, drugs aimed at multiple pharmacological targets have allowed more effective strategies for the treatment of DMT2 (Zhang et al., 2012).

The coumarins, chemical compounds formed by the union of a benzene and an α -pyrone, are a family of molecules with diverse pharmacological activities, among them, they have demonstrated to have hypoglycemic effects and capacity to increase the plasma insulin levels in diabetic rats. They have also shown to have inhibitory activity *in vitro* on α -glucosidase, PTP-1B or other enzymes of importance in DMT2. In addition, coumarins have been attributed significant antioxidant effects which could secondarily attenuate the clinical progress and pathophysiological manifestations of chronic hyperglycemia observed in diabetes.

With the purpose of finding new molecules that could bring benefits in the treatment of DMT2, in this work we studied a series of new coumarins previously synthesized, in order to study their inhibitory effects on the enzymes glycogen phosphorylase A, α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase-1B; along with analyzing the antioxidant capacity, due to the importance of oxidative stress in the development and progression of DMT2. For the selection of these, a library of previously synthesized coumarins was available and a bibliographic analysis was carried out in order to relate these structures proposed in the library, with other coumarins or

similar molecules that demonstrate benefits against diabetes and thus select a series that shared the same substituents or bioisosters, which could have better activity than the molecules reported in literature. Considering also for the selection, the coumarins with chemical structures with potential antioxidant effect. The objectives of this work were to determine the inhibitory potency, the type of inhibition and the most important inhibitor-enzyme interactions (through docking), against GPa, α -glucosidase and PTP-1B. In addition, determine the antioxidant effect *in vitro* against the peroxy radicals (by ORAC-FL) and hydroxyls (by EPR) and evaluate the cellular antioxidant capacity (RAW 264.7 cells) of the selected coumarins.

As a result, it was obtained that several coumarins (CUM 11,16,17,18 and 19) potently inhibited α -glucosidase and PTP-1B in a micromolar range, being significantly more potent than the standard inhibitors used; CUM 16 and 17 also managed to inhibit GPa. All the coumarins were linked to the catalytic site of α -glucosidase, in a zone more external than the substrate, but of importance for its anchoring, thus achieving the inhibition of the enzyme without competing directly with the substrate. For GPa and PTP-1B the binding site of the coumarins could not be determined, but it is likely that they bind at the allosteric site. In all the enzymes, various aromatic and hydrophobic interactions were described with the coumarins, therefore the aromatic type substituents having great importance.

All the coumarins demonstrated moderate antioxidant activity against both radicals, peroxy and hydroxyl, as well as certain cellular antioxidant activity, crossing the cellular cytoplasmic membranes.

In the series of coumarins analyzed, bromotiofene coumarins stand out as enzymatic inhibitors, especially CUM 16, since inhibit with high potency the three enzymes under study, α -glucosidase (IC_{50} : $2.19 \mu\text{M} \pm 0.17$), GPa (IC_{50} : $5.21 \mu\text{M} \pm 0.51$) and PTP-1B (IC_{50} : $2.10 \mu\text{M} \pm 0.28$), in addition, this coumarin showed an ORAC-FL index of 1.59 ± 0.01 ; scavenging of the hydroxyl radical in $29.3\% \pm 7.5$ by non-catalytic EPR and $56.9\% \pm 15.6$ by photolytic EPR and cellular antioxidant activity of $27.2\% \pm 0.4$. Therefore, it is an excellent candidate to continue with preclinical studies as a pharmacological treatment for DMT2.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Marco Teórico

1.1.1. Antecedentes de diabetes mellitus tipo dos

En el año 2015, la Federación de Diabetes Internacional (IDF) estimó que el número de adultos diabéticos era de 415 millones a nivel mundial (1 de cada 11 personas) y más del 90% de los casos diagnosticados correspondían a DMT2, produciendo una alta tasa de mortalidad (cinco millones de muertes por diabetes sólo para el año 2015) y un alto costo económico asociado al tratamiento de la patología (673-1197 billones de dólares para el mismo año). Además, la organización mundial de la salud (OMS) registró que más del 80% de las muertes por diabetes, ocurre en países de bajo a medianos ingresos y estima que esta patología será la séptima causa de muerte en el año 2030. En el año 2007 el ministerio de salud de Chile reportó que el 7% de la población padecía de diabetes y de ellos cerca del 99% correspondían a DMT2. Actualmente, según la última encuesta nacional de salud (2009-2010), el porcentaje de pacientes diagnosticados con diabetes (glicemia ≥ 126 mg/dl con ayuno ≥ 8 h o autoreporte de diagnóstico médico) ha aumentado a un 9,4% con una mayor prevalencia en personas con menor nivel educacional.

La DMT2 es una enfermedad metabólica caracterizada por un incremento crónico en la glicemia, como consecuencia de una falla en la secreción de insulina pancreática, resistencia a la insulina en los tejidos blancos, y estimulación de la vía sintética de glucosa en el hígado. Estos signos promueven varias complicaciones a largo plazo, como enfermedades cardiovasculares, neuropatías, retinopatía y nefropatía; que se traducen en un elevado costo social y económico, por lo que se considera como una patología de gran impacto en la salud pública (Pari & Rajarajeswari, 2009; Tsitsanou et al., 2013; Tang et al., 2003; Kato et al., 2010).

La DMT2 posee múltiples factores de riesgos que se relacionan con el estilo de vida actual, destacándose la mala alimentación, sedentarismo, sobrepeso, e hipertensión arterial, entre otros. Aunque existen medicamentos en uso clínico para el tratamiento sintomático de esta patología,

estas terapias son inadecuadas para el 30-40% de los pacientes, lo que promueve la búsqueda de nuevas moléculas con eficacia clínica (Varga et al., 2013).

Es importante mencionar que la diabetes está asociada con un incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno y/o un daño en el sistema de defensa antioxidante, resultando en un estrés oxidativo, el cual posee un rol pivotal en el desarrollo, progreso y complicaciones de la enfermedad. Dentro de las alteraciones se ha observado un aumento de especies reactivas del oxígeno (EROs), aumento de la peroxidación lipídica, daños en el metabolismo del glutatión y alteraciones en las actividades de las principales enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Rajarajeswari & Pari, 2011). El estrés oxidativo finalmente puede conducir a fragmentación del DNA, peroxidación de fosfolípidos, disfunción mitocondrial y disrupción celular, que generan fallas en las células β pancreática y resistencia a la insulina (Castellano et al., 2013).

1.1.2. Receptor de insulina y su cascada de señalización

La insulina es una hormona liberada por las células beta pancreáticas en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre, su principal función es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal, entre 80-105 mg/dl, favoreciendo la entrada y almacenamiento de este nutriente en músculo y tejido adiposo, mientras que en el hígado se favorece su almacenamiento y se inhibe su producción. Las acciones de la insulina son mediadas por cascadas de señalización intracelular, en las cuales la fosforilación inicial del receptor en residuos de tirosina (Tyr) lleva a una serie de eventos de fosforilación/defosforilación de cinasas. El receptor de insulina (IR) es una glucoproteína heterotetrámera compuesta por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro. Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) (Figura 1) (Olivares & Arellano, 2008).

La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos; ésta se inicia cuando el receptor activo y autofosforilado, interacciona con el sustrato del receptor de insulina (IRS) y lo fosforila. IRS al ser fosforilado se convierte en sitio de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2, como es el caso de PI3K, que funciona como proteína adaptadora, el cual se une a IRS y provoca cambios alostéricos dando por resultado la activación de la subunidad catalítica de PI3K. Éste a su vez fosforila a PI4-P (fosfatidilinositol 4-fosfato) y PI4,5-P₂ (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), generando los productos PIP₂ (PI3,4-bisfosfato) y PIP₃ (PI3,4,5-trisfosfato), respectivamente. PIP₃ sirve como sitio de unión para cinasas de serina (Ser) como Akt (proteína cinasa B). Esta cinasa regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3, inactivándola), activándose la glucógeno sintasa (GS), cuya actividad es inhibida por GSK3. Akt también fosforila a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS, activándola). Finalmente, la insulina promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática, por una vía que depende de la activación de PI3K y de Akt (Olivares & Arellano, 2008; Gum et al., 2003).

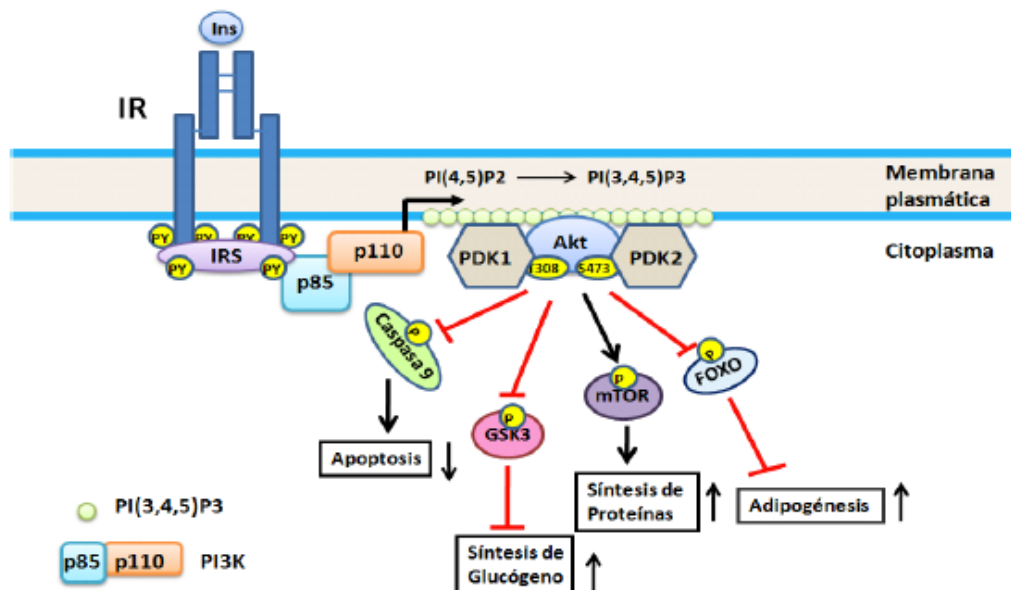


Figura 1. Cascada de señalización del receptor de insulina. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo (Olivares & Arellano, 2008).

1.1.3. Enzimas que participan en el control de la glicemia

1.1.3.1. α -glucosidasa

La α -glucosidasa es una enzima de tipo carbohidrasa localizada en la membrana superficial de las microvellosidades de las células intestinales y cataliza la hidrólisis de disacáridos a monosacáridos absorbibles (Figura 2). Esta enzima se ha encontrado en varios sistemas, desde microorganismos hasta plantas y animales más evolucionados. La inhibición de la α -glucosidasa suprime el influjo de glucosa desde el intestino a los vasos sanguíneos, por lo que podría disminuir significativamente el incremento de glicemia postprandial, posterior a una dieta rica en carbohidratos y por lo tanto, es un importante blanco para manejar la hiperglicemia ligada a DMT2 (Park et al., 2011; Lordan et al., 2013).

Actualmente se utiliza la acarbosa como fármaco antihiperглиcémico en el tratamiento de DMT2, que actúa inhibiendo a la α -glucosidasa. Si bien posee buena eficiencia en atenuar el alza de los niveles de glucosa plasmática en pacientes, el uso continuado de este fármaco está asociado a efectos adversos indeseados como problemas gastrointestinales y toxicidad hepática, es por esta razón que existe el interés de encontrar nuevos inhibidores eficaces, pero con menor grado de efectos adversos o efectos secundarios no deseados (Lordan et al., 2013).

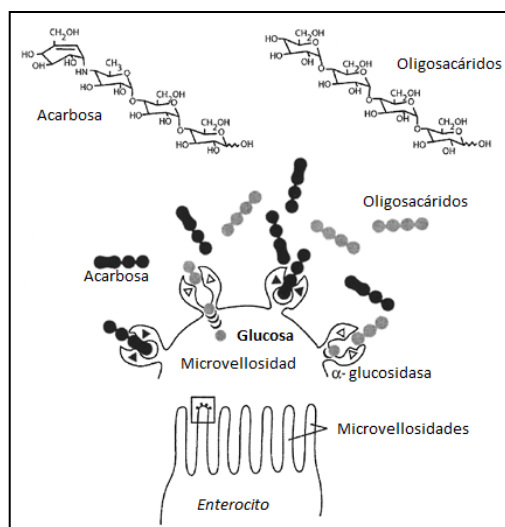


Figura 2. Acción de la α -glucosidasa sobre los oligosacáridos. La enzima estimula la absorción de glucosa a nivel intestinal. Acarbosa un inhibidor tipo carbohidrato de la enzima que disminuye su actividad.

Se han observado distintos tipos de inhibidores de la α -glucosidasa, algunos de éstos contienen anillos de monosacáridos con múltiples grupos hidroxilos, los cuales han mostrado una fuerte afinidad al sitio de unión de carbohidratos (sitio activo enzimático), pero que carecen de especificidad, inhibiendo una serie de isoenzimas (Park et al., 2011). En la familia de los inhibidores del tipo no-carbohidrato, el residuo aromático es la clave del farmacóforo y se han observado inhibiciones del tipo no competitivas y mixtas, debido al hecho de que comparten parcialmente los sitios de unión con los sustratos. En la enzima, por fuera de la región que se une al carbohidrato, se han observado sitios de unión con aminoácidos de cadenas laterales con grupos aromáticos e hidrofóbicos que interactúan con sustituyentes aromáticos de los inhibidores, a través de interacciones π - π . Así, por la introducción apropiada de grupos aromáticos en los inhibidores, éstos podrían ser reconocidos por los residuos que están por fuera del sitio de unión a carbohidratos y obtener de esta forma inhibidores más selectivos (Park et al., 2011).

Moorthy y colaboradores, en el año 2011, sugieren que las moléculas que poseen átomos de oxígeno unidos por doble enlace, principalmente carbonilos, y grupos aromáticos son favorables para la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa, insinuando que el sitio activo de la enzima contiene residuos aminoácidos aromáticos y algunos grupos polares capaces de formar puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas con los inhibidores. Además, demostraron que la presencia de átomos electronegativos como nitrógeno y oxígeno incrementa la conectividad molecular, y que la distancia entre los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos debe ser pequeña, los cuales además, deben estar balanceados en el área superficial.

Específicamente dentro del sitio activo de la enzima se han observado residuos de Glu194, Glu508, Glu526, Glu532, Ser217, Tyr533 y Asn216 capaces de formar puentes de hidrógeno e interacciones polares, junto con residuos de Phe401 y Phe536 que podrían generar interacciones apolares con los inhibidores (Azam et al., 2012).

1.1.3.2. Glicógeno fosforilasa A (GPa)

La GPa es la principal enzima regulatoria de la vía metabólica del glicógeno, ya que cataliza por fosforólisis, la degradación de glicógeno a glucosa uno fosfato (glucosa-1P) (Figura 3). Existen tres isoenzimas dependiendo de los tejidos en que se expresa: hígado, músculo y cerebro. Las isoenzimas musculares y cerebrales abastecen dichos tejidos en los que se encuentran, gracias a la utilización de la glucosa-1P como fuente de energía metabólica; mientras que la isoenzima hepática cumple con la función de producir glucosa para mantener la glicemia de todo el organismo, gracias a la exportación de glucosa hacia los tejidos periféricos (Deng et al., 2005).

Tras la inhibición de GPa se ha observado una disminución de la glucogenólisis y de la producción de glucosa hepática, estableciéndola como un blanco farmacológico para el control de la salida de glucosa, desde el hígado, en la DMT2 (Polyák et al., 2013; Zhang et al., 2012a).

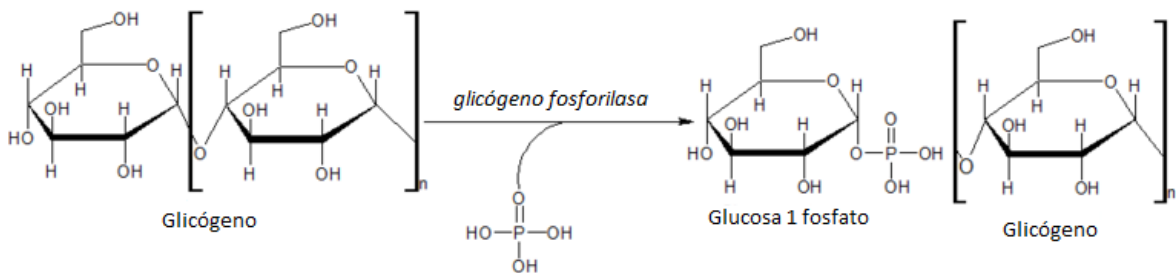


Figura 3. Acción de la GPa sobre el glicógeno. GPa produce glucosa-1P como producto de la fosforólisis del glicógeno.

La enzima existe en dos formas interconvertibles: la forma defosforilada, GPb, que es de baja actividad y baja afinidad por el sustrato; y la forma fosforilada en Ser14, GPa, que posee una alta actividad y alta afinidad por el sustrato. La forma activa es un homodímero con subunidades de 97 KDa que es inducida por sus sustratos y por los efectores alostéricos, mientras que la forma inactiva es estabilizada por la unión de inhibidores.

La GP_a posee al menos 5 sitios regulatorios: (1) el sitio catalítico que se une a ambos sustratos, glicógeno y glucosa-1P; (2) el sitio de almacenamiento de glicógeno; (3) un sitio alostérico activador del AMP, que se une a AMP, ATP y glucosa 6 fosfato; (4) el sitio inhibidor de nucleósidos de purina (como por ejemplo cafeína) y (5) un nuevo sitio alostérico de indol carboxamida, ubicado en la interfaz dimérica, al que se unen derivados de indol y sus análogos (Tsitsanou et al., 2013; Deng et al., 2005).

Estudios cristalográficos demuestran que el nuevo sitio alostérico de la GP_a hepática humana, está formado por residuos de ambas subunidades que forman parte de la interfaz dimérica, el cual consta de un ambiente hidrofóbico, formado casi exclusivamente por una subunidad, que incluyen los motivos alifáticos de las cadenas laterales de los aminoácidos Arg60, Lys191, Val64 y las cadenas laterales de otros 6 residuos hidrofóbicos que permiten interacciones π de apilamiento con grupos aromáticos de inhibidores. Adicionalmente, se han observado puentes de hidrógeno e interacciones electroestáticas entre aminas y carbonilos de compuestos inhibidores y el esqueleto carbonil o el grupo guanidina de Arg60; con el esqueleto carbonil de Glu190 o de Tyr185 y con Thr38. Además, consta de una segunda zona formada por ambas subunidades que incluye la formación de puentes de hidrógeno gracias al esqueleto carbonil y la cadena lateral de Lys191; junto con interacciones de Van der Waals por medio de Pro, Phe e His (Wright et al., 2005; Rath et al., 2000).

Se ha demostrado que diferentes compuestos inhiben la actividad de la GP_a en modelos *in vitro*, por ejemplo i) inhibidores análogos de glucosa, con múltiples funciones polares que se unen al sitio activo de la enzima, como las N-acil- β -D-glucopiranosil aminas y las N-acil-N- β -D-glucopiranosil ureas, ii) inhibidores que se unen al sitio inhibidor de purina, también conocido como sitio I, como la cafeína y otros análogos heteroaromáticos como algunos flavonoides, iii) inhibidores que se unen al sitio alostérico activador del AMP, como por ejemplo los derivados de acilurea, ácido pentanodioico y triterpenos pentacíclicos y iv) los inhibidores que se unen al nuevo sitio alostérico, como por ejemplo, derivados del grupo indol-2-carboxamida (Polyák et al., 2013; Varga et al., 2013; Martin et al., 1998; Rath et al., 2000).

1.1.3.3. Tirosina fosfatasa-1B (PTP-1B)

La proteína tirosina fosfatasa-1B es una enzima fosfatasa intracelular con un dominio catalítico de 37 kDa y una secuencia C-terminal hidrofóbica de 35 aminoácidos que se ancla al retículo endoplasmático. Su función principal es producir internalización, por defosforilación, del receptor de insulina activado y defosforilar a JAK₂, una cinasa rio abajo del receptor de leptina (hormona que actúa como lipostato, inhibiendo el apetito) (Figura 4). Por lo tanto, PTP-1B es un regulador negativo clave en ambas vías de señalización, relacionándose con la resistencia a la insulina en la DMT2 y la obesidad.

Se ha demostrado que la enzima posee dos sitios de unión a fosfato y que su sustrato natural, el receptor de insulina activado, contiene dos residuos de fosfotirosina en las posiciones 1162 y 1163; de esta forma el tripéptido DY(P)Y(P) representa la secuencia del sustrato natural, donde el fosfato central es el que es removido por la enzima. Sin embargo, un fármaco inhibidor puede unirse a uno o ambos sitios de unión de fosfotirosina para ejercer su acción (Holmes et al., 2008; Liu et al., 2013).

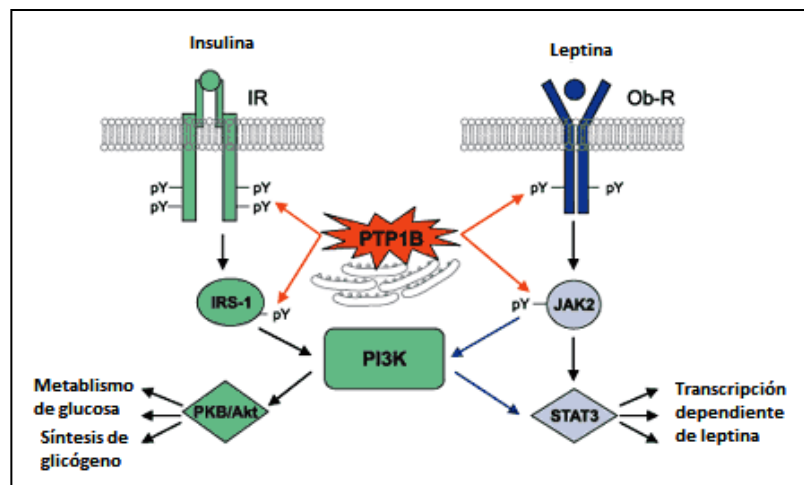


Figura 2. Acción de la Tirosina fosfatasa-1B. Se observan las dos vías de señalización donde la enzima actúa como mediador negativo, la vía del receptor de insulina y la del receptor de leptina.

El desarrollo de inhibidores de PTP-1B ha sido poco satisfactorio, debido a que el sitio catalítico de la enzima es altamente conservado y de naturaleza catiónica. La mayoría de los inhibidores incorporan miméticos de fosfotirosina (pTyr), interactuando con el sitio catalítico, como es el caso de Ertiprotafib (CI₅₀ de 384 nM). Liu et al. en el año 2013 propuso un modelo de farmacóforo para Ertiprotafib, que consiste en dos anillos aromáticos, un motivo hidrofóbico y un grupo carboxílico. Los anillos aromáticos aumentan la posibilidad de interacciones catión- π con Lys120 y Lys116; el grupo mimético de pTyr entra al sitio activo y además permite interacciones electrostáticas con Arg221; finalmente la presencia de puentes de hidrógeno con Ala217 en el centro catalítico contribuye a mejores actividades de los inhibidores. La desventaja de este tipo de inhibidores es que poseen baja selectividad e inadecuada actividad *in vivo* debido a su baja permeabilidad celular (Liu et al., 2013; Tang et al., 2013).

Sin embargo, en el año 2004 fue descrito un sitio alostérico para la enzima, en el cual logran unirse inhibidores pequeños, bloqueando la movilidad del *loop* catalítico de la enzima y estabilizando la conformación inactiva. Además, la constitución neutra que es necesaria para unirse al sitio alostérico, permite mayor selectividad y actividad *in vivo*. El sitio alostérico posee un bolsillo hidrofóbico formado por cadenas laterales de los residuos Leu192, Phe196 y Phe280, en el cual se unen sustituyentes hidrofóbicos como fenilos y tiazoles, a través de interacciones π - π con las cadenas laterales de dichos aminoácidos. Además, la presencia de otros aminoácidos como Asn193 y Glu276, permite la formación de puentes de hidrógeno con sustituyentes como cetonas y sulfonamidas, dicha interacción a través de puentes de hidrógeno se ha propuesto como indispensable para la acción de los inhibidores. También, se han descrito enlaces de hidrógeno mediados por agua entre grupos fenólicos y la cadena principal del carbonilo de Phe196 (Tang et al., 2013).

Se ha demostrado en células musculares, hepáticas y en ratones que al inhibir esta enzima y/o impedir su síntesis, se protege tanto de la resistencia a la insulina, como de la obesidad, aumentando la activación de la vía de señalización del receptor de insulina y las fosforilaciones de sus mensajeros secundarios como Akt. Al contrario, al aumentar la expresión de la PTP-1B se perjudica directamente esta vía y se genera una importante resistencia a la insulina (Nieto-Vázquez et al., 2007; Gum et al., 2003).

1.1.4. Cinética de inhibición enzimática

A partir del gráfico de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos ($1/V_0$ vs $1/[S]$) se puede obtener el valor numérico de la velocidad máxima enzimática (V_{\max}) y de la constante de Michaelis-Menten (K_m) (Figura 5), las cuales varían (de diversas maneras) en presencia de un inhibidor, permitiéndonos determinar el tipo de inhibición ejercido, según se modifique uno o ambos parámetros.

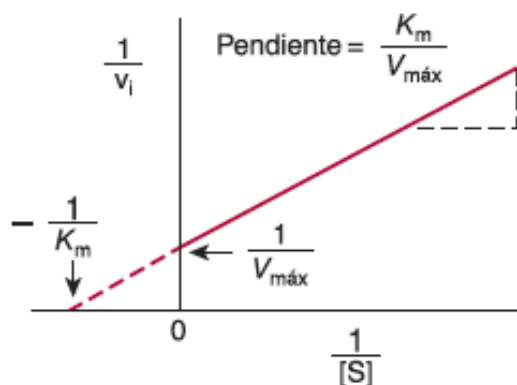
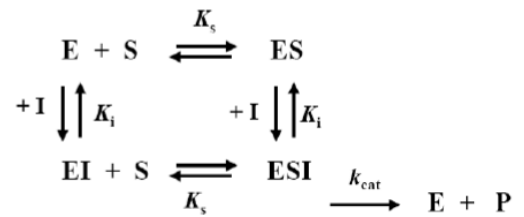
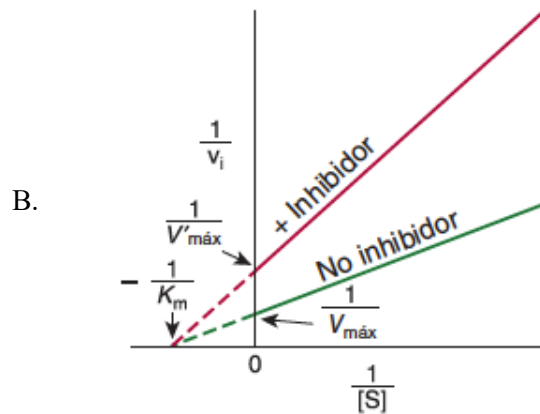
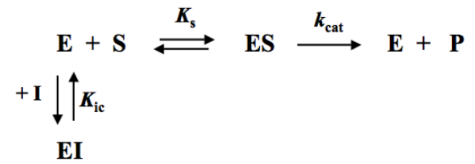
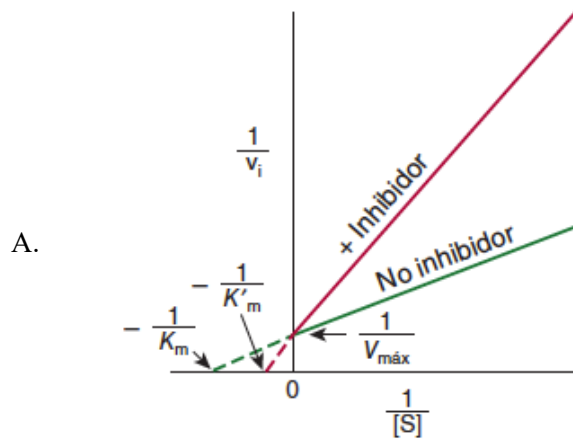


Figura 3. Representación del gráfico Lineweaver-Burk. V_i : velocidad inicial; $[S]$: concentración de sustrato; K_m : constante de Michaelis-Menten; V_{\max} : velocidad máxima (Harper Bioquímica Ilustrada, 28ª edición).

Un inhibidor de tipo competitivo es aquel que se une al sitio activo de la enzima libre, interfiriendo con la unión del sustrato y compitiendo con él, observándose un aumento de la K_m sin afectar la V_{\max} , de esta forma, si se aumenta la cantidad de sustrato, se puede revertir la inhibición (Figura 6, A). Un inhibidor de tipo acompetitivo es aquel que se une al complejo enzima-sustrato, interfiriendo con la formación del producto, observándose una disminución tanto de la K_m como de la V_{\max} (Figura 6, D). Un inhibidor de tipo mixto es aquel que se une tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato, interfiriendo con la unión del sustrato y la formación del producto, observándose, por lo tanto, un descenso en la V_{\max} y un aumento en la K_m (Figura 6, C). Finalmente, un inhibidor de tipo no competitivo presenta un comportamiento similar a los inhibidores mixtos, pero además muestra la misma afinidad para

unirse a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato, observándose así un descenso en la V_{\max} sin alterar la K_m (Figura 6, B), dado que normalmente se unen en un sitio diferente (alostérico) al del sustrato (Gupta et al., 2017; Girgih et al., 2016; Fu et al., 2017).



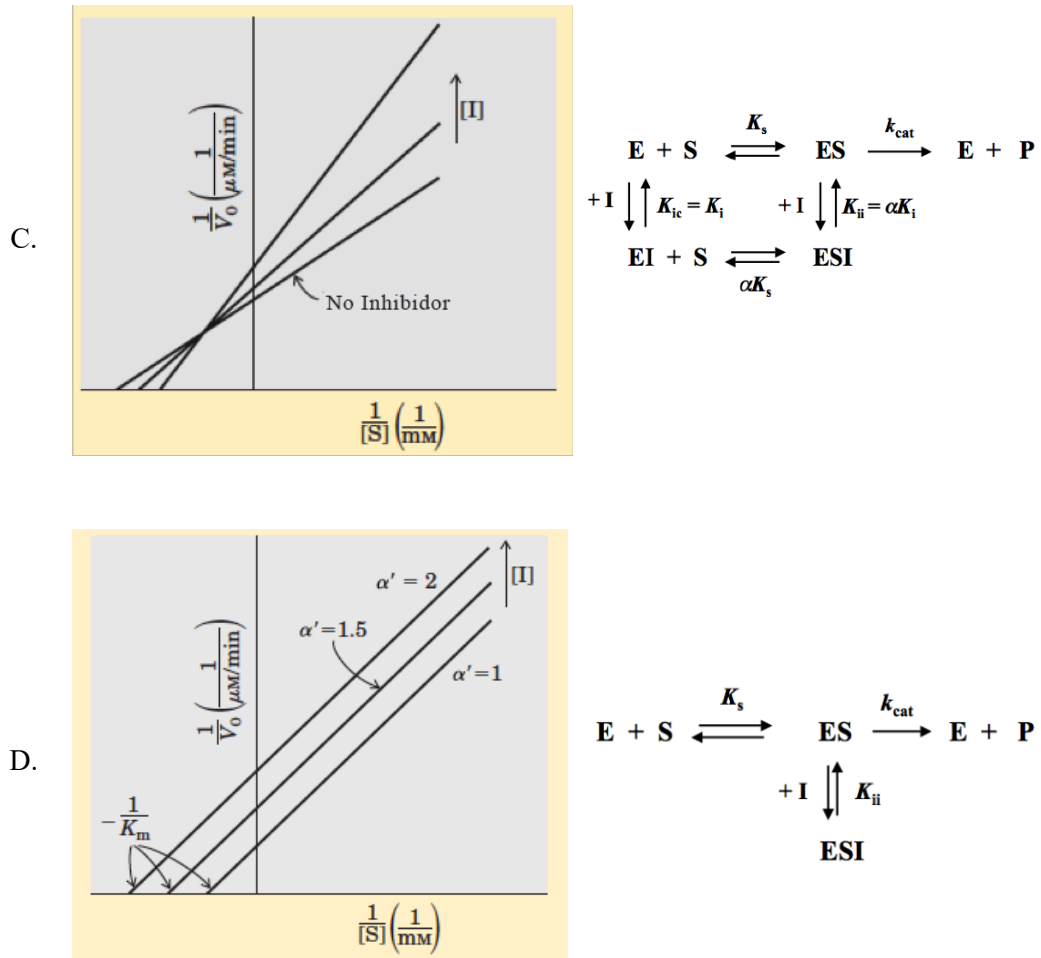


Figura 4. Tipos de inhibición enzimática. E: enzima; S: sustrato; P: producto; I: inhibidor; ES: complejo enzima-sustrato; EI: complejo enzima-inhibidor; ESI: complejo enzima-sustrato-inhibidor. A: inhibición de tipo competitiva (intersección de las rectas en eje de las ordenadas); B: inhibición de tipo no competitiva (rectas se intersecan en el eje de las abscisas); C: inhibición de tipo mixta (rectas se intersecan en el segundo cuadrante); D: inhibición de tipo acompetitiva o incompetitiva (rectas paralelas entre sí) (Harper Bioquímica Ilustrada, 28ª edición; Lehninger Principles of Biochemistry, 4ª edición).

1.1.5. Cumarinas y sus efectos en el control glicémico y en el estrés oxidativo

1.1.5.1. Cumarinas

Las cumarinas o químicamente 1,2-benzopirona son moléculas formadas por la unión de un benceno y una α -pirona (Figura 7). Las cumarinas de origen natural están clasificadas como compuestos fenólicos, derivados lactónicos del ácido *o*-hidroxi-*Z*-cinámico, que se caracterizan por poseer una variedad de patrones de oxigenación sobre el núcleo de la benzopirona, siendo la oxigenación en C-7 la más común entre las cumarinas presentes en la naturaleza. La 7-hidroxycumarina (umbeliferona) es considerada el precursor directo de las cumarinas di- y tri-oxigenadas (Barata Sebastián, 2010).

Dentro de las actividades farmacológicas que se les han atribuido a estas moléculas, podemos destacar: actividad como anticoagulantes, antibacterianas, fungicidas, antivirales, vasodilatadores, antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales e hipoglicemiantes (Pari & Rajarajeswari, 2009; Jayashree et al., 2011).

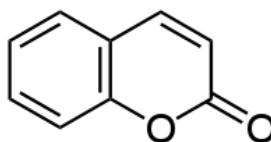


Figura 5. Núcleo básico de cumarinas. Formado por la unión de un benceno y una alfa pirona (Rajarajeswari & Pari, 2011).

Estas moléculas han sido identificadas como metabolitos secundarios de distintas especies vegetales chilenas, por ejemplo, se ha descrito 3,4 di-hidro fraxidina, escopoletina y escoparona, entre otros, en los frutos de *Gomortega keule* (n.v: Queule), árbol endémico del sur de Chile; varias de estas cumarinas presentaron actividad antioxidante a través de distintos métodos analíticos (Simirgiotis et al., 2013). Así como también se ha identificado 5'epi-triptiliocumarina en las partes aéreas de *Nassauvia pyramidalis*, junto con otras especies del mismo género, el

cual se distribuye por los Andes, incluyendo Chile (Hoeneisen et al., 1999). También podemos destacar que en el exudado resinoso de *Haplopappus multifolius* Reiche, un pequeño arbusto que crece cerca de Santiago, se han identificado 8 cumarinas, tales como: herniarina, preniletina, haplopinol y O-prenil-umbeliferona, entre otros; en esta especie, aquellas cumarinas fenólicas no O-sustituidas, demostraron actividad antioxidante moderada (Torres et al., 2006).

1.1.5.2. Actividad de las cumarinas frente al control glicémico

En el contexto de estudios enzimáticos *in vitro*, hay antecedentes de que las cumarinas pueden actuar como buenos inhibidores de las enzimas que participan en el control glicémico ya mencionadas. Es así como Raju et al. en el año 2010 reportó una nueva serie de cumarinas 3,4 y 3,6 disustituidas capaces de inhibir a la α -glucosidasa, en dónde el grado de actividad de éstas dependía de la estructura de la cumarina evaluada. Además, no solo se han encontrado cumarinas sintéticas capaces de inhibir a la α -glucosidasa, sino también aquellas presentes como metabolitos secundarios de especies vegetales, como es el caso de la escopoletina, una cumarina extraída y aislada a partir de *Hortia longifolia* Benth, Rutaceae, la cual mostró una alta actividad inhibitoria frente a dicha enzima. Por otro lado, la escopoletina fue capaz de inhibir parcialmente a la α -amilasa, otra enzima que participa en el control glicémico (Queiroz et al., 2013).

A su vez, Holmes et al. en el año 2008 propuso una serie de cumarinas fosfatadas que fueron capaces de unirse al sitio activo de la enzima PTP-1B y lograr su inhibición al impedir la unión del sustrato natural. También hay evidencia de una serie de piranocumarinas que lograron inhibir a esta enzima, además de la α -glucosidasa y GPa, entre otras. Estos últimos derivados conjuntamente exhibieron actividad hipoglicemiante y fueron capaces de reducir el perfil lipídico en ratones diabéticos, administrados oralmente (Kumar et al., 2009).

Secundariamente, existen varios estudios científicos que comprueban las actividades hipoglicemiantes que poseen las cumarinas en modelos *in vivo*. Es así como Pari y Rajarajeswari demostraron que ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina-nicotinamida, al ser tratadas con el núcleo químico base de las cumarinas a una dosis efectiva de 100 mg/Kg, se producía una disminución significativa de los niveles de glucosa plasmática junto con un

incremento de los niveles de insulina, producto del cierre de los canales de K^+ /ATPasa, despolarización de membrana e influjo de calcio en las células beta pancreáticas. Además, a la dosis descrita, se observó una disminución en la ingesta de comida y agua, junto con la disminución de glucosa urinaria, y un incremento en el peso corporal. Finalmente, se observó un aumento en la cantidad de hemoglobina y una disminución de la hemoglobina glicosilada en los animales de experimentación.

No solo se ha determinado la capacidad hipoglicemiante *in vivo* de las cumarinas, si no que también se ha observado que previenen o enlentecen la progresión clínica y las manifestaciones fisiopatológicas propias de la diabetes, por ejemplo, se observó que gracias al tratamiento con *skimming* (cumarina y principal componente activo del extracto acuoso de *Hydrangea paniculata*), los niveles de glucosa sanguínea disminuyeron y mejoraron también los signos propios de la nefropatología asociada al cuadro diabético, como consecuencia de una reducción en la fibrosis glomerular y tubular (Zhang et al., 2012b).

De acuerdo a los antecedentes ya nombrados, se ha manifestado un gran interés científico en sintetizar nuevas cumarinas y conjugados de éstas con actividades farmacológicas de utilidad. Es así como un conjugado entre cumarina y aspirina, XLF-III-43, mostró inhibición significativa de la formación de productos glicosilados y prevención de la nefropatía diabética en un modelo de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, aunque no mostró actividad como hipoglicemiante o antioxidante (Li et al., 2010).

La hiperglicemia crónica en la diabetes está asociada a cambios patológicos en la vasculatura de la retina, que involucra la ruptura de la barrera retinal sanguínea (BRB). Cantidades incrementadas de citoquinas, moléculas de adhesión, óxido nítrico sintasa (NOS) y nitrotirosina son observadas en la retina de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. El tratamiento con un derivado de cumarina semisintético llamado cloricromeno (fármaco utilizado como antiagregante plaquetario, protector del endotelio y con actividad vasodilatadora) disminuyó significativamente las citoquinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y atenuó la actividad de enzimas como la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la mieloperoxidasa; disminuyendo la ruptura de las BRB en un 45%. Además, fue capaz de inhibir la infiltración celular, el exudado de proteínas y la formación de nitritos/nitratos, siendo muy útil para el tratamiento de la retinopatía diabética. El mecanismo propuesto se relaciona

con la inhibición de la activación del factor nuclear-kB y subsecuentemente el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), lo que podría estar relacionado con la neutralización de especies reactivas del oxígeno. Por lo tanto, el derivado de cumarina atenúa el grado de inflamación crónica y el daño en tejidos que se relaciona con el estado primario de la retinopatía diabética (Bucolo et al., 2009).

1.1.5.3. Actividad antioxidante de las cumarinas

El estrés oxidativo es un proceso muy complejo que se define como un desbalance entre los agentes oxidantes y los agentes antioxidantes. Su impacto en el organismo depende del tipo de agente oxidante, del sitio y la intensidad de su producción, de las actividades de los antioxidantes, y la actividad de los sistemas de reparación. Los antioxidantes se han definido como cualquier sustancia capaz de retrasar significativamente o impedir la oxidación de biomoléculas a concentraciones menores que el sustrato oxidable, protegiendo de esta forma a las células de los daños causados por especies reactivas y/o metales de transición. Los antioxidantes pueden ejercer sus efectos mediante diferentes mecanismos, tales como la neutralización de especies reactivas, el secuestro de metales de transición (actividad de quelación), la inhibición de las enzimas implicadas en la sobreproducción de especies reactivas y la modulación de la expresión génica, por ejemplo, vía elemento de respuesta antioxidante (ARE) y el factor de transcripción Nrf-2 (Benfeito et al., 2013). Sin embargo, en algunas circunstancias patológicas las defensas endógenas no son suficientes y puede ser necesaria la administración exógena de antioxidantes (Teixeira et al., 2013).

El índice ORAC (oxygen radical absorbance capacity) ha sido ampliamente utilizado para determinar la capacidad antioxidante de las muestras. Esta metodología mide la protección otorgada por una molécula antioxidante, a una molécula blanco, que está siendo oxidada por radicales peroxilos y es estimada por los cambios en el área bajo la curva (ABC) de los perfiles cinéticos de la molécula blanco. Se ha observado que hay diferencias en los índices ORAC, dependiendo de la molécula blanco empleada, dentro de éstas las más utilizadas actualmente son la fluoresceína (FL) y el rojo pirogalol. Al utilizar el primero, los índices ORAC obtenidos, se relacionarían con la estequiometría de los antioxidantes (Alarcón et al., 2008).

Varios estudios han demostrado la capacidad antioxidante de las cumarinas, la cual ha sido explicada en parte por sus habilidades como neutralizadoras de radicales libres, como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH); y por la capacidad de quelar algunos metales de transición (Rajarajeswari & Pari, 2011).

Pérez et al. (2013a) reportaron una serie de monohidroxycumarinas y dihidroxycumarinas con actividades antioxidantes determinadas por sus índices ORAC-FL, en donde las primeras exhibieron un índice ORAC mayor que la molécula estándar trolox y fueron comparables a quercetina y catequina (compuestos antioxidantes ampliamente estudiados). Además, se concluyó que los grupos donores de electrones como el metoxi contribuyen con la actividad antioxidante.

En adición, una serie de hidroxí-3-arilcumarinas demostró tener actividad antioxidante evaluada por distintas metodologías, que apuntan tanto hacia la neutralización de EROs como a especies reactivas del nitrógeno (ERN) y la actividad demostró estar relacionada con el tipo de sustituyentes presentes en su esqueleto estructural. Al igual que en el caso anterior, las dos cumarinas más activas mostraron mejores índices ORAC-FL que la quercetina y catequina, y constaban con grupos donores de densidad electrónica (hidroxilos) en el anillo aromático (Matos et al., 2013).

1.1.5.4. Antecedentes de la serie de cumarinas a estudiar

Se contaba con una biblioteca de diversas cumarinas previamente sintetizadas, por un grupo de colaboradores a cargo del profesor Eugenio Uriarte en Santiago de Compostela, España. Varias de estas cumarinas habían sido evaluadas previamente en relación a diferentes actividades biológicas, por ejemplo, se estudiaron las actividades antioxidantes y tripanocidas de amidocumarinas, aminocumarinas, fenilcumarinas y de híbridos chalcona-cumarinas en una tesis doctoral anterior (Figuroa Guñez Roberto, 2014), obteniendo resultados favorables para ambas actividades evaluadas. También se realizó un estudio sobre la actividad de cumarinas sustituidas en el carbono 3 en relación al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, como inhibidoras tanto de la enzima monoaminoxidasa (MAO) como de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), donde se discutió que la introducción de un grupo amida entre el

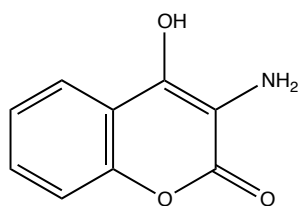
núcleo base de la cumarina y un sustituyente aromático (3-benzamidocumarinas) permitió la inhibición dual de ambas enzimas en un rango micromolar. Varias amidocumarinas fueron estudiadas como inhibidoras de la MAO y como antioxidantes, enfocadas hacia el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, obteniendo resultados favorables (Matos et al., 2015; Viña et al., 2012).

Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios en relación a los posibles efectos beneficiosos que pudiesen tener las cumarinas que constituyen esta biblioteca como tratamiento para la diabetes mellitus, y dado que las cumarinas como familia de compuestos, poseen extensos antecedentes como hipoglicemiantes y antioxidantes, resulta muy interesante estudiar estos compuestos en esta área farmacológica.

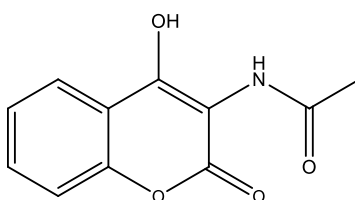
Para la selección de la serie de cumarinas a estudiar en este trabajo, se realizó una búsqueda bibliográfica con el fin de encontrar cumarinas u otras estructuras similares que manifestaran efecto inhibitorio de enzimas relevantes en el control glicémico, y se realizó una comparación estructural con la biblioteca de cumarinas que se contaba, seleccionando de esta manera, cumarinas con sustituyentes comunes (grupos aromáticos, amidas, hidroxilos y halógenos) a las moléculas con la actividad biológica de interés y/o bioisómeros de éstos. Teniendo como objetivo del estudio encontrar alguna estructura (o más de una) que sea capaz de inhibir a las enzimas α -glucosidasa, glicógeno fosforilasa A y tirosina fosfatasa-1B, además de presentar actividad antioxidante. Manifestando de esta forma, un mecanismo de acción multidirigido con mayores posibilidades de producir un control glicémico adecuado y, por lo tanto, poseer efectos beneficiosos en el tratamiento de la DMT2. Además, se pretende identificar los sustituyentes que permitan una mejor actividad dichas cumarinas.

1.2. Serie de cumarinas a estudiar

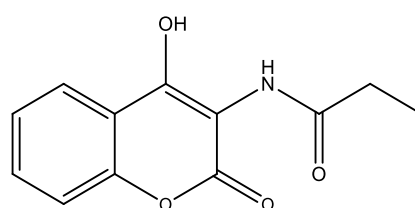
- a) Familia 1: amidocumarinas sustituidas en la posición 4 por un hidroxilo y en la posición 3 por el grupo amida. Cumarina 1 en la posición 3 posee una amina primaria en vez del grupo amida.



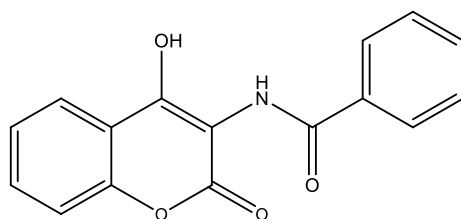
CUM1



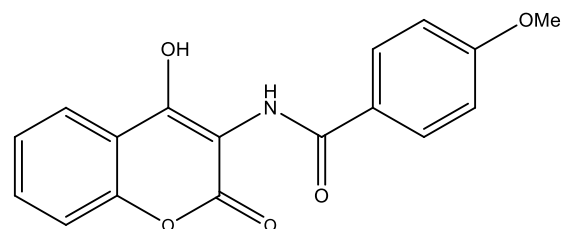
CUM2



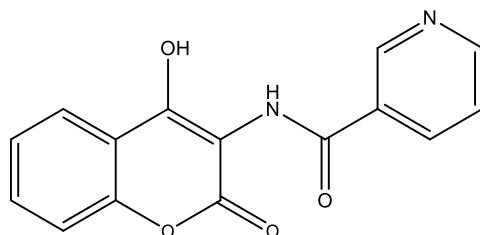
CUM3



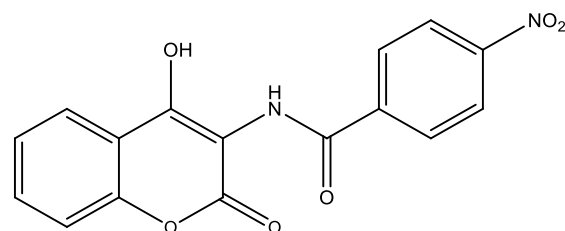
CUM4



CUM5

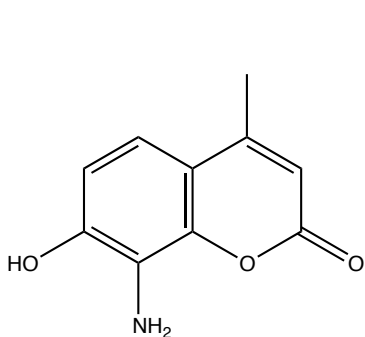


CUM6

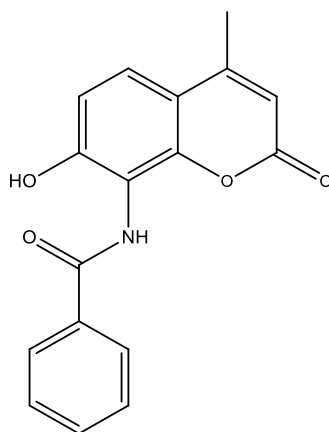


CUM7

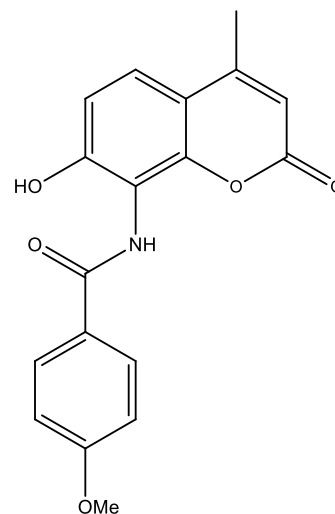
- b) Familia 2: amidocumarinas sustituidas en la posición 4 por un grupo metilo, en la posición 7 por un grupo hidroxilo y en la posición 8 por el grupo amida. La cumarina 8 posee un grupo amina primario en vez del grupo amida.



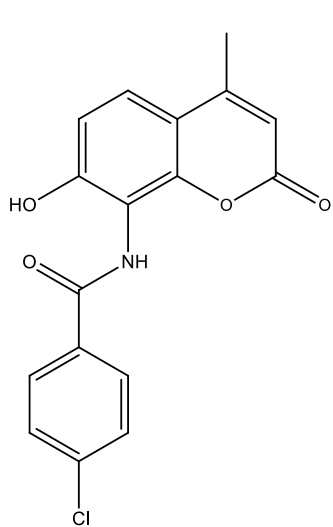
CUM8



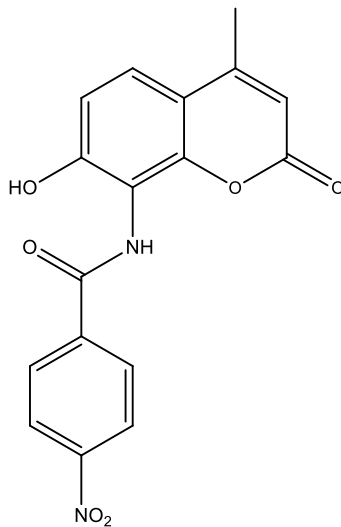
CUM9



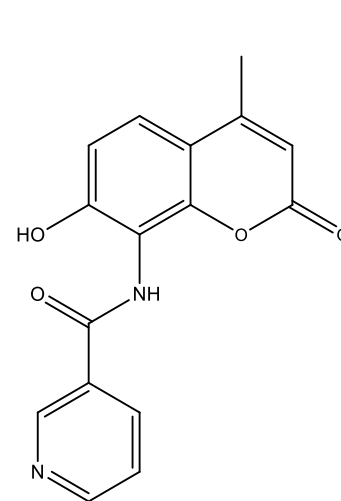
CUM10



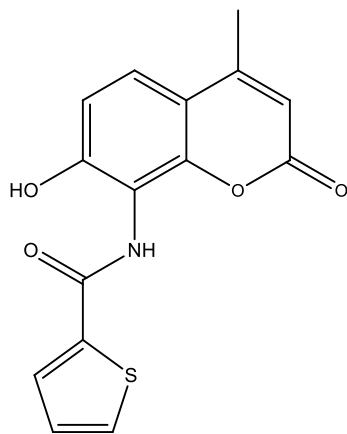
CUM11



CUM12

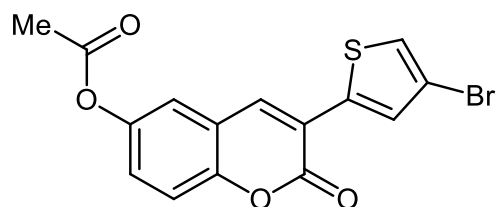


CUM13

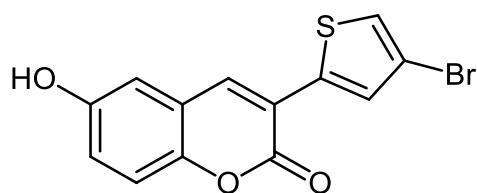


CUM14

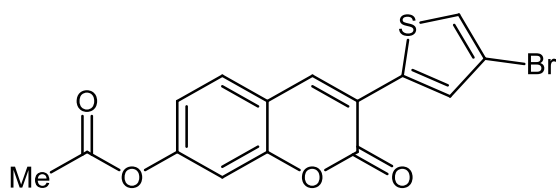
- c) Familia 3: bromotiofeno cumarinas sustituidas en 6 o en 7 con un grupo hidroxilo o un grupo éster y en la posición 3 por el grupo bromotiofeno. La cumarina 19 sólo posee el grupo bromotiofeno como sustituyente.



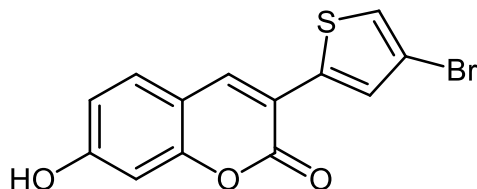
CUM15



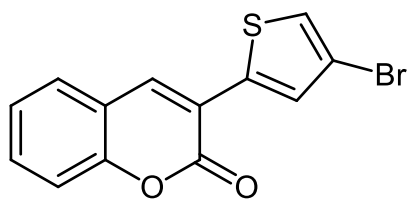
CUM16



CUM17



CUM18



CUM19

1.3. Hipótesis

- i. La potencia inhibitoria frente a la glicógeno fosforilasa A, α -glucosidasa y tirosina fosfatasa-1B de las cumarinas seleccionadas, depende de la presencia y posición de los sustituyentes tipo amidas e hidroxilos.
- ii. La potencia inhibitoria frente a la glicógeno fosforilasa A, α -glucosidasa y tirosina fosfatasa-1B de las cumarinas seleccionadas incrementa con la presencia de sustituyentes aromáticos y halógenos.
- iii. Las cumarinas seleccionadas presentan capacidad antioxidante al poseer grupos funcionales capaces de ceder átomos de hidrógeno o electrones y una estructura adecuada para estabilizar el electrón desapareado.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad inhibitoria sobre enzimas que participan en el control glicémico y evaluar la capacidad antioxidante de una nueva serie de cumarinas.

1.4.2. Objetivos Específicos

- i. Determinar la actividad inhibitoria de una serie de cumarinas frente a la actividad de la GP_a y α -glucosidasa, con el fin de seleccionar las estructuras químicas más activas que proseguirán con el estudio.
- ii. Determinar y analizar comparativamente las concentraciones inhibitorias cincuenta (CI₅₀) de las cumarinas seleccionadas, frente a la GP_a, α -glucosidasa y PTP-1B.
- iii. Determinar el tipo de inhibición enzimática ejercidas por las cumarinas con adecuada potencia inhibitoria (CI₅₀ determinado) frente a las enzimas en estudio, mediante el análisis de los gráficos de Lineweaver-Burk y los parámetros de K_m y V_{max} .
- iv. Identificar el sitio más probable de unión de las cumarinas en las respectivas enzimas, mediante el análisis de las energías de afinidad, cuantificadas por docking. Identificando también las interacciones inhibidor-enzima y los sustituyentes de las cumarinas más relevantes para la unión.
- v. Estudiar la actividad antioxidante *in vitro* de las cumarinas seleccionadas, frente a los radicales peroxilo e hidroxilo, mediante las técnicas de ORAC-FL y EPR respectivamente.
- vi. Evaluar la capacidad antioxidante celular de las cumarinas en células de macrófagos de ratón (RAW 264.7).

2. METODOLOGÍA

2.1. Selección de las muestras a estudiar

Se contaba con una biblioteca de nuevas cumarinas previamente sintetizadas por un grupo de colaboradores a cargo del profesor Eugenio Uriarte, en Santiago Compostela, España. Para seleccionar la serie de compuestos a estudiar, se realizó un análisis bibliográfico con el fin de asociar grupos funcionales (amidas, hidroxilos, halógenos, fenilos, piridinas, entre otros) presentes como sustituyentes en las cumarinas de la biblioteca y en otras cumarinas o moléculas de estructura similar que se les hubiese determinado actividad inhibitoria frente a las enzimas en estudio (α -glucosidasa, GPa, PTP-1B) (Figura 8). Secundariamente, se tuvo en cuenta para la selección, la estructura química de las cumarinas en cuanto a las características mínimas de un antioxidante (grupos conjugados y capacidad de resonancia electrónica, grupos donores de hidrógeno y/o electrones).

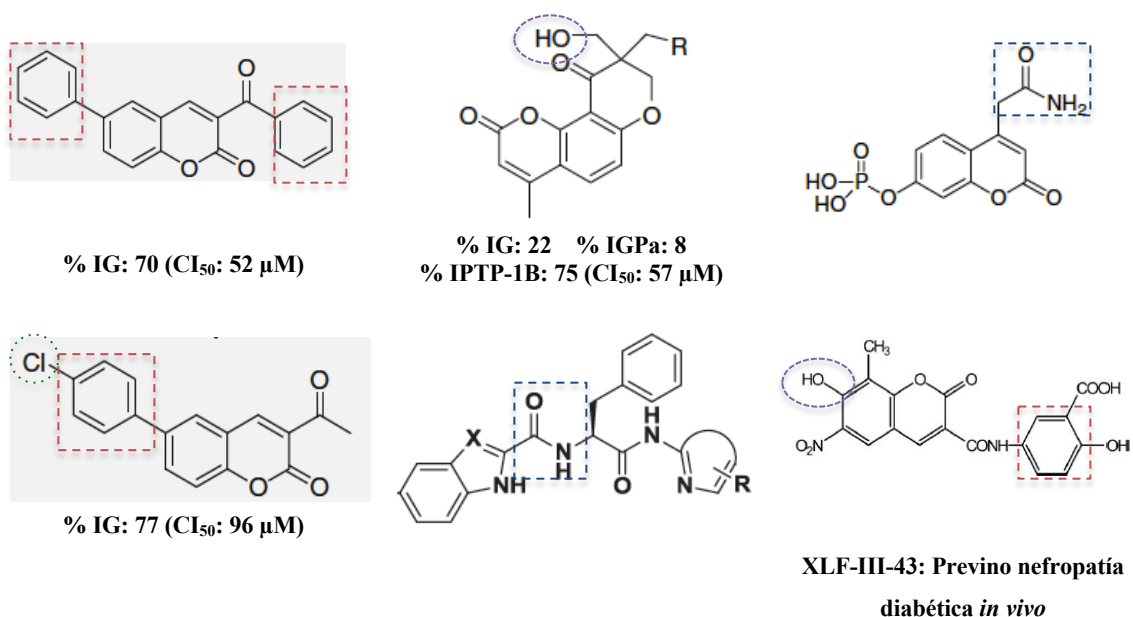


Figura 8. Sustituyentes comunes a cumarinas con actividades antidiabéticas demostradas. IG: inhibición de α -glucosidasa, IGPa: inhibición de GPa, IPTP-1B: inhibición de PTP-1B. Se destacan como sustituyentes grupos amidas (azul), fenilos (rojo), hidroxilos (morado), cloro (verde).

2.2. Inhibición enzimática *in vitro*

2.2.1. Ensayo de inhibición de α -glucosidasa

Consistió en un método espectrofotométrico, realizado en un lector de microplaca MULTISKAN GO 3.2, el ensayo se efectuó mediante modificaciones a las metodologías propuestas por Lordan et al., 2013 y Raju et al., 2010. El volumen final del ensayo fue de 230 μ L, para esto se adicionó en un pocillo de microplaca 120 μ L de tampón fosfato de sodio 100 mM a pH 6,8; 2,3 μ L de la solución de cumarina en DMSO (solvente a 1% de concentración final en pocillo); 17,7 μ L de agua milli-Q y 60 μ L de una solución del sustrato *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNPG) 5 mM, posteriormente se incubó a 37°C por 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se adicionó 30 μ L de una solución de enzima a 0,1 U/mL (proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*) y se determinó inmediatamente la absorbancia (A) a 400 nm (tiempo cero), luego se volvió a incubar a 37°C por 30 minutos, permitiendo la formación de *p*-nitrofenol (Figura 9), producto coloreado al cual se le determinó la A a 400 nm (tiempo 30), mediante el lector. Además, se midió las A de un control negativo, control no enzimático y un blanco, para determinar el porcentaje de inhibición de las cumarinas (Tabla 1). Se consideró como A final de la muestra la diferencia entre el tiempo 30 y 0, y se utilizó como inhibidor estándar, la acarbosa.

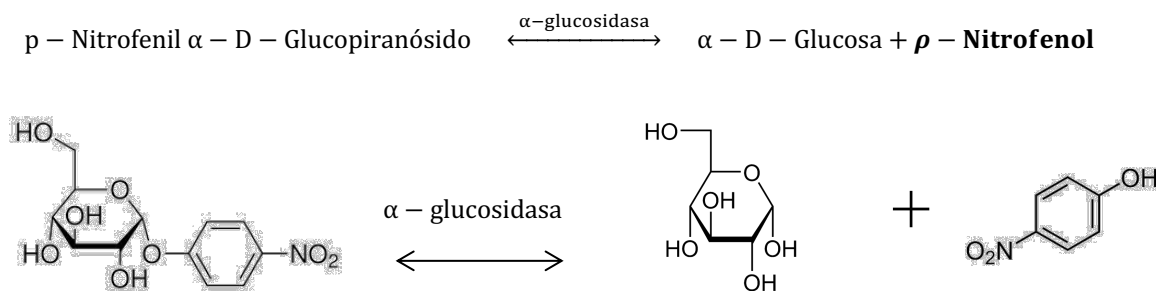


Figura 9. Fundamento químico para el ensayo de inhibición de α -glucosidasa. La enzima rompe el enlace glucosídico del sustrato, produciendo *p*-nitrofenol como producto que es de coloración amarillo.

Tabla 1. Protocolo de inhibición de α -glucosidasa

Reactivos	Blanco (μ L)	CNE (μ L)	CN (μ L)	Muestra (μ L)
Tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 6.8	150	150	120	120
DMSO 11,5%	20		20	
Muestra (DMSO)		2,3		2,3
Agua milli-Q		17,7		17,7
pNPG 5mM	60	60	60	60
	Incubar a 37°C por 5 min			
α -glucosidasa 0,1 U/mL			30	30
	A 400 nm			
	Incubar a 37°C por 30 min			
	A 400 nm			

DMSO: Dimetilsulfóxido; pNPG: p-Nitrofenil α -D-Glucopiranosido; CNE: control no enzimático; CN: control negativo

2.2.2. Ensayo de inhibición de GP_a

Consistió en un método espectrofotométrico, realizado en un lector de microplaca MULTISKAN GO. La actividad de la enzima proveniente de músculo de conejo, fue determinada en dirección a la síntesis de glicógeno a través de la liberación de fosfato desde glucosa-1-fosfato a 22°C (Figura 10). La reacción se llevó a cabo a un volumen final de 300 μ L, primero se adicionó 40 μ L de un medio tamponado (pH 7,2) que contenía HEPES (Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico) 50 mM; KCl 100 mM; MgCl₂ 2,5 mM y EGTA (ácido

tetraacético etilenglicol) 2,5 mM; luego se adicionó 3 μ L de la muestra (cumarina disuelta en DMSO, solvente a 1% de concentración final en pocillo), 17 μ L de agua milli-Q, 35 μ L de glicógeno 1mg/mL, 35 μ L de glucosa-1P 0,5 mM y 20 μ L de la enzima a 60 μ g/mL. Posteriormente, la mezcla se incubó a 22°C por 25 min y se adicionó 150 μ L de la solución de detención que contenía molibdato de amonio a 10 mg/mL y verde de malaquita a 0,38 mg/mL en medio ácido (ácido clorhídrico 1 M). Finalmente se volvió a incubar a 22°C por 20 min, permitiendo el desarrollo de un aducto de color verde entre el grupo fosfato y el verde de malaquita, el cual fue detectado en el lector de microplaca Multiskan GO, a una longitud de onda de 621 nm (Tabla 2). Junto a la muestra se evaluó un control negativo (sin inhibidor), un control no enzimático (sin enzima) y un blanco (sólo medio y sustrato). Además, como inhibidor estándar se utilizó la cafeína (Martin et al., 1998).

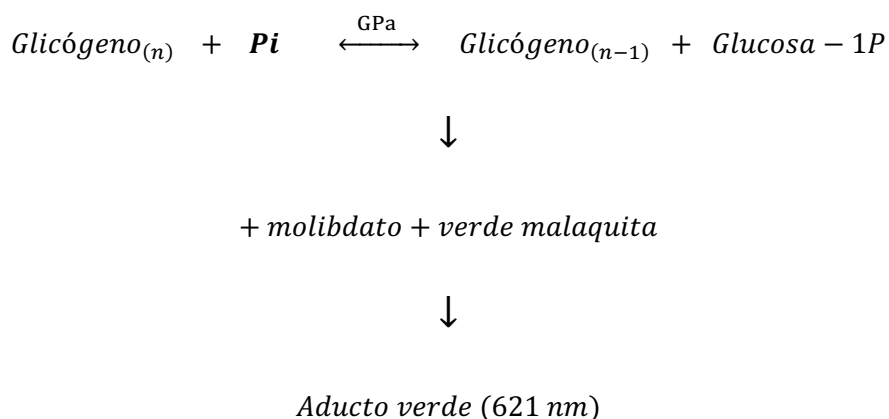


Figura 10. Fundamento químico para el ensayo de inhibición de GPa. Al aumentar las concentraciones de glucosa-1P la reacción se desplaza hacia los reactantes y el fósforo inorgánico producido reacciona con molibdato y verde malaquita para formar un aducto de coloración verde.

Tabla 2. Protocolo de inhibición de GPa

Reactivos	Blanco (μL)	CNE (μL)	CN (μL)	Muestra (μL)
BS (pH=7,2)	40	40	40	40
B HEPES 50 mM	90	90		
DMSO 14%	20		20	
Muestra (DMSO)		3		3
Agua milli-Q		17		17
Glicógeno 1mg/mL			35	35
G1P 0,5 mM			35	35
GPa 60 μg/mL			20	20
	Incubar por 25 min a 22°C			
SD	150	150	150	150
	Incubar por 20 min a 22°C			
	Medir A a 621 nm			

BS: tampón salino; B: tampón de HEPES; DMSO: dimetilsulfóxido; G1P: Glucosa-1-fosfato; GPa: Glicógeno fosforilasa A; SD: Solución de detención; CNE: Control no enzimático; CN: control negativo.

2.2.3. Ensayo de inhibición de la PTP-1B

Consistió en un método espectrofotométrico, realizado en un lector de microplaca MULTISKAN GO. El ensayo se desarrolló a un volumen final de 250 μL por pocillo, primero se adicionó 100 μL de un medio tamponado que contenía HEPES 50 mM, ditioneitol (DTT) 5 mM y NaCl 150 mM, a pH 7,2. Luego se adicionaron 2,5 μL de la muestra de cumarina en DMSO (solvente a 1% de concentración final en pocillo), 17,5 μL de agua milli-Q, 30 μL de la solución de enzima recombinante humana a 3,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 50 μL del sustrato *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) a 60 mM para luego incubar la mezcla a 37°C por 10 min. Finalmente, la reacción se detuvo al agregar 50 μL de NaOH 5M y se determinó la A del producto formado *p*-nitrofenol (Figura 11), a una longitud de onda de 405 nm. Para hacer el cálculo de inhibición fue necesario realizar las mediciones del control negativo, control no enzimático y blanco (Tabla 3). Además, se empleó como inhibidor estándar ortovanadato sódico (Ma et al., 2011).

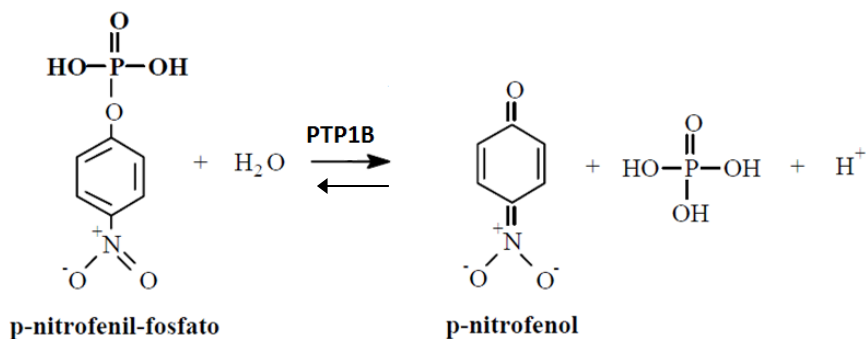


Figura 11. Fundamento químico para el ensayo de inhibición de PTP-1B. La enzima rompe el enlace fosfato del sustrato (*p*-nitrofenilfosfato), produciendo *p*-nitrofenol como producto que es de coloración amarillo.

Tabla 3. Protocolo de inhibición de PTP-1B

Reactivos	Blanco (μL)	CNE (μL)	CN (μL)	Muestra (μL)
Medio tamponado de HEPES (pH=7,2)	130	130	100	100
DMSO 12,5 %	20		20	
Muestra (DMSO)		2,5		2,5
Agua milli-Q		17,5		17,5
PTP1- β 3,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$			30	30
pNPP 60 mM	50	50	50	50
	Incubar a 37°C por 10 min			
NaOH 5M	50	50	50	50
	A 405 nm			

DMSO: Dimetilsulfóxido; PTP1- β : Tirosina fosfatasa-1B; pNPP: p-nitrofenil fosfato; CNE: Control no enzimático; CN: control negativo

Todas las mediciones enzimáticas se realizaron por triplicado. Para calcular el porcentaje de inhibición de las muestras se empleó la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Fórmula utilizada para calcular los porcentajes de inhibición enzimática

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(ACN - AB) - (AM - ACNE)}{(ACN - AB)} \times 100$$

A_{CN} = Absorbancia del control negativo (sin inhibidor), A_B = Absorbancia del blanco (sin inhibidor y sin enzima), A_M = Absorbancia de la muestra y A_{CNE} = Absorbancia del control no enzimático (sin enzima).

2.3. Cinética de Inhibición enzimática

Se determinó el tipo de inhibición (inhibición competitiva, no competitiva, acompetitiva o mixta) ejercida por las cumarinas activas sobre las enzimas en estudio, mediante la determinación y la comparación de las velocidades máximas (V_{max}) y las constantes de Michaelis Menten (K_m) alcanzadas por las cumarinas y el control negativo (sin inhibidor), además de un análisis de los gráficos de Lineweaver-Burk obtenidos. Para lo cual se trabajó con seis concentraciones distintas del respectivo sustrato y se evaluaron las muestras (cumarinas disueltas en DMSO) y los inhibidores estándar utilizados a tres concentraciones diferentes, según los CI_{50} obtenidos. Los ensayos se llevaron a cabo mediante el lector de microplaca MULTISKAN GO, utilizando un bucle cinético, el cual registraba los valores de absorbancia cada 30 segundos hasta completar el tiempo de incubación final para cada enzima en particular. Todos los resultados se realizaron por triplicado.

2.3.1. Para α -glucosidasa

Se utilizó la misma metodología descrita para obtener los CI_{50} de los compuestos. Las concentraciones del sustrato p -nitrofenil- α -D-glucopiranosido utilizadas fueron 5, 4, 3, 2, 1 y 0,5 mM. Una vez agregada la enzima se empezó el bucle cinético durante 30 minutos (60 mediciones).

2.3.2. Para GPa

Se utilizó la misma metodología descrita para obtener los CI_{50} de los compuestos, pero omitiendo la incubación. La enzima se utilizó a 25 μ g/mL y el sustrato (glucosa-1P) se evaluó a 1,5;1,25;1;0,75;0,5 y 0,25 mM. Una vez agregada la solución de detención se inició el bucle cinético durante 20 minutos (40 mediciones).

2.3.3. Para PTP-1B

Se utilizó la misma metodología descrita para obtener los CI_{50} de los compuestos, pero omitiendo la incubación, de esta forma se midió la acción de la enzima sobre el sustrato desde el inicio; y sin agregar el NaOH (agente finalizador de la reacción). Las concentraciones del sustrato p -nitrofenilfosfato utilizadas fueron 65, 55, 45, 30, 20 y 15 mM. Una vez agregado el sustrato se empezó el bucle cinético durante 45 minutos (90 mediciones).

De los gráficos de absorbancia *versus* tiempo obtenidos, se realizaron regresiones lineales con los primeros datos de la cinética (hasta obtener el mejor R^2) con el fin de obtener la pendiente de las rectas, que corresponde a la velocidad inicial de las enzimas (V_0). Luego, de los gráficos de los dobles recíprocos se realizó una segunda regresión lineal para obtener los valores de $1/V_{max}$ y $-1/K_m$.

2.4. Análisis computacional mediante Docking

Se proyectaron las estructuras químicas de las cumarinas utilizando el programa GaussView 5.0.9. Las estructuras se minimizaron energéticamente y se les calculó las cargas empleando el programa RED-III.4 utilizando su estado de protonación apropiado. Las conformaciones más estables se utilizaron como archivos de ligandos para el estudio de docking mediante las herramientas de AutoDock 4.0, removiendo los hidrógenos no polares y determinando los puntos de torsión. La misma herramienta fue usada para preparar los archivos de las proteínas, agregando los hidrógenos polares a la estructura. El estudio de docking fue desarrollado mediante el programa Autodock Vina 1.1.2, el cual utiliza la función empírica de evaluación de la energía libre. Además, en todos los casos la proteína se consideró rígida y el tamaño de la caja (bolsillo de unión para el ligando) fue de 20 Å X 20 Å X 20 Å. Para cada ligando, solo la posición más probable fue considerada y se promediaron las afinidades de unión estimadas. Finalmente, se determinaron diferentes interacciones polares y apolares entre la proteína y algunas cumarinas (con alta y baja actividad inhibitoria experimental) a una distancia igual o menor a 5 Å utilizando el programa VMD, con la finalidad de dilucidar las interacciones más importantes e identificar grupos funcionales de importancia para los inhibidores.

2.4.1. Para α -glucosidasa

Dado que la estructura 3D de la α -(1,4)-glucosidasa no está disponible aún, se realizó un modelo de homología mediante el programa Swissmodel expasy. Para desarrollarlo, la secuencia aminoacídica de α -(1,4)-glucosidasa fue obtenida a partir del servidor UniProt (código de acceso P53341) (Khairunissa et al., 2015; Chaudhry et al., 2017). Para seleccionar el templado más adecuado a utilizar en el modelamiento de la enzima, el algoritmo BLAST fue ejecutado, con la finalidad de comparar la secuencia de la enzima con una biblioteca y así identificar secuencias que se asemejan, utilizando la base de datos pdb no redundante. Como resultado del BLAST, la estructura cristalina de la isomaltasa [α -(1,6)-glucosidasa] de *S. cerevisiae* (PDB: 3AJ7) fue utilizada como templado de la α -(1,4)-glucosidasa, las cuales son 72% idénticas. Luego, el servidor Clustal Omega fue utilizado para desarrollar el alineamiento de la secuencia

proteica, que posteriormente se utilizaría para el modelamiento de la proteína. Para el estudio de docking en esta enzima se utilizaron dos bolsillos posibles de unión, el sitio catalítico con el aminoácido Phe157 como centro de la caja y un segundo bolsillo de carácter hidrofóbico con el aminoácido Thr533 como centro de la caja (Azam et al., 2012).

2.4.2. Para GPa

En el estudio de docking se utilizó la estructura cristalina PDB: 2IEI obtenida del servidor Protein Data Bank y se analizaron cuatro bolsillos de unión, el sitio catalítico de la enzima (centrado en His377), el sitio inhibidor (centrado en Phe285), el sitio alostérico (centrado en Phe196) y el sitio de interfaz dimérica (centrado en Tyr613) (Zhang et al., 2012; Tsitsanou et al., 2000; Tsitsanou et al., 2013).

2.4.3. Para PTP-1B

En el estudio de docking se utilizó la estructura cristalina PDB: 1NL9 obtenida del servidor Protein Data Bank y se analizaron dos bolsillos, el sitio catalítico de la enzima, centrado en el aminoácido Lys120, y el sitio alostérico, centrado en Phe196 (Tang et al., 2013).

2.5. Actividad antioxidante *in vitro*

2.5.1. Ensayo ORAC-FL

La capacidad antioxidante fue llevada a cabo en un lector de microplaca Synergy HT y la fluorescencia fue leída desde arriba con una longitud de onda de excitación de 485 nm y un filtro de emisión de 528 nm. La reacción fue realizada en tampón fosfato de sodio 75 mM (pH 7,0) a un volumen final de 200 µL, para lo cual se agregó a cada pocillo 25 µL de la solución de cumarinas (en MeOH/H₂O) o 25 µL del tampón fosfato según correspondía y 150 µL de la

solución de FL a 0,016 $\mu\text{g/mL}$ (disuelta en tampón fosfato), luego la mezcla se preincubó por 7 min y se le añadió rápidamente 25 μL de la solución de 2,2-azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro (AAPH, a 40,7 mg/mL y disuelto en tampón fosfato), fuente de radical peroxilo. Finalmente, se incubó la mezcla por 15 min a 40°C para posteriormente medir la fluorescencia cada 1 min por 120 min (Tabla 4). Para cada ensayo se ocuparon cinco concentraciones de cada cumarina en un rango de 0,5-15 μM en placa, y como molécula estándar se ocupó 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox). La capacidad antioxidante fue expresada como índices ORAC, utilizando las pendientes obtenidas de las cumarinas y el trolox, las cuales fueron cuantificados por la integración del área bajo la curva de decaimiento de la FL (ABCFL), restándole el ABC del blanco. Todas las mediciones se realizaron con tres replicados (Pérez et al., 2013 a).

Tabla 4. Protocolo del ensayo ORAC-FL

Reactivos	Blanco (μL)	Muestra (μL)
Tampón Fosfato 75 mM pH=7,0	25	
Muestra		25
FL 0,016 $\mu\text{g/MI}$	150	150
	Incubar 40°C por 7 min	
AAPH 40,7 mg/mL	25	25
	Incubar 40°C por 15 min	
	Medir fluorescencia por 2h	

FL: Fluoresceína

Para calcular los índices ORAC, se relacionan las pendientes obtenidas por las muestras, con la pendiente obtenida por el estándar (trolox), mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 2. Cálculo de los índices ORAC

$$\text{Índice ORAC} = \frac{\text{Pendiente obtenida por la cumarina}}{\text{Pendiente obtenida por el Trolox}}$$

Los valores de las pendientes se obtuvieron tras graficar el ABC versus el tiempo (en segundos) de las distintas concentraciones de las muestras evaluadas.

2.5.2. Ensayo de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

La reactividad de la serie de cumarinas frente al radical hidroxilo fue llevada a cabo utilizando la técnica de EPR, mediante un sistema fenton no catalítico y un sistema fotolítico. En ambos ensayos propuestos, se utilizó como atrapador (*spin trap*) la molécula 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), la cual compite con la muestra antioxidante adicionada, por el radical hidroxilo para formar un aducto con éste. De esta forma al adicionar las cumarinas al sistema (a 2,5 mM) se espera reducir la intensidad del espectro de resonancia de espín electrónica (REE) formado por el aducto DMPO-OH (señal blanco) (Pérez et al., 2013 a; Pérez et al., 2013 b).

Para el sistema de Fenton no catalítico se empleó metanol como blanco, 50 µL de las muestras de cumarinas a 2,5 mM, 50 µL de NaOH 25 mM, 50 µL de DMPO 200 mM y finalmente se agregó 50 µL de H₂O₂ 10%, tras lo cual se contabilizó 5 min para proceder con la lectura en el equipo (Tabla 5).

Para el ensayo fotolítico se obtuvo el radical hidroxilo por fotólisis, para lo cual se empleó metanol como blanco, 150 µL de H₂O₂ (al 1%), 50 µL de DMPO (200 mM) y 50 µL de la muestra de cumarina (a 2,5 mM); agregados todos los reactivos, la mezcla se fotolisa (con

radiación UV de lámpara de deuterio) durante 5 min y se procede a la lectura de las señales (Tabla 6).

Los REE se registraron en banda X (9.8 GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106, equipado con cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo. Las constantes de acoplamiento experimentales fueron obtenidas mediante simulación de espectros usando un programa WINEPR SimFonia Versión 1.25 y estimadas con una precisión de 0,05 G.

Todas las muestras fueron evaluadas con 2 réplicas y los resultados se expresaron como un porcentaje de apagamiento, el cual fue calculado con la disminución del ABC provocada por las muestras antioxidantes. A su vez, el ABC se obtuvo al integrar dos veces la intensidad de la señal otorgada por el equipo.

Tabla 5. Protocolo del ensayo EPR no catalítico

Reactivos	Blanco (µL)	Muestra (µL)
Metanol	150	100
Muestra a 2,5 mM		50
NaOH 25 mM	50	50
DMPO 200 mM	50	50
H ₂ O ₂ 10%	50	50
	Espera 5 min	
	Lectura	

Tabla 6. Protocolo del ensayo EPR fotolítico

Reactivos	Blanco (µL)	Muestra (µL)
Metanol	100	50
Muestra a 2,5 mM		50
DMPO 200 mM	50	50
H ₂ O ₂ 10%	150	150
	Fotolisa 5 min	
	Lectura	

2.6. Actividad antioxidante celular (AAC)

Para evaluar la actividad antioxidante en células, se utilizaron células RAW 264.7 (provenientes de ratón) las cuales fueron sembradas con una densidad de 50000 células por pocillo, en microplacas de 96 pocillos con medio de cultivo RPMI 1640. Después de 24 h el medio fue removido y los pocillos fueron lavados con tampón fosfato salino (PBS). Los pocillos fueron incubados durante 20 min (estufa a 37°C y 5 % CO₂) con 100 µL de la sonda dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA) a 20 µM, disuelta en buffer fosfato salino a pH 7,4. Luego los pocillos se lavaron con PBS y se agregaron 100 µL de buffer fosfato salino y 100 µL de las cumarinas a una concentración final de 1 y 10 µM (disueltas en el mismo medio tamponado) durante 30 min. Se utilizaron dichas concentraciones para los compuestos, ya que otras cumarinas de similar estructura habían sido previamente evaluadas bajo las mismas condiciones, con resultados favorables. Transcurrido el tiempo, los pocillos nuevamente se lavan con PBS. Finalmente, se agregó 100 µL de una solución de AAPH en medio salino a una concentración final de 600 µM para medir la fluorescencia en un lector de microplacas Synergy HT, Bio-Tek Instruments. La emisión a 528 nm fue medida con una excitación a 485 nm cada 1 min durante 1 h (López-Alarcón & Denicola, 2013; Wolfe & Liu, 2007; Figueroa Guíñez Roberto, 2014).

Todas las muestras se evaluaron por triplicado e incluyeron un control (células tratadas con DCFH-DA y AAPH, sin cumarinas).

Para la cuantificación de la actividad antioxidante celular de las cumarinas, se calculó el ABC del gráfico de fluorescencia *vs* tiempo y se comparó con el control.

2.7. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como el promedio de las mediciones realizadas \pm DS. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de una vía, seguidos del método de comparaciones múltiples de Tukey, utilizando el programa GraphPad Prism 6 y se consideraron los resultados significativos para valores de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Ensayo preliminar de inhibición de la actividad enzimática sobre α -glucosidasa y GPa

Se realizó a una concentración masa/volumen determinada ($7 \mu\text{g/mL}$), de acuerdo a la cantidad disponible de las cumarinas en ese momento. Al expresar las concentraciones en micromolar, éstas varían en un rango de $17\text{-}38 \mu\text{M}$; esta actividad fue realizada con el fin de seleccionar los derivados más activos que proseguirán con el estudio de la determinación de la potencia inhibitoria (CI_{50}) y de la actividad antioxidante.

Los resultados se expresaron como porcentajes de inhibición de la actividad enzimática y se observan en la Figura 12 y 13.

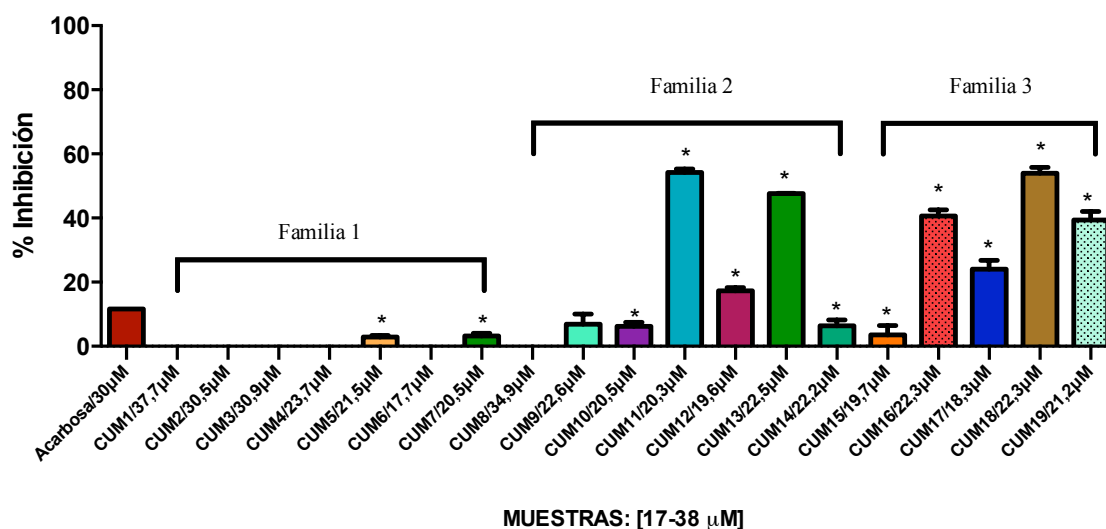


Figura 12. Porcentaje de inhibición de la actividad de α -glucosidasa. * = Diferencias significativas con respecto al inhibidor estándar, utilizando test ANOVA seguido por comparaciones múltiples de Tukey, considerando un $p \leq 0,05$.

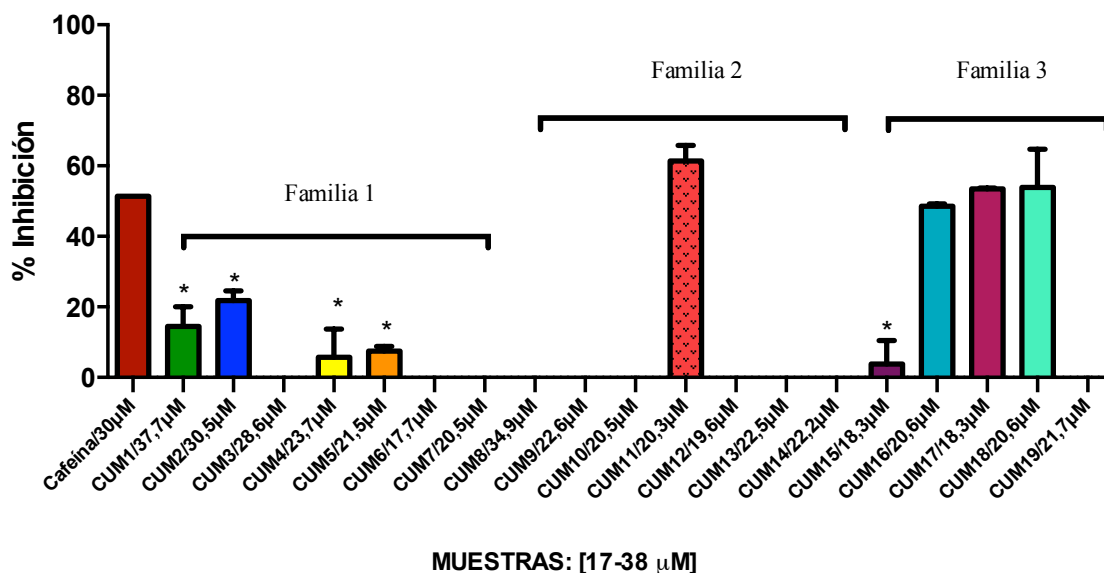


Figura 13. Porcentaje de inhibición de la actividad de GPα. * = diferencias significativas con respecto a cafeína, utilizando el test ANOVA seguido por comparaciones múltiples de Tukey, considerando un $p \leq 0,05$.

A partir de los resultados de esta evaluación preliminar, se observaron claras diferencias entre las distintas muestras, distinguiendo cumarinas sin actividad, con baja actividad inhibitoria (menos de 20%) o gran capacidad inhibitoria enzimática (más de 50%), a las concentraciones evaluadas.

- En el ensayo de inhibición de la actividad de la α -glucosidasa, se observó inhibición de la actividad por parte de trece cumarinas, de las cuales una molécula (CUM 9) fue comparable al inhibidor estándar (acarbose), mientras que siete moléculas (CUM 11, CUM 12, CUM 13, CUM 16, CUM 17, CUM 18 y CUM 19) exhibieron una capacidad inhibitoria mayor que la acarbose (Figura 12).
- En el ensayo de inhibición de la actividad de la GPα, se pudo observar que nueve cumarinas inhibieron a la enzima, pero de éstas sólo cuatro cumarinas (CUM 11, CUM

16, CUM 17 y CUM 18) demostraron una capacidad de inhibición comparable al inhibidor estándar utilizado, cafeína (Figura 13).

- Algunos derivados mostraron un alto porcentaje de inhibición de la actividad para ambas enzimas, como son las CUM 11, CUM 16, CUM 17 y CUM 18.
- En general las cumarinas de la familia 3 fueron las que exhibieron los mejores resultados en términos de capacidad inhibitoria de la actividad de ambas enzimas.

Luego de analizar ambos resultados preliminares, se seleccionaron las cumarinas más activas, según la capacidad inhibitoria frente a α -glucosidasa y/o GPa, incluyendo las cumarinas de las tres familias. En el listado siguiente se muestran las cumarinas seleccionadas y el criterio de selección para continuar con los estudios enzimáticos y antioxidantes propuestos.

CUM 2: fue seleccionada ya que fue la cumarina de la familia 1 que presentó el mayor porcentaje de inhibición de la actividad de GPa.

CUM 5: fue seleccionada por ser la única cumarina de la familia 1 que inhibió la actividad tanto de GPa como de α -glucosidasa.

CUM 9: cumarina perteneciente a la familia 2, fue seleccionada porque su actividad inhibitoria de la α -glucosidasa fue comparable con la exhibida por la acarbosa y permite una discusión interesante en comparación a CUM 11, ya que la única diferencia estructural entre ambas es un sustituyente cloro (presente en CUM 11 y ausente en CUM 9), que se traduce en diferencias en la actividad inhibitoria frente a ambas enzimas (es menos potente para inhibir α -glucosidasa y no presentó actividad inhibitoria frente a GPa).

CUM 11: se seleccionó porque es la única cumarina de la familia 2, que inhibió la actividad de ambas enzimas en un gran porcentaje (mayor al 50%), destacándose entre la serie de cumarinas.

CUM 12: se seleccionó por ser una de las tres moléculas de la familia 2 con mayor actividad inhibitoria frente α -glucosidasa (junto a CUM 11 y CUM 13), superando a la acarbosa a la concentración evaluada.

CUM 13: cumarina de la familia 2 que fue seleccionada por ser una de las tres estructuras (junto a CUM 11 y CUM 12) con mayor actividad inhibitoria frente α -glucosidasa. Inhibe en un buen porcentaje (aproximadamente 50%) a la α -glucosidasa, superando a la acarbosa a la concentración evaluada.

CUM 16: cumarina de la familia 3 que fue seleccionada por exhibir una importante capacidad inhibitoria (aproximadamente 50%) frente ambas enzimas, destacándose en su familia.

CUM 17: cumarina perteneciente a la familia 3 que fue seleccionada por su capacidad inhibitoria frente a GPa (aproximadamente 50%) además de inhibir a la α -glucosidasa.

CUM 18: cumarina perteneciente a la familia 3 seleccionada por presentar una capacidad inhibitoria mayor al 50% frente ambas enzimas, destacándose entre la serie de cumarinas.

CUM 19: cumarina perteneciente a la familia 3 que logró inhibir la actividad de α -glucosidasa en aproximadamente 40%, superando el efecto mostrado por la acarbosa a la concentración evaluada y además permite realizar discusiones estructurales interesantes ya que es la única cumarina seleccionada de dicha familia que no presenta otros sustituyentes diferentes al bromotiofeno.

Por lo tanto, las cumarinas seleccionadas para continuar con esta investigación son, dos moléculas de la familia 1 (CUM 2 y CUM 5), cuatro moléculas de la familia 2 (CUM 9, CUM 11, CUM 12 y CUM 13) y cuatro moléculas de la familia 3 (CUM 16, CUM 17, CUM 18 y CUM 19).

3.2. Estudios frente a α -glucosidasa

3.2.1. Ensayo de inhibición de la actividad de α -glucosidasa

Las cumarinas seleccionadas a partir de los resultados del ensayo preliminar, fueron evaluadas en distintas concentraciones con el fin de determinar la potencia inhibitoria, expresada como CI_{50} . En la Figura 14 se observan gráficos de inhibición vs concentración de acarbosa, CUM11 y CUM16.

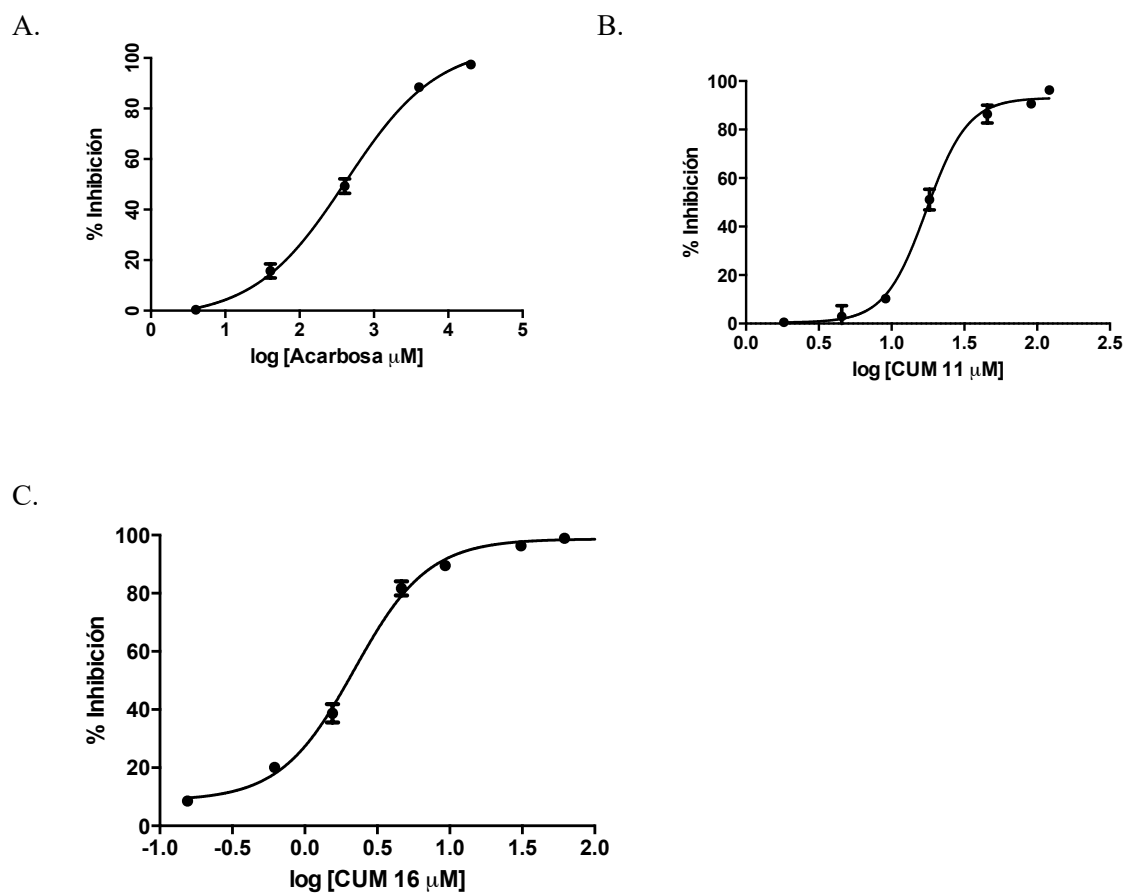


Figura 14. Porcentajes de inhibición de la actividad de α -glucosidasa vs concentración (μ M) del inhibidor. A: inhibidor estándar utilizado (acarbose); B: cumarina 11; C: cumarina 16.

La actividad inhibitoria frente a la α -glucosidasa de las cumarinas seleccionadas, se resumen en la Tabla 7 y Figura 15.

Tabla 7. Concentración efectiva cincuenta (CI₅₀) de las muestras frente a α -glucosidasa

MUESTRAS	CI ₅₀ (μ M)	DS
CUM 2	N.C (↑ 1,2 %)	--
CUM 5	270,80	0,90
CUM 9	N.C (↑ 19,8 %)	--
CUM 11	17,45	0,98
CUM 12	N.C (↑ 9,5 %)	--
CUM 13	N.C (↑ 15,4 %)	--
CUM 16	2,19	0,17
CUM 17	19,89	2,12
CUM 18	18,45	0,30
CUM 19	35,08	1,00
ACARBOSA	435,33	42,96

DS: desviación estándar, N.C: No cuantificable, ↑: % inhibición máximo obtenido

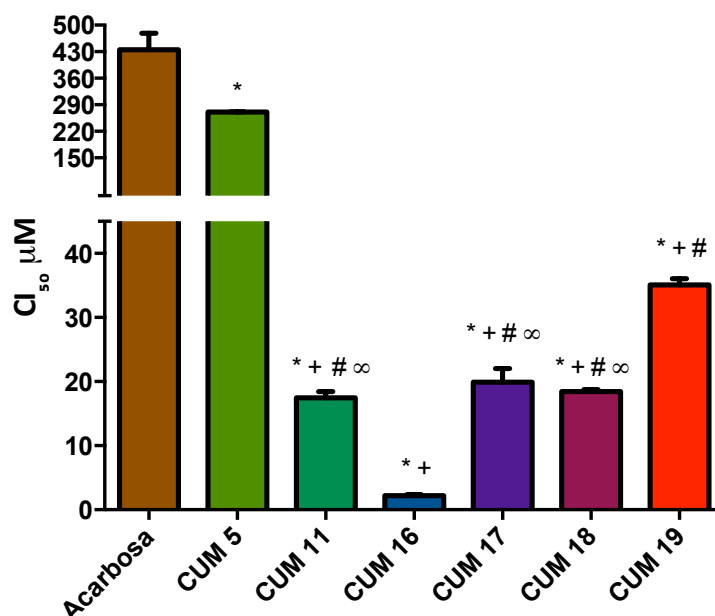


Figura 15. CI₅₀ de los inhibidores para α -glucosidasa y análisis estadístico. * = diferencias significativas con respecto a la acarbosa, + = diferencias significativas con respecto a CUM 5, # = diferencias significativas con respecto a CUM 16 y ∞ = diferencias significativas con respecto a CUM 19, utilizando el test de ANOVA, seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey considerando un $p \leq 0,05$. CUM: cumarina.

Al analizar los resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de la α -glucosidasa podemos discutir lo siguiente:

Todas las cumarinas fueron capaces de inhibir la actividad de la α -glucosidasa, pero sólo seis moléculas fueron lo suficientemente eficaces como para determinar sus CI₅₀. Las seis cumarinas con importante actividad inhibitoria (CUM 5, CUM 11, CUM 16, CUM 17, CUM 18 y CUM 19), que se observan en la Figura 15, fueron todas significativamente más potentes que el fármaco de referencia, acarbosa. CUM 16 fue la cumarina más potente como inhibidora de la actividad de la α -glucosidasa y supera la potencia de la acarbosa en aproximadamente 200 veces.

Al comparar los resultados entre las cumarinas, se observó que la CUM 5 es la menos potente de las seis, diferenciándose en forma significativa del resto. La CI₅₀ obtenida para la CUM 11 no presentó diferencias significativas con las CI₅₀ de las CUM 17 y CUM 18. Tampoco se

observaron diferencias significativas entre la actividad de las CUM 17 y CUM 18. La CUM 16 se diferencia de forma significativa de las demás cumarinas, siendo por lo menos 10 veces más potente.

Si analizamos estructuralmente la serie de cumarinas activas, se observó en las cumarinas que pertenecen a la familia 1 que al agregar un grupo metoxifenil como sustituyente de la cumarina, la actividad frente a la α -glucosidasa se ve favorecida (CUM 5 posee efecto inhibidor a diferencia de CUM 2); lo mismo se observó si se agrega un sustituyente clorofenil a la estructura de las cumarinas pertenecientes a la segunda familia (CUM 11 posee efecto inhibidor a diferencia de CUM 9, esta última no posee el átomo cloro). Si analizamos ahora las cumarinas que pertenecen a la familia 3, vemos que en general todas poseen una excelente actividad frente a esta enzima y lo que caracteriza justamente a estas moléculas, es la presencia de un grupo bromotiofeno como sustituyente de las cumarinas. Además, se evidenció en esta familia que, si se agrega un grupo hidroxilo en la posición 6 de la cumarina, la potencia aumenta de forma considerable (CUM 16).

3.2.2. Cinética de inhibición enzimática de la α -glucosidasa

En la Tabla 8 se muestran los valores de V_{\max} y K_m obtenidos, junto a las diferencias significativas encontradas y en la Figura 16 se observan los gráficos de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos de las seis cumarinas con mayor efecto inhibitorio de la actividad de la α -glucosidasa (CUM 5, CUM 11, CUM 16, CUM 17, CUM 18 y CUM 19) y la acarbosa.

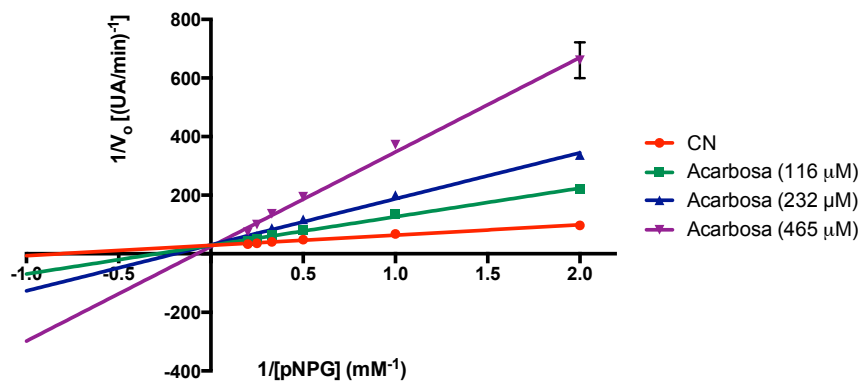
Tabla 8. Valores de V_{max} y K_m de los inhibidores de la actividad de α -glucosidasa

Muestras (μM)	V_{max} (UA/min) \pm D.S	K_m (mM) \pm D.S
CN	0,035 \pm 0,002	1,22 \pm 0,06
CUM 5 (48)	0,024 \pm 0,001 *	1,01 \pm 0,02
CUM 5 (80)	0,023 \pm 0,002 *	0,97 \pm 0,18
CUM 5 (97)	0,027 \pm 0,003	1,28 \pm 0,19
CUM 11 (9)	0,041 \pm 0,041	1,75 \pm 0,24
CUM 11 (18)	0,031 \pm 0,001	1,34 \pm 0,06
CUM 11 (36)	0,032 \pm 0,003	1,69 \pm 0,37
CUM 16 (1,5)	0,029 \pm 0,002	1,21 \pm 0,09
CUM 16 (3)	0,023 \pm 0,003 *	1,23 \pm 0,32
CUM 16 (6)	0,018 \pm 0,001 *	0,97 \pm 0,15
CUM 17 (10)	0,034 \pm 0,003	1,19 \pm 0,05
CUM 17 (12)	0,032 \pm 0,003	1,26 \pm 0,15
CUM 17 (14)	0,034 \pm 0,005	1,77 \pm 0,63
CUM 18 (8)	0,035 \pm 0,003	1,00 \pm 0,22
CUM 18 (16)	0,030 \pm 0,004	1,37 \pm 0,40
CUM 18 (32)	0,021 \pm 0,002 *	0,97 \pm 0,26
CUM 19 (16)	0,040 \pm 0,001	1,23 \pm 0,20
CUM 19 (33)	0,033 \pm 0,004	0,64 \pm 0,52
CUM 19 (65)	0,019 \pm 0,006 *	0,43 \pm 0,11
Acarbosa (116)	0,035 \pm 0,002	0,29 \pm 0,03
Acarbosa (232)	0,033 \pm 0,002	5,18 \pm 0,28 *
Acarbosa (465)	0,030 \pm 0,004	9,13 \pm 1,89 *

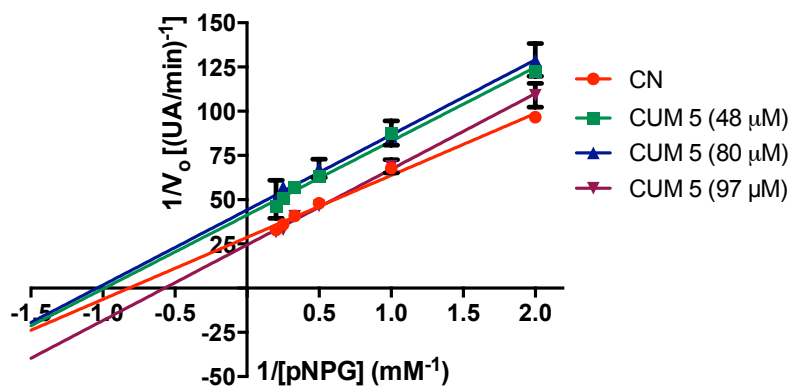
CN: control negativo (sin inhibidor), V_{max} : velocidad máxima enzimática, K_m : constante de Michaelis Menten, S.D.: desviación estándar, UA: unidades de absorbancia, min: minutos. * representa diferencias significativas con el control negativo, según el test ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Tukey.

Luego de un análisis tanto numérico como gráfico se estableció un modelo de inhibición competitiva para la acarbosa, ya que aumenta la K_m de forma significativa con respecto al control negativo (sin inhibidor), mientras que no altera significativamente la V_{max} . Además, las intersecciones de las rectas ocurren en el eje de las ordenadas. Por lo tanto, acarbosa se une al sitio catalítico de la α -glucosidasa, compitiendo con el sustrato pNPG. Con respecto a CUM 5, ésta disminuye la V_{max} de forma significativa y también disminuye la K_m , además, las rectas se ven paralelas entre sí, considerándose un tipo de inhibición acompetitivo, sin embargo, a la concentración mayor evaluada, la disminución de la V_{max} está acompañada por un aumento de la K_m , actuando por lo tanto, como inhibidor mixto a dicha concentración (Figura 16 B). CUM 11 disminuye la V_{max} y aumenta la K_m a las dos concentraciones superiores, además la intersección de las rectas se observa en el segundo cuadrante, a la izquierda del eje de las ordenadas, actuando por lo tanto como un inhibidor de tipo mixto de la α -glucosidasa, en cambio a la concentración menor evaluada no logra disminuir la V_{max} (Figura 16 C). CUM 16 a las dos concentraciones mayores disminuye la V_{max} de forma significativa, sin alterar la K_m y gráficamente se observa que la intersección de las rectas ocurre en el eje de las abscisas, actuando como inhibidor no competitivo (Figura 16 D). Sin embargo, a la concentración mayor se observa además, una disminución importante de la K_m . CUM 17 aumenta la K_m y disminuye en menor medida la V_{max} , además la intersección de las rectas ocurre a la derecha del eje de las ordenadas, actuando como inhibidor mixto (Figura 16 E). CUM 18 no altera los parámetros cinéticos de forma clara, por lo que no se pudo determinar el tipo de inhibición ejercida (Figura 16 F). CUM 19 a las concentraciones más elevadas disminuye tanto la V_{max} como la K_m , actuando como un inhibidor acompetitivo, sin embargo, a la concentración menor no se observa un efecto claro (Figura 16 G).

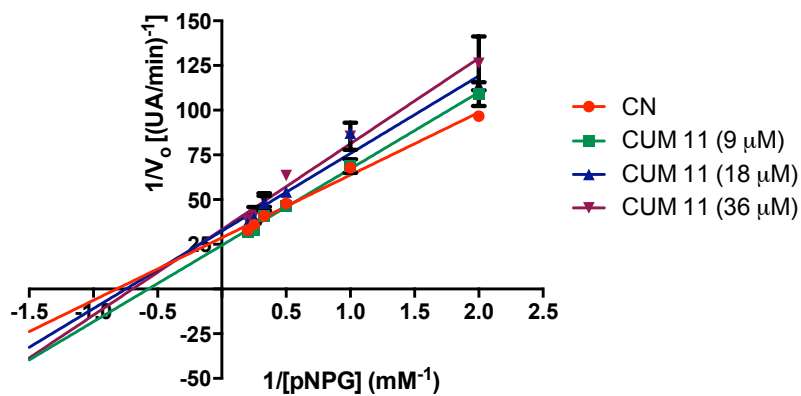
A.



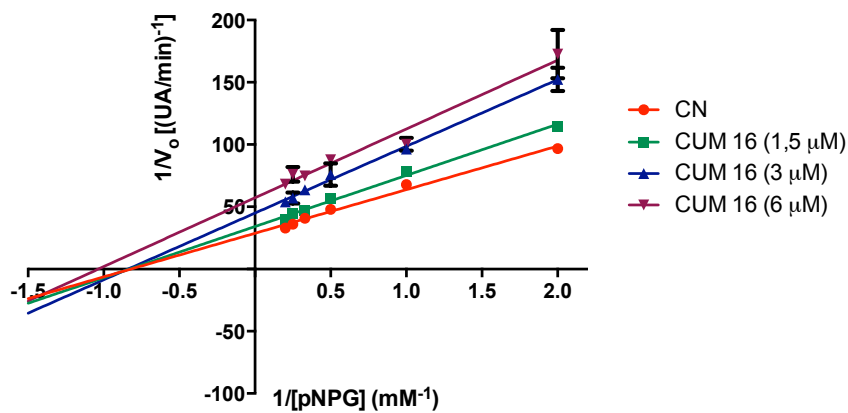
B.



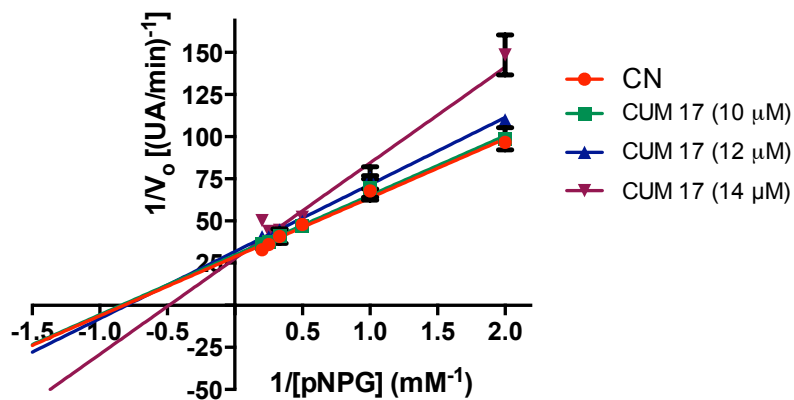
C.



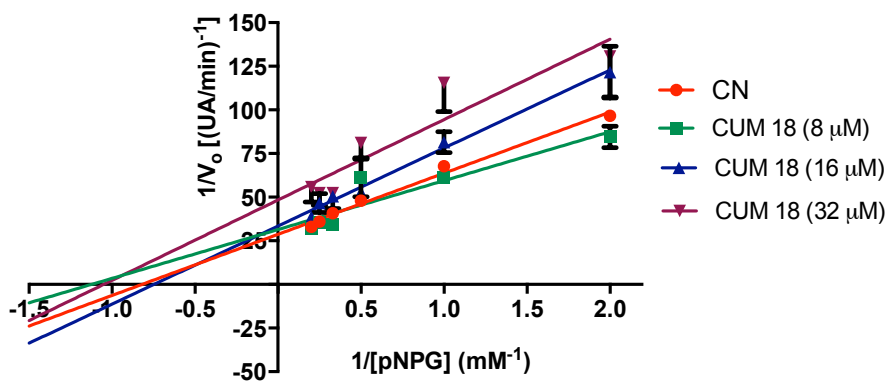
D.



E.



F.



G.

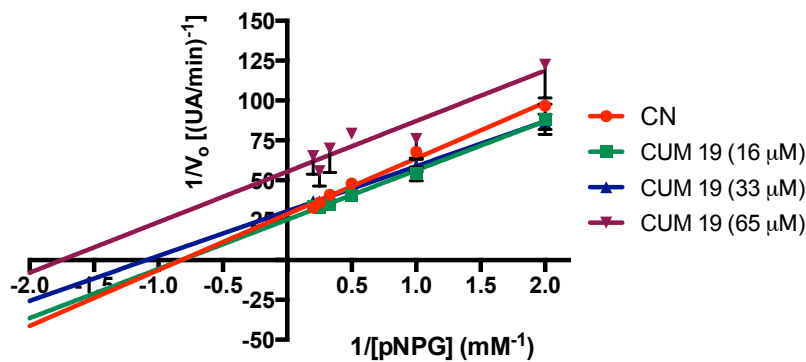


Figura 16. Gráficos de Lineweaver-Burk para la acarbosa y las cumarinas frente a la α -glucosidasa. A: inhibidor estándar, acarbosa (inhibidor competitivo). B: cumarina 5 (inhibidor acompetitivo). C: cumarina 11 (inhibidor mixto). D: cumarina 16 (inhibidor no competitivo). E: cumarina 17 (inhibidor mixto). F: cumarina 18 (no determinado). G: cumarina 19 (inhibidor acompetitivo).

3.2.3. Estudio computacional por Docking de dos sitios de unión de los inhibidores de la α -glucosidasa

Se estudiaron dos sitios de unión diferentes, el sitio catalítico enzimático (SCAT) y un segundo bolsillo de características hidrofóbicas (SITIO 2), importante para la unión de algunos inhibidores (Figura 17). Los valores de energía de afinidad entre las cumarinas y la proteína demostraron ser menores, por lo menos en una unidad, y por lo tanto más favorables, para el SCAT en comparación al SITIO 2 (Tabla 9), por lo que se decidió buscar las interacciones existentes entre algunos inhibidores y el SCAT, con el objetivo de racionalizar los resultados de inhibición enzimática obtenidos.

Entre las cumarinas, no se observan grandes diferencias en los valores energéticos de afinidad al SCAT de la enzima, con excepción de la CUM 2 que mostró un valor mayor (menos favorable); siendo bastantes similares al valor reportado anteriormente para la acarbosa (-8,5; -8,9 kcal/mol) (Dinparest et al., 2016; Gupta et al., 2017).

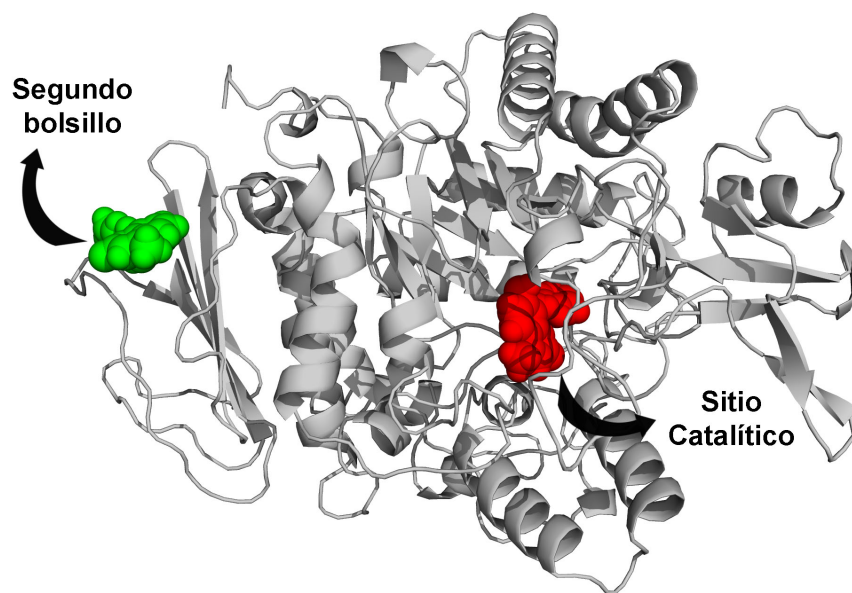


Figura 17. Sitios de unión para los inhibidores, estudiados mediante docking en α -glucosidasa. En rojo el sitio catalítico y en verde el segundo sitio de características hidrofóbicas.

Tabla 9. Energías de afinidad de las cumarinas para los sitios de unión SCAT y sitio 2 de α -glucosidasa

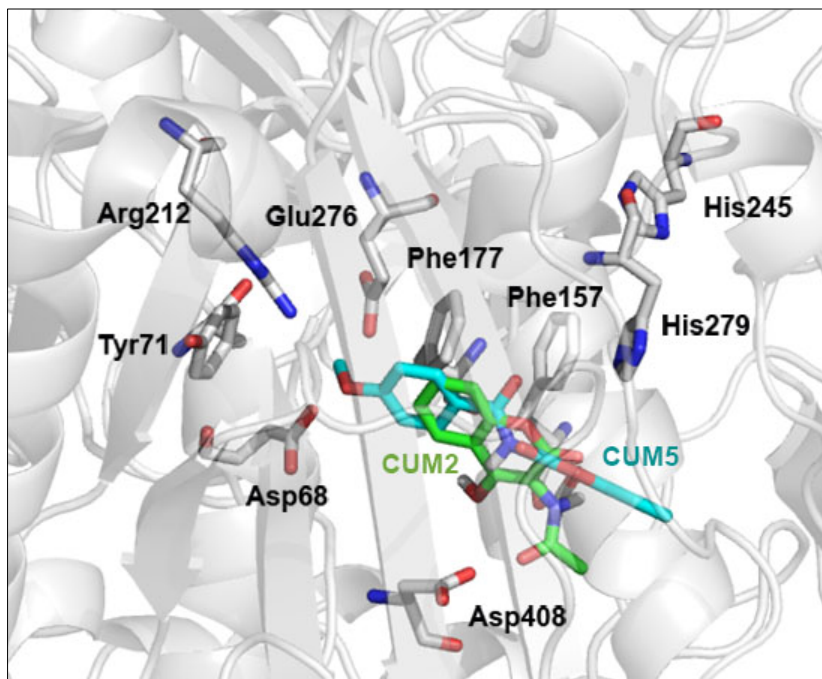
Energías de afinidad (kcal) para α -glucosidasa											
Bolsillos	CUM 2	CUM 5	CUM 9	CUM 11	CUM 12	CUM 13P	CUM 13N	CUM 16	CUM 17	CUM 18	CUM 19
SCAT	-6,9	-8,3	-8,4	-8,2	-8,4	-8,2	-8,4	-7,6	-7,9	-7,7	-7,5
SITIO 2	-5,6	-6,4	-6,2	-6,2	-6,7	-6,3	-6,1	-5,6	-6,0	-6,0	-5,9

SCAT: sitio catalítico; SITIO 2: segundo sitio estudiado de carácter hidrofóbico; kcal: kilocalorías; CUM 13P: cumarina 13 protonada; CUM 13N: cumarina 13 neutra.

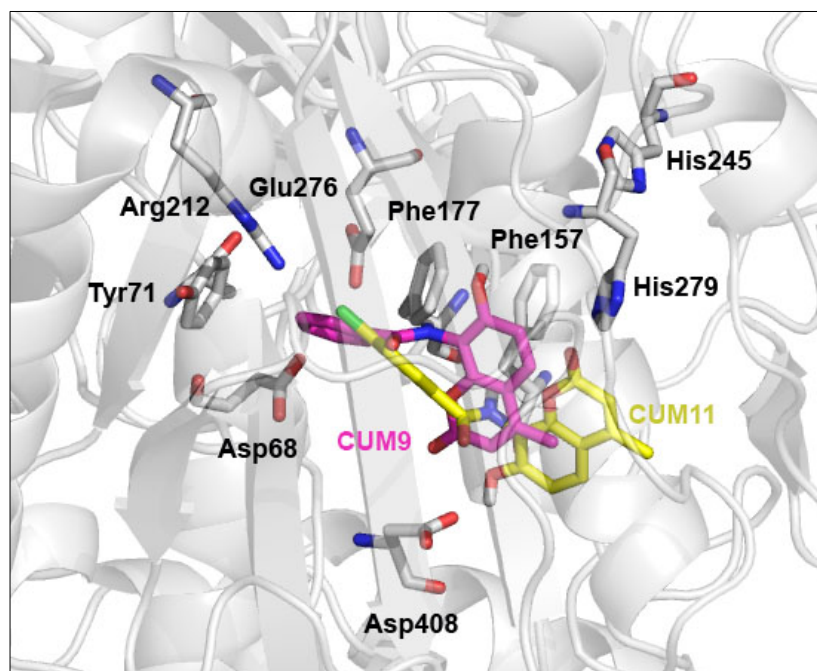
La CUM 2 no presentó formación de puentes de hidrógenos con la proteína, pero si se observaron interacciones aromáticas, con forma *edge to face*, entre los grupos aromáticos del núcleo base de la cumarina y las Phe157 y 177 del SCAT de la enzima (< 4 Armstrong de

distancia). CUM 5 se orienta de forma diferente que CUM2, con el sustituyente fenilo hacia la Phe177 de la enzima, con el cual forma un enlace de tipo *edge to face*. Si bien tampoco se observan puentes de hidrógenos, con esta posición, el hidroxilo de la molécula se encuentra cercano al carbonilo de Phe157 y además, el sustituyente metoxilo se encuentra orientado a Arg439 (Figura 18, A). El núcleo base de la CUM 9 interactúa con Phe157 mediante enlaces tipo *edge to face*, al igual que Tyr71 y el sustituyente fenilo, pero no se determinaron interacciones polares. El sustituyente cloro de la CUM 11 se orienta hacia una zona polar y más espaciosa de la enzima (Glu276, Arg212, Asp214), además se observa que el sustituyente hidroxilo de la cumarina se orienta hacia Asp408 de la enzima, pudiéndose establecer algún puente de hidrógeno entre ellos. También se observa un puente de hidrógeno entre His279 y el carbonilo del núcleo base de la cumarina (con una distancia de 2,02 Armstrong y un ángulo de 270°) (Figura 18, B). El sustituyente bromo de la CUM 16 se orienta hacia una zona polar (cerca de Asp408, Tyr313 y Arg439), mientras que el hidroxilo se orienta hacia Asn241 e His245, pudiendo establecerse puentes de hidrógeno entre ellos y además, se observa la interacción aromática tipo *edge to face* entre el núcleo base de la cumarina y Phe157. Finalmente, la CUM 19 se orienta de forma distinta a la CUM 16 (igual estructura pero CUM 19 no posee el sustituyente hidroxilo), de esta forma se observa una orientación del bromo hacia una zona despejada, cerca de Asp214 y Tyr71 (similar al cloro de CUM 11), el carbonilo del núcleo base de la cumarina se orienta hacia Arg439 y desaparecen las interacciones aromáticas tipo *edge to face* con Phe157 que se observan con CUM 16 (Figura 18, C).

A.



B.



C.

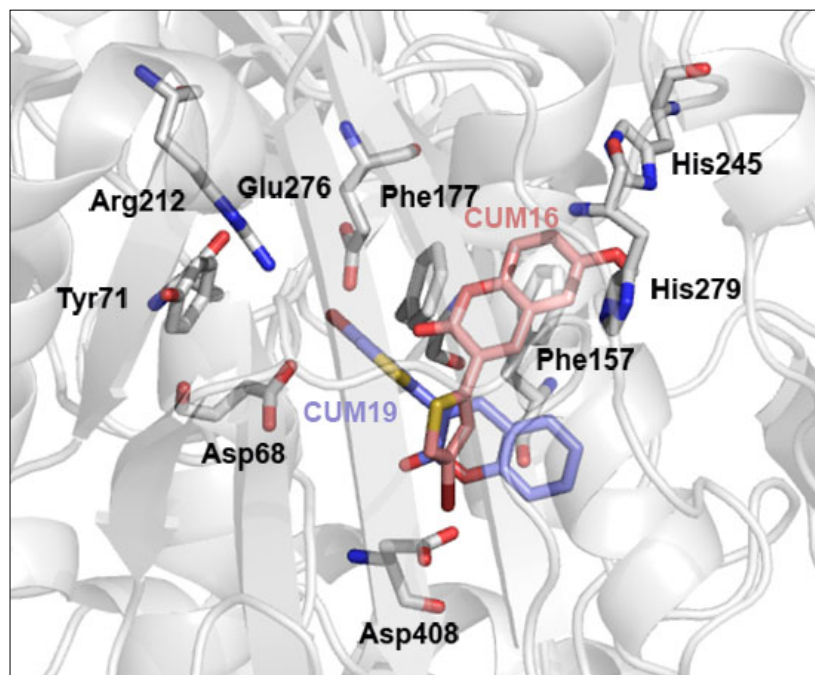


Figura 18. Interacciones observadas entre algunas cumarinas y la α -glucosidasa. Interacciones observadas entre algunas cumarinas y aminoácidos del sitio catalítico de la enzima. A: CUM 2 y CUM 5, B: CUM 9 y CUM 11, C: CUM 16 y CUM 19. El fragmento de la proteína observado se distingue en gris claro, destacándose los residuos más importantes en la interacción con las cumarinas.

Los resultados anteriormente mostrados, demuestran que las cumarinas estudiadas en esta tesis, son inhibidores muy potentes de la actividad de la α -glucosidasa en comparación a otras cumarinas u otros compuestos previamente estudiados (Khairunissa et al., 2015; Dinparest et al., 2016; Raju et al., 2010).

Si analizamos estructuralmente la serie de cumarinas activas, éstas presentan sustituyentes similares tales como grupos aromáticos y compuestos halogenados (Br, Cl) , por lo que podríamos suponer que éstos favorecen la actividad inhibitoria de la enzima, lo que concuerda con los resultados propuestos por Moorthy et al. (2011). El aumento de la eficacia inhibitoria de la CUM 5 vs la CUM 2 se puede explicar por la probabilidad de formar dos puentes de hidrógenos entre el inhibidor y la enzima (Phe157 y Arg439), además de mantener la interacción aromática *edge to face*, gracias a la introducción del grupo *para*-metoxifenil. Asimismo, el aumento en la eficacia inhibitoria de la CUM 11 vs la CUM 9 se puede explicar por la aparición de interacciones polares entre el cloro y la enzima, además de la formación de

puentes de hidrógeno que permitió dicho cambio estructural (adición de un grupo cloro en el fenil). El aumento de la potencia inhibitoria que se observa al agregar el hidroxilo en la posición 6 de las bromotiofeno cumarinas (CUM 16) vs la CUM 19 que no posee sustituyentes, se explica en el ensayo computacional por la posibilidad de la formación de puentes de hidrógeno entre el hidroxilo y Asn241 y/o His245, sumado a que la presencia del hidroxilo produce un cambio en la orientación que permite la formación de interacciones aromáticas con Phe157 de la enzima. Por lo tanto, se puede concluir de forma general, que para inhibir la actividad de la α -glucosidasa en forma potente son de mayor importancia la formación de puentes de hidrógeno que las interacciones aromáticas entre el inhibidor y la enzima, sin embargo, es probable que la presencia de ambas interacciones conduzca aún más a una mayor potencia inhibitoria. Además, otro tipo de inhibidores mostraron con anterioridad interacciones con Phe157, 177 y Arg439, por lo que pueden ser residuos de importancia para inhibir la actividad de la α -glucosidasa (Gupta et al., 2017).

Khairunissa y colaboradores (2015) estudiaron una serie de biscumarinas-tioureas como moléculas inhibitoras de la actividad de la α -glucosidasa. Los estudios de docking realizados exponen similitudes en el lugar de unión de éstos inhibidores al compararlos con las cumarinas estudiadas en el presente trabajo, coincidiendo el residuo Glu276 en ambos. Si bien las biscumarinas-tioureas manifestaron valores energéticos de afinidad a la enzima más favorables que los obtenidos en este trabajo, el menor valor de CI_{50} para dicha serie fue de $13,5 \pm 0,39 \mu M$ para una biscumarina con sustituyente del tipo p -metoxifenil, siendo mucho menos potente que CUM 16 y similar a las CUM 11, 17 y 18. Los autores concluyen que la capacidad de atraer electrones del oxígeno en el sustituyente metoxilo, puede ser la razón del aumento de la actividad inhibitoria de la molécula más potente, lo mismo fue observado con otro tipo de sustituyentes favorables para la actividad inhibitoria (nitro, cloro y bromo). Además concluyeron que la sustitución en la posición *para* del grupo aril resulta en una mejor inhibición, exceptuando al bromo como sustituyente del grupo aromático (inhibición más potente se presenta en las posiciones *orto* y *meta*).

Bharatham y colaboradores el año 2008 publicaron que si bien los residuos Asp214, Glu276 y Asp349 de α -glucosidasa proveniente de *S. cerevisiae* corresponden a la triada catalítica del sitio activo enzimático, los residuos Tyr71 y Phe177 son muy relevantes para la unión del sustrato, ya que mantienen el anillo terminal de éste formando un parche hidrofóbico, para luego ser liberado

como glucosa en la reacción enzimática. En dicho trabajo se realizó una representación 2D de la acarbosa en el sitio catalítico enzimático (Figura 19), donde se pudo apreciar las interacciones polares entre dicho inhibidor y algunos residuos como Asp149 y Arg212; mientras que Tyr71, Phe177 y Phe157 constituían el parche hidrofóbico que rodea y sostiene el anillo terminal de la acarbosa. Además, determinaron que Tyr71 y Phe177 son cruciales para el reconocimiento del anillo terminal de los sustratos de la α -glucosidasa.

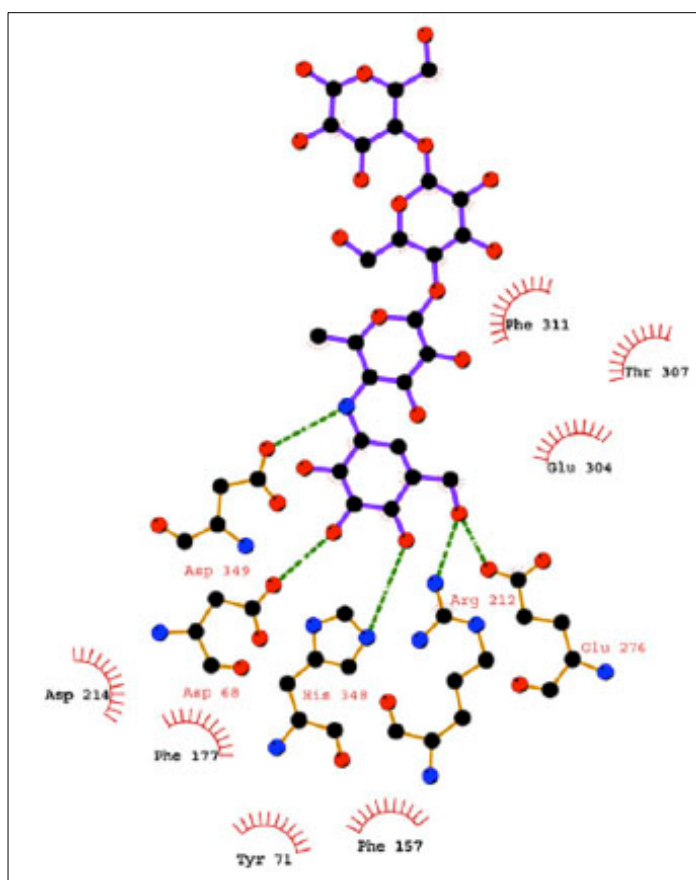


Figura 19. Representación en 2D de las interacciones desarrolladas por la acarbosa en el sitio activo de α -glucosidasa. Las líneas punteadas verdes representan los puentes de hidrógeno mientras que en líneas de color rojo se visualizan las interacciones hidrofóbicas.

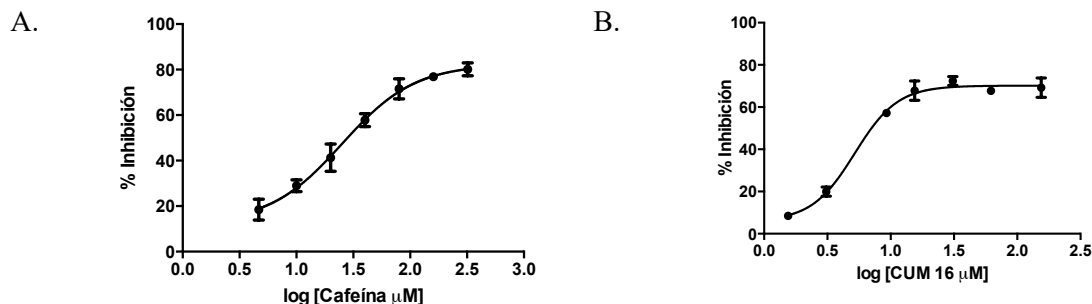
Finalmente, la mayoría de las cumarinas inhiben a la α -glucosidasa de forma acompetitiva, uniéndose al complejo enzima-sustrato e interfiriendo en su actividad o bien de forma mixta, pudiendo inhibir a la enzima directamente y/o al complejo enzima-sustrato. Si bien no se ha

descrito un sitio alostérico como tal para la α -(1,4)-glucosidasa, se han encontrado otros inhibidores de tipo mixto y no competitivos, los cuales compartían parcialmente el sitio de unión con los sustratos de tipo carbohidrato. En dichos inhibidores los grupos aromáticos fueron claves para la interacción, ya que justamente en la enzima existen aminoácidos hidrofóbicos distantes a los residuos carboxilatos del centro catalítico conservado, y que permiten la interacción, mediante interacciones aromáticas con los inhibidores no sacáridos (Park et al., 2011). Según los resultados obtenidos, las cumarinas estudiadas estarían en una situación similar a la descrita por Park et al., en donde se unirían a aminoácidos ubicados no tan profundamente dentro del sitio catalítico y de esta forma, no interfieran con la unión del sustrato o lo hacen parcialmente, explicando la inhibición no competitiva o mixta de algunos inhibidores, respectivamente.

3.3. Estudios frente a glicógeno fosforilasa a (GPa)

3.3.1. Ensayo de inhibición de la actividad de GPa

Se evaluaron distintas concentraciones de las muestras con el fin de determinar la potencia inhibitoria, expresada como CI_{50} . En la Figura 20 se observan los gráficos de inhibición vs concentración de algunos inhibidores estudiados.



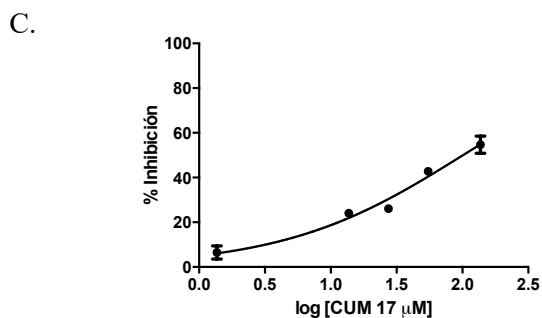


Figura 20. Porcentajes de inhibición de la actividad de GPα vs concentración (μM) del inhibidor.
A: inhibidor estándar utilizado (cafeína); B: cumarina 16; C: cumarina 17.

Los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la actividad de GPα por las cumarinas evaluadas y el compuesto de referencia (cafeína), se exponen en la Tabla 10 y Figura 21.

Tabla 10. Potencia inhibitoria (CI₅₀) de las muestras frente a GPα

Muestras	CI ₅₀ (μM)	DS
CUM 2	N.C (↑ 6,5%)	--
CUM 5	N.C (↑ 3,2%)	--
CUM 9	N.C (↑ 8,2%)	--
CUM 11	N.C (↑ 45,0 %)	--
CUM 12	N.A	--
CUM 13	N.C (↑ 12,7 %)	--
CUM 16	5,21	0,51
CUM 17	134,45	18,60
CUM 18	N.C (↑ 49,5 %)	--
CUM 19	N.C (↑ 28,7 %)	--
CAFEÍNA	25,51	6,19

DS: Desviación estándar, N.C: No cuantificable, ↑: % máximo obtenido, N.A: No activa

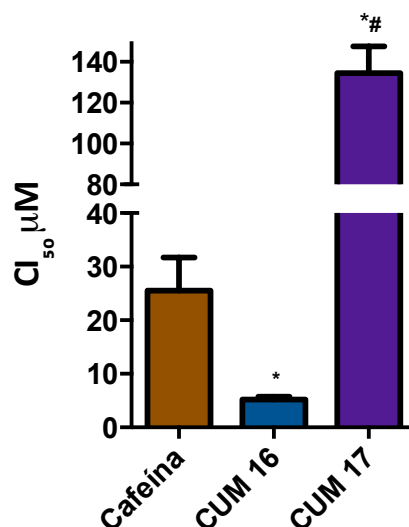


Figura 21. CI₅₀ de los inhibidores de GPα. * = diferencias significativas con respecto a la cafeína, # = diferencias significativas con respecto a la CUM 16, utilizando el test de ANOVA, seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey considerando un $p \leq 0,05$. CUM: cumarina.

En el ensayo de inhibición de la actividad de la GPα, sólo dos cumarinas lograron inhibirla con la eficacia suficiente para calcular las CI₅₀, las CUM16 y CUM17. La primera muestra una potencia mayor que la cafeína (aproximadamente 5 veces), pero no se diferencian de forma significativa; mientras que CUM 17 es significativamente menos potente que la cafeína y la CUM 16.

También es importante destacar que las CUM 11 y CUM 18, si bien no mostraron un porcentaje de inhibición superior al 50% de la actividad de la enzima, si la inhibieron de forma significativa, presentando un efecto máximo de 45% a 212 µM y 49,5% a 155 µM respectivamente, como se observa en la Tabla 10.

Respecto de las CUM 16 y CUM 17, ambas de la familia 3, al observar sus estructuras químicas podríamos suponer, al igual que para α-glucosidasa, que el grupo bromotiofeno es importante para la unión e inhibición de la GPα. Además, es posible que la presencia de otros compuestos halogenados también influya positivamente en la actividad inhibitoria, ya que en la familia 2 de cumarinas, se observó que la introducción de un clorofenil como sustituyente (presente en CUM 11), aumentó su capacidad inhibitoria para esta enzima en comparación a

CUM 9 que posee un sustituyente fenil (sin cloro). Además, para la GP_a parece ser importante también la sustitución del carbono 6 de la cumarina por un hidroxilo, como ocurre en la CUM 16, debido a que al cambiarlo de posición, esterificarlo o eliminarlo, la actividad disminuyó considerablemente.

3.3.2. Cinética de inhibición enzimática de GP_a

En la Tabla 11 se muestran los valores de V_{max} y K_m calculados y la significancia de las diferencias respecto del control negativo. En la Figura 22 se observan los gráficos de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos de las dos cumarinas más potentes en inhibir la actividad de la GP_a y de la cafeína.

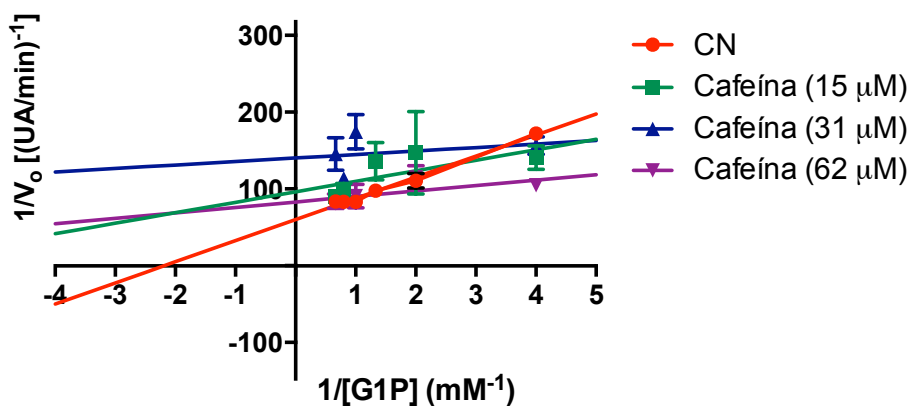
Tabla 11. Valores de V_{max} y K_m obtenidos en la inhibición de la actividad de GP_a

Muestras (μ M)	V_{max} (UA/min) \pm D.S	K_m (mM) \pm D.S
CN	0,0166 \pm 0,0004	0,46 \pm 0,03
CUM 16 (2)	0,0056 \pm 0,0002 *	0,45 \pm 0,07
CUM 16 (5)	0,0062 \pm 0,0012 *	0,60 \pm 0,29
CUM 16 (9)	0,0100 \pm 0,0009 *	0,56 \pm 0,02
CUM 17 (14)	0,0090 \pm 0,0005 *	0,38 \pm 0,03
CUM 17 (19)	0,0082 \pm 0,0039 *	0,370 \pm 0,004
CUM 17 (27)	0,0209 \pm 0,0040	1,91 \pm 0,75 *
Cafeína (15)	0,0096 \pm 0,0012 *	0,11 \pm 0,06
Cafeína (31)	0,0068 \pm 0,0008 *	0,07 \pm 0,04
Cafeína (62)	0,0133 \pm 0,0004	0,11 \pm 0,03

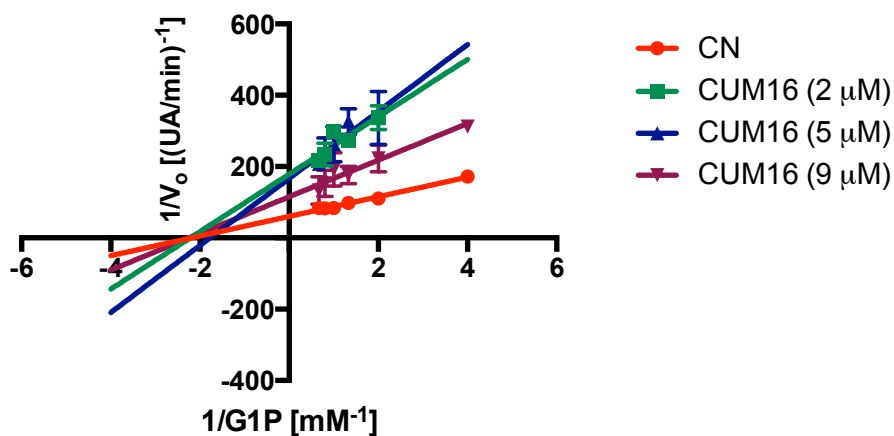
CN: control negativo (sin inhibidor), V_{max} : velocidad máxima enzimática, K_m : constante de Michaelis Menten, S.D.: desviación estándar, UA: unidades de absorbancia, min: minutos, CUM: cumarina. * representa diferencias significativas con el control negativo, según el test ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Tukey.

Luego de un análisis de los resultados obtenidos, no podemos determinar el tipo de inhibición ejercido por la cafeína, ya que a pesar de que numéricamente disminuye tanto la V_{max} (de forma significativa) como la K_m , en el gráfico de Lineweaver-Burk no se observa un comportamiento claro (Figura 22, A). La CUM 16 inhibió la actividad de la GPa de forma no competitiva, ya que disminuyó significativamente la V_{max} con respecto al control negativo, mientras que no alteró la K_m y la intersección de las rectas ocurre en el eje de las abscisas, a la izquierda del eje de las ordenadas (Figura 22, B). Finalmente, la CUM 17 es un inhibidor acompetitivo a las dos concentraciones menores evaluadas (14 y 19 μM) ya que, disminuyó tanto la V_{max} como la K_m y las rectas tienden a ser paralelas entre si, sin embargo a la concentración mayor (27 μM) actúa como un inhibidor competitivo, aumentando significativamente la K_m respecto del control negativo (Figura 22, C).

A.



B.



C.

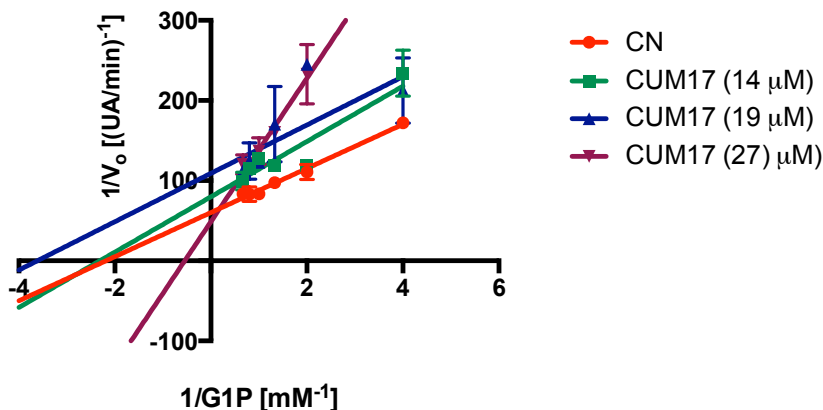


Figura 22. Gráficos de Lineweaver-Burk para la cafeína y las cumarinas. CN: control negativo; G1P: glucosa 1 fosfato. A: inhibidor estándar, cafeína (no determinado). B: CUM 16 (inhibidor no competitivo). C: CUM 17 (inhibidor acompetitivo), CUM: cumarina.

En estudios anteriores se determinó que la cafeína, en relación al glicógeno y al Pi, actúa como inhibidor competitivo de la actividad de la GP_a, disminuyendo la afinidad por el sustrato, pero mediado por un efecto heterotrópico, ya que no compite directamente con él, sin embargo a concentraciones mayores disminuyó la V_{max} también, y por lo tanto actuaba como un inhibidor mixto (Serrano et al., 1995). Además, se conoce que la cafeína se une al sitio inhibidor de la GP_a (sitio 1 o sitio de purinas) (Deng et al., 2005), por lo que no debe interferir directamente con la unión del sustrato a la enzima. En este ensayo no se logró determinar el tipo de inhibición ejercido por la cafeína, utilizando a la glucosa 1 fosfato como sustrato, probablemente debido a que la metodología empleada conduce a una reacción enzimática muy rápida, dificultando la medición y la obtención de los resultados con los equipos disponibles.

De acuerdo al tipo de inhibición determinado para CUM 16 y CUM 17, ninguna de las dos cumarinas compite de forma directa con el sustrato de la enzima para lograr la inhibición de la GP_a.

3.3.3. Estudio computacional por Docking de la GPa

Se estudiaron cuatro bolsillos de unión en la enzima, el sitio catalítico, el sitio alostérico, el sitio inhibidor y el sitio de interfaz dimérica (Figura 23), con el fin de determinar por cual sitio de unión tienen mayor afinidad las cumarinas para unirse e inhibir la actividad de la GPa.

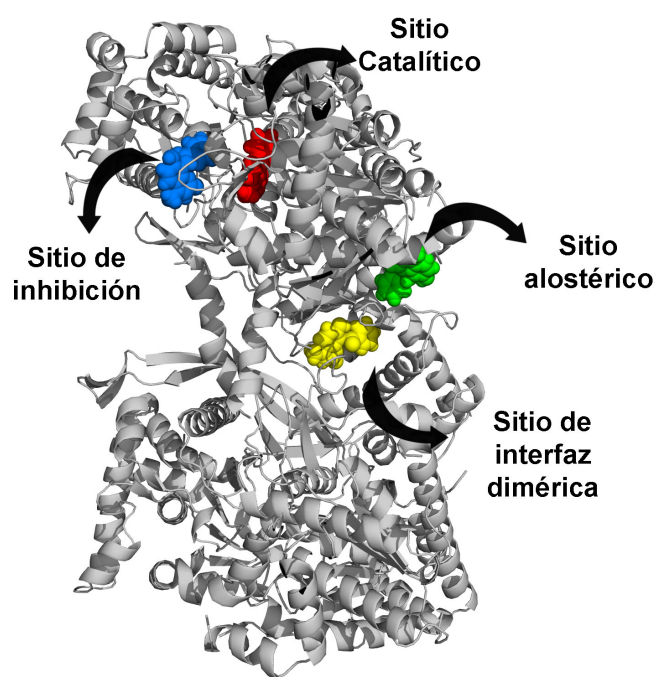


Figura 23. Bolsillos estudiados mediante docking en GPa. En la figura se muestra la posición de los diferentes sitios de unión estudiados para la interacción cumarina-GPa. En rojo el sitio catalítico, en azul el sitio de inhibición (sitio 1), en verde el sitio alostérico y en amarillo el sitio de interfaz dimérica.

Como se puede observar en la Tabla 12, la CUM 2 tiene mayor afinidad para unirse al sitio inhibidor (SIN), sin embargo la CUM 5 no mostró grandes diferencias de afinidad de unión entre los distintos sitios estudiados, para la CUM 9 el único sitio que se descartó su unión, es el sitio de interfaz dimérica, ya que posee un valor mayor de energía. Tanto la CUM 11 como la CUM 12 poseen valores de afinidad similares entre los distintos sitios, por lo que no se observaron preferencias para la unión. Para la CUM 13, tanto protonada como neutra, el único sitio que se descartó para la unión es el bolsillo de interfaz dimérico, por poseer un valor de

energía de afinidad mayor y por lo tanto más desfavorable, lo mismo fue observado para la CUM 16, CUM 17, CUM 18 y CUM 19. Es probable que las cumarinas no se unan preferentemente al bolsillo de interfaz dimérico, porque son moléculas de pequeño tamaño como para alcanzar uniones en ambos monómeros de la enzima.

Tabla 12. Energías de afinidad de unión de las cumarinas para GPa

Energías de afinidad (kcal) para GPa											
Bolsillos	CUM 2	CUM 5	CUM 9	CUM 11	CUM 12	CUM 13P	CUM 13N	CUM 16	CUM 17	CUM 18	CUM 19
SCAT	-7,3	-8,8	-8,3	-8,5	-8,3	-8,7	-8,4	-7,8	-7,3	-7,9	-7,5
SALO	-7,0	-8,1	-8,8	-8,8	-8,7	-8,6	-8,8	-7,2	-7,6	-7,2	-7,5
SIN	-9,1	-8,5	-8,1	-7,9	-8,4	-7,9	-7,9	-8,1	-8,0	-7,8	-8,8
SID	-6,5	-8,1	-7,5	-8,0	-8,2	-7,5	-7,5	-7,1	-7,0	-6,9	-6,7

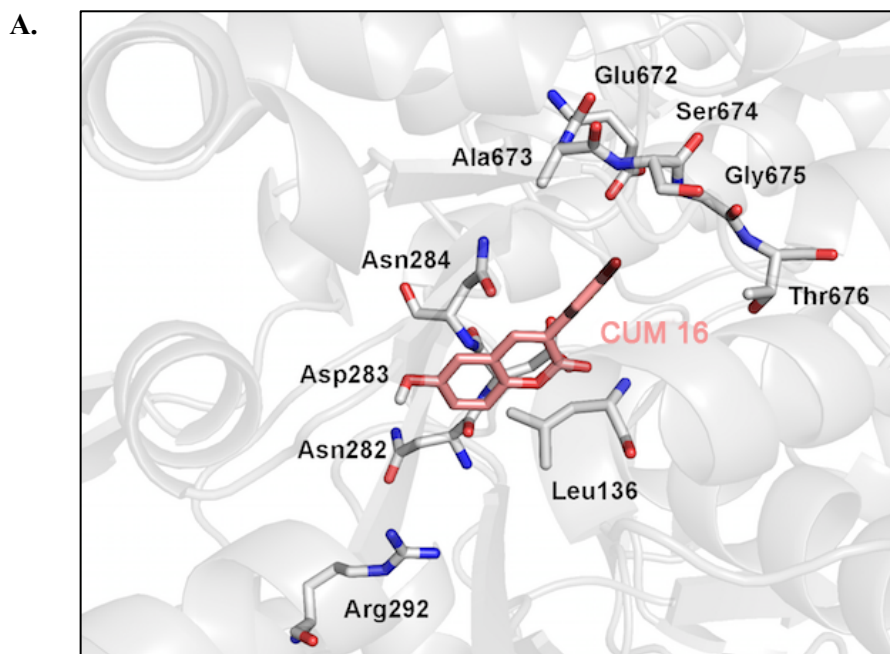
SCAT: sitio catalítico; SALO: sitio alostérico; SIN: sitio inhibidor; SID: sitio de interfaz dimérica
kcal: kilocalorías; CUM 13P: cumarina 13 protonada; CUM 13N: cumarina 13 neutra.

Para racionalizar los resultados enzimáticos obtenidos y tratar de dilucidar los grupos funcionales de mayor importancia para lograr la inhibición de la GPa, se estudiaron las interacciones enzima-inhibidor de las dos cumarinas activas, CUM16 (5,2 μ M) y CUM17 (134,5 μ M) y de la CUM19 (que no logró inhibir a la enzima de forma eficaz), en los cuatro sitios de unión estudiados. Es importante destacar que las cumarinas analizadas en las interacciones pertenecen todas a la familia 3 (bromotiofeno cumarinas).

En el sitio catalítico observamos que la CUM 16 forma un puente de hidrógeno entre el carbonilo de la cumarina y la amina del enlace peptídico de Leu136 (2.99 Å). Además, los residuos polares Asn284, Asp283, His341, Asn282, Asp339, His377 y Glu672 interactúan con los hidrógenos aromáticos de la cumarina y del sustituyente tiofeno de la misma (Figura 24, A).

La CUM 17 forma un puente de hidrógeno en el sitio catalítico entre el carbonilo del grupo éster de la cumarina y el residuo Arg292 de la proteína (3.08 Å). Nuevamente se observa que los residuos polares Asn282, Asp339, Asn284, Asp283, His341 e His377 interactúan con los hidrógenos aromáticos de la cumarina y además, (a diferencia de la CUM 16) se observan interacciones hidrofóbicas con los residuos Phe285 y Leu136 (Figura 24, B).

En el sitio catalítico enzimático CUM19 establece un puente de hidrógeno entre el carbonilo de la cumarina con la amina del enlace peptídico del residuo Leu136 (3.00 Å). Y al igual que con las CUM 16 y CUM 17, los residuos polares His341, Asn282, Asp283, Asp339, Asn284, His377 y Glu672 interactúan con los hidrógenos aromáticos de CUM 19 (Figura 24, C).



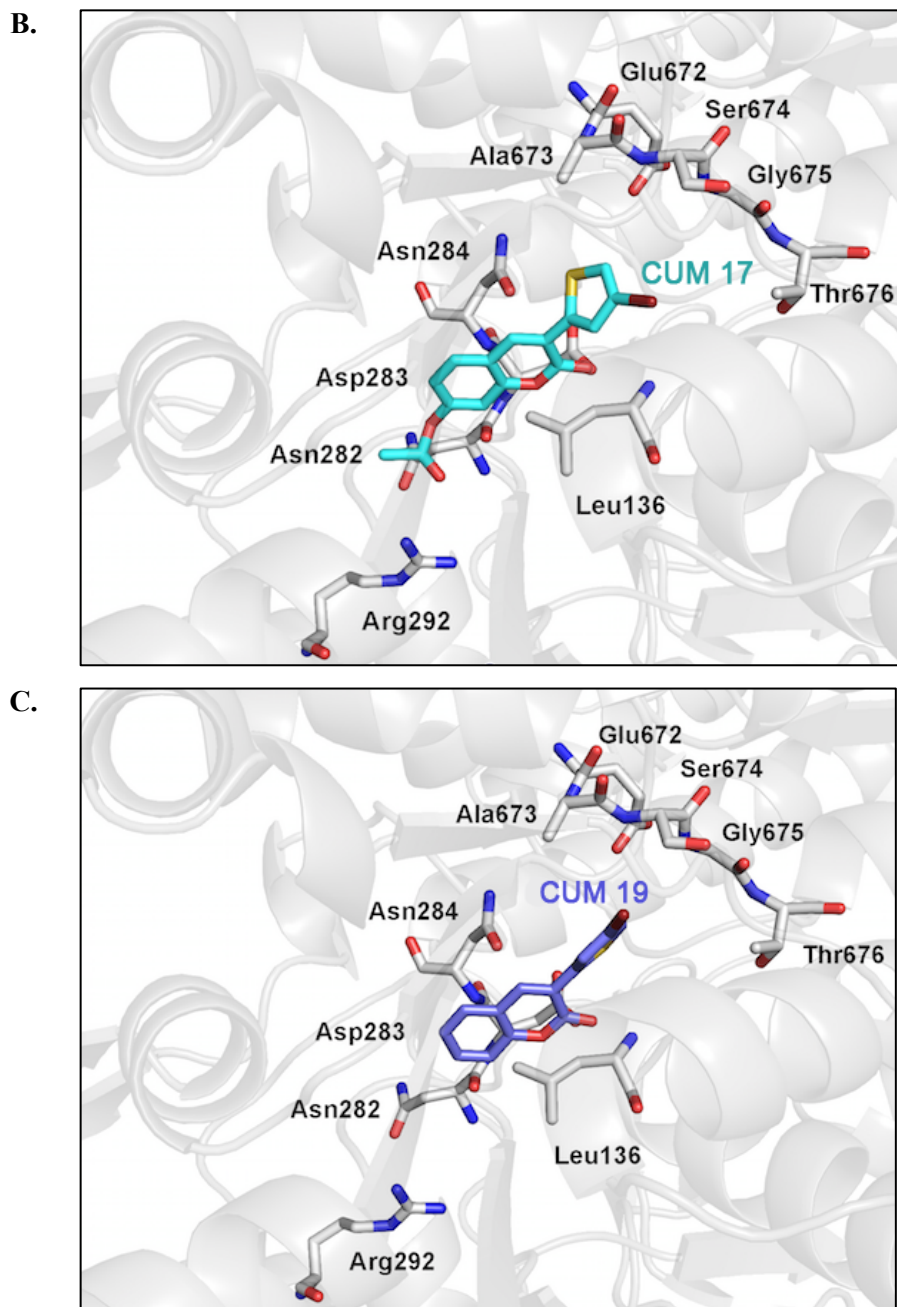
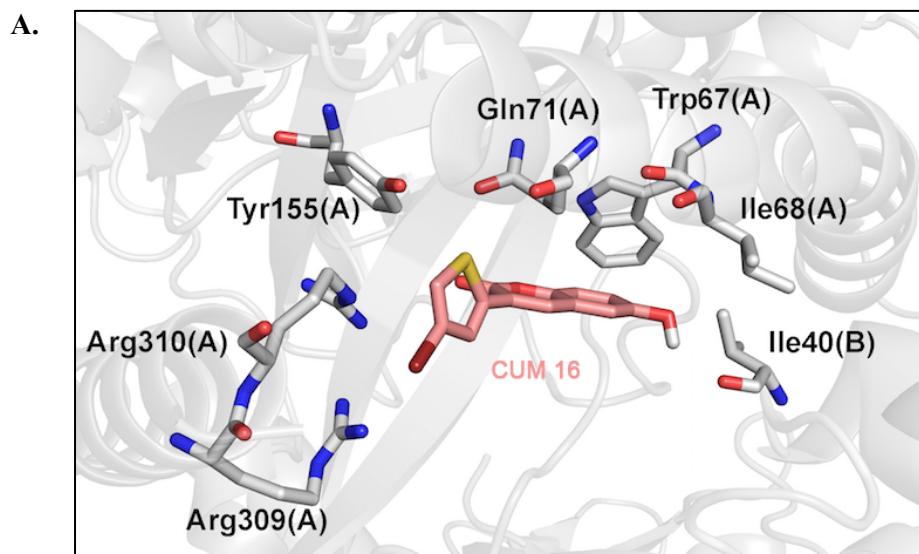


Figura 24. Interacciones observadas en el sitio catalítico de GPase. A. Posición adoptada por CUM 16 (rosado). B. Posición adoptada por CUM 17 (turquesa). C. Posición adoptada por CUM 19 (morado). El fragmento de la proteína observado se distingue en gris claro, destacándose los residuos más importantes en la interacción con las cumarinas.

En el sitio alostérico de la GPα observamos que CUM 16 establece un puente de hidrógeno débil entre el hidroxilo de la cumarina y el carbonilo del enlace peptídico del residuo Val40. Se observan además interacciones hidrofóbicas entre el núcleo base de la cumarina y los residuos Trp67, Arg193 y Gln71, además de interacciones hidrofóbicas entre el sustituyente tiofeno de la cumarina y Tyr155, Arg310 y Arg81 (Figura 25, A).

La CUM 17 en el sitio alostérico forma un puente de hidrógeno entre el oxígeno cetónico del núcleo base de la cumarina y el residuo Arg310 (3.19 Å). También se observan interacciones hidrofóbicas con la estructura base de la cumarina y Arg193, Asp227 y Gln71. El hidroxilo de Tyr155 se orienta hacia el átomo de azufre del sustituyente tiofeno, pero no se describen interacciones (Figura 25, B).

En el sitio alostérico CUM 19 no establece ningún puente de hidrógeno, sin embargo existen interacciones hidrofóbicas con el núcleo base de la cumarina y los residuos Val40, Lys191, Arg193, Lys41 y Val45, además de interacciones hidrofóbicas entre el sustituyente tiofeno y Ile68, Gln72 y Gln71. Finalmente se observa una interacción hidrofóbica del tipo *edge to face* entre la cumarina y Trp67 (Figura 25, C).



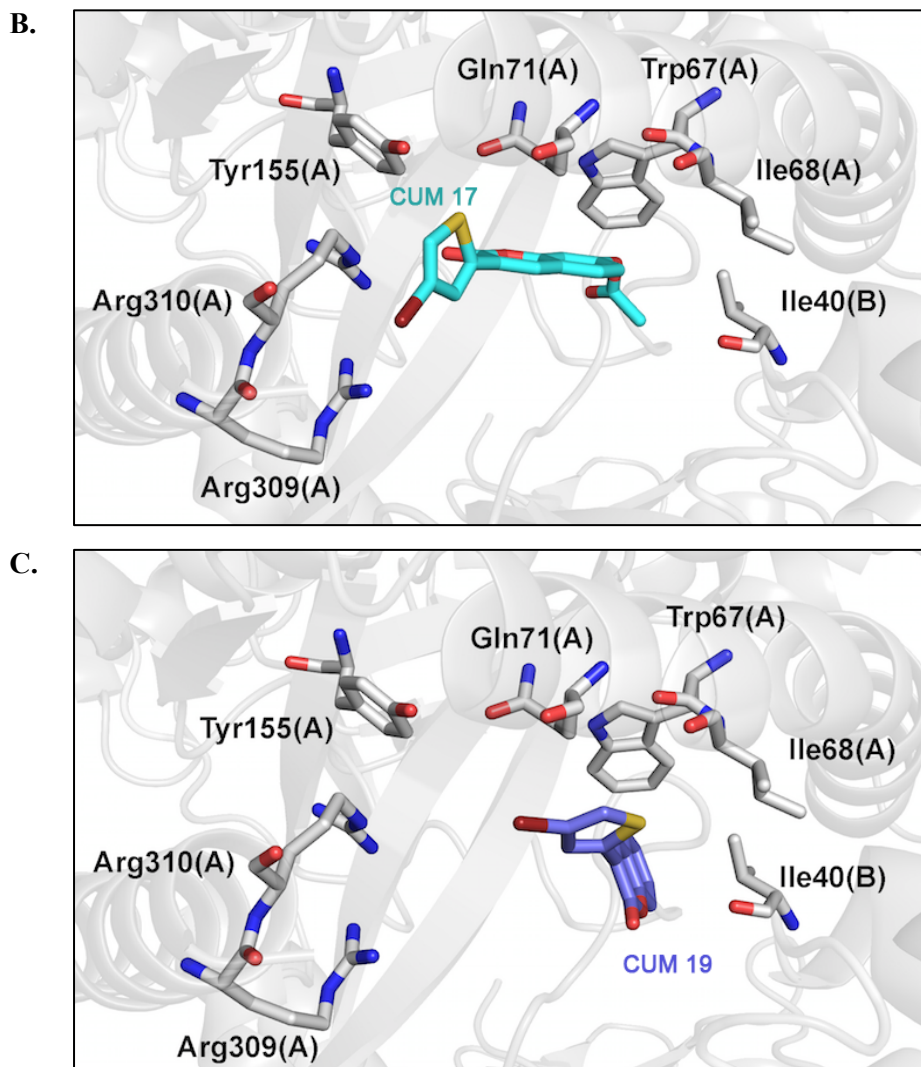


Figura 25. Interacciones observadas en el sitio alostérico de GPA. A. Posición adoptada por CUM 16 (rosado). B. Posición adoptada por CUM 17 (turquesa). C. Posición adoptada por CUM 19 (morado). El fragmento de la proteína observado se visualiza en gris claro, destacándose los residuos más importantes en la interacción con las cumarinas. (A) y (B) distinguen aminoácidos procedentes de diferentes monómeros de la enzima.

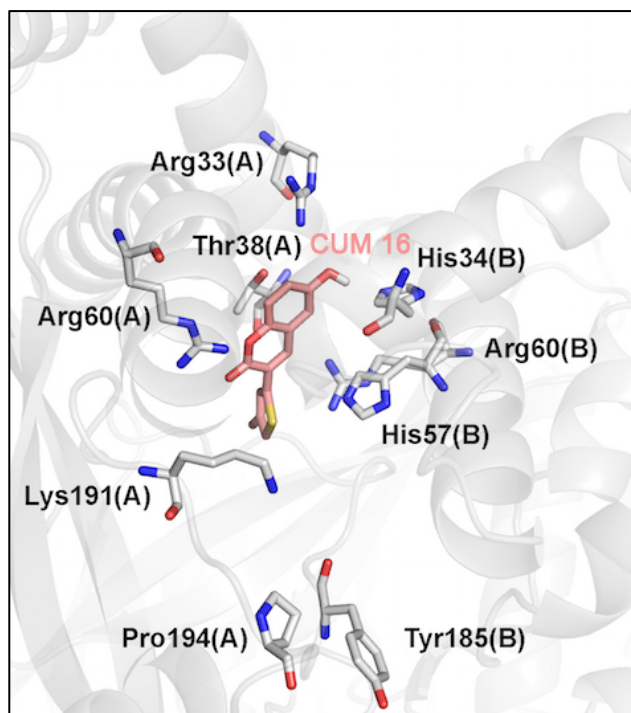
En el sitio de interfaz dimérica, se observa que CUM 16 establece dos puentes de hidrógeno entre el carbonilo de la cumarina y dos residuos de la enzima, His57 (3.21 Å) y Arg60 (2.88 Å). Además, se observan puentes de hidrógeno entre el hidroxilo de la cumarina e His34 (3.04 Å) y Arg33 (3.19 Å). También hay interacciones hidrofóbicas entre el núcleo base de la

cumarina y Thr38 e His34 y entre Arg60 y el núcleo base de la cumarina y además el sustituyente tiofeno (Figura 26, A).

CUM 17 en este bolsillo enzimático, establece un puente de hidrógeno entre el carbonilo de la cumarina y Lys191 (3.17 Å). También se observa un puente de hidrógeno cooperativo entre carbonilo del grupo éster e His57 (3.10 Å) junto con Arg60 (2.96 Å) y un puente de hidrógeno entre el oxígeno del grupo éster de la cumarina y Arg60 (3.09 Å). Además, se observa una interacción hidrofóbica entre el núcleo base de la cumarina y Phe53, mientras que el sustituyente tiofeno de la cumarina se orienta hacia Tyr185 y Pro194 (Figura 26, B).

CUM 19 en el sitio de interfaz dimérica no establece ningún puente de hidrógeno, sin embargo se observan interacciones hidrofóbicas entre el núcleo base de la cumarina y los residuos Tyr185, Pro194, Lys191, Asp50, Leu39 y Phe53. Además, el sustituyente bromotiofeno se orienta hacia los residuos His57, Arg60 y Pro188 (Figura 26, C).

A.



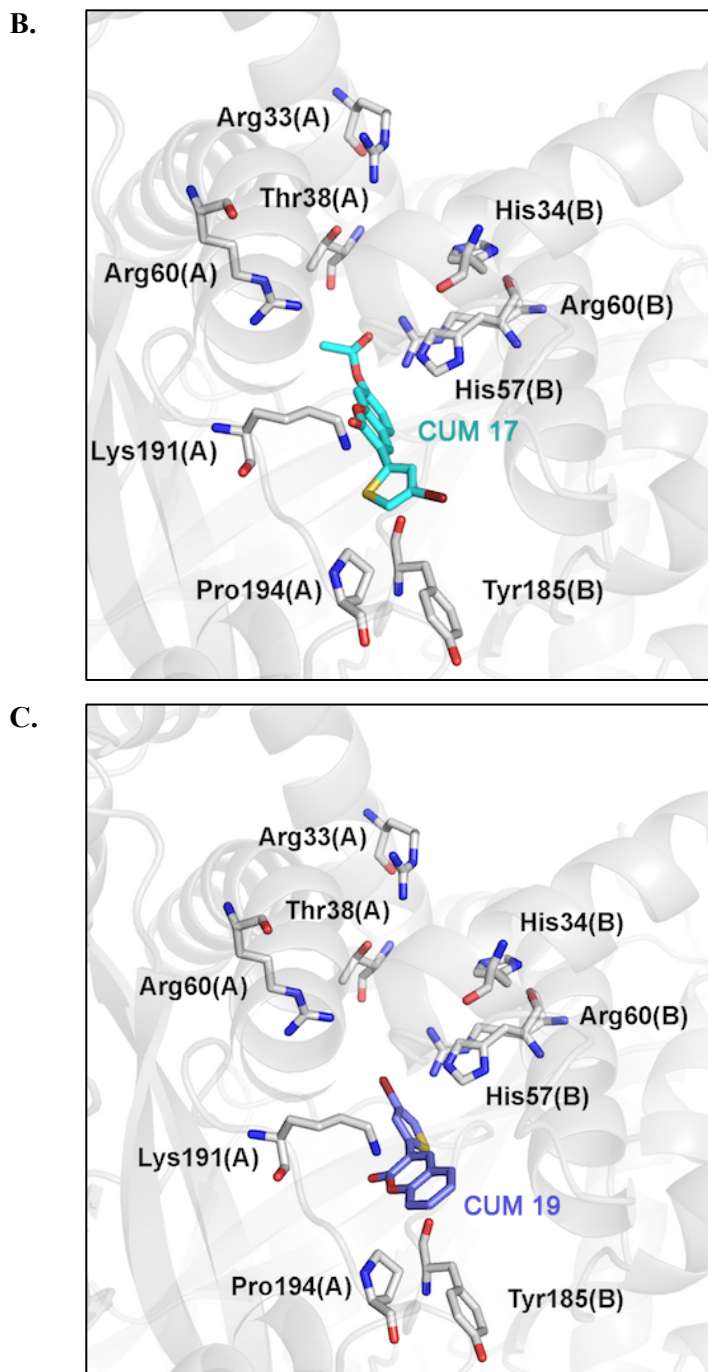
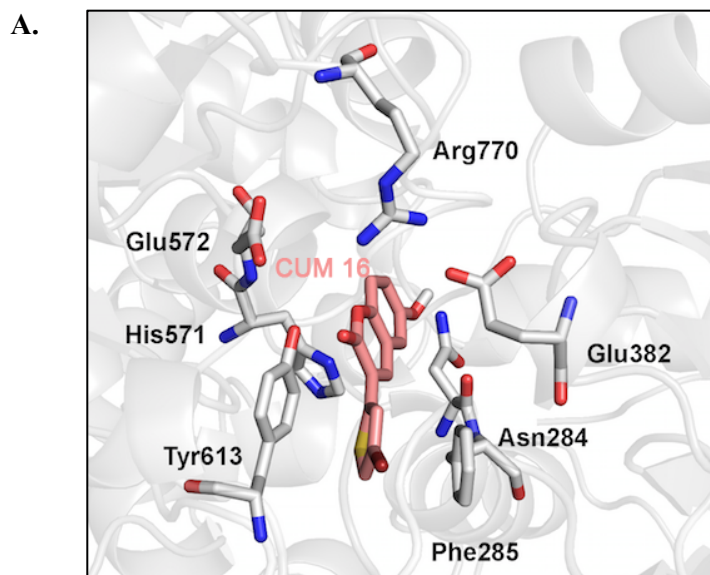


Figura 26. Interacciones observadas en el sitio de interfaz dimérica de GPα. A. Posición adoptada por CUM 16 (rosado). B. Posición adoptada por CUM 17 (turquesa). C. Posición adoptada por CUM 19 (morado). El fragmento de la proteína observado se visualiza en gris claro, destacándose los residuos más importantes en la interacción con las cumarinas. (A) y (B) distinguen aminoácidos procedentes de diferentes monómeros de la enzima.

Finalmente en el sitio inhibidor, sitio de unión para la cafeína o sitio uno, observamos que CUM 16 establece un puente de hidrógeno entre el oxígeno no cetónico de la cumarina y el residuo Arg770 (2.92 Å). Se observa también un puente de hidrógeno doble entre el grupo hidroxilo de la cumarina, el oxígeno carbonílico del enlace peptídico y el grupo amino de la cadena lateral de Asn284 (3.33 Å y 3.21 Å). En cuanto a las interacciones hidrofóbicas, se observan interacciones del tipo π -stacking entre el núcleo base de la cumarina y Tyr613, mientras que el sustituyente tiofeno interacciona con Phe285 a modo de “sándwich” (Figura 27, A).

CUM 17 en este sitio de unión establece dos puentes de hidrógeno, entre el carbonilo del éster de la cumarina y dos residuos enzimáticos, His571 (2.93 Å) y Asp283 (2.66 Å). Se observa además interacciones π -stacking entre el núcleo base de la cumarina y dos residuos Tyr613 y Phe285 a modo de “sándwich”. También se observan interacciones hidrofóbicas entre el metil del sustituyente éster de la cumarina e Ile380, Tyr573 y Glu382. Además de todas estas interacciones, el sustituyente tiofeno de la cumarina se orienta hacia los residuos Gly612 e His614 (Figura 27, B).

En el sitio inhibidor CUM19 establece un puente de hidrógeno entre el oxígeno no cetónico de la cumarina y Arg770 (3.17 Å) e interacciones hidrofóbicas entre el núcleo base de la cumarina y Phe771, Ile380, Tyr573 y Tyr613. Además de interacciones polares débiles entre los hidrógenos de la cumarina e His571, Glu382 y Asn284 (Figura 27, C).



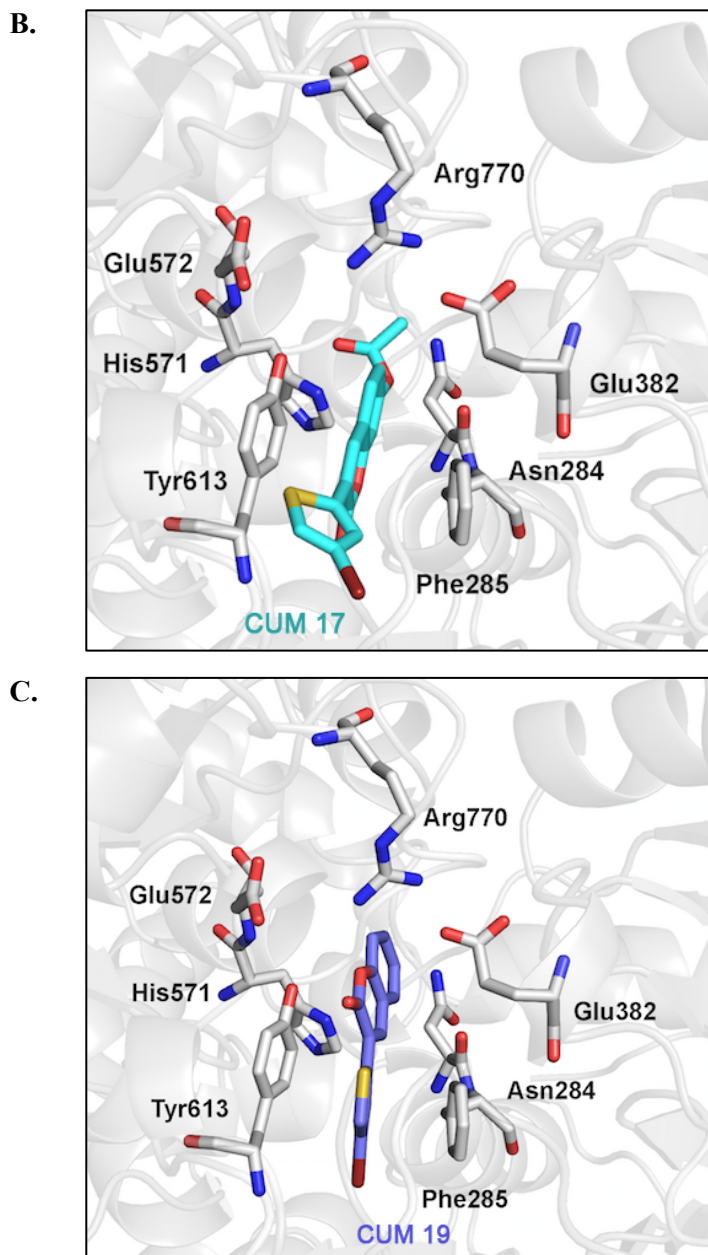


Figura 27. Interacciones observadas en el sitio inhibidor de GPα. A. Posición adoptada por CUM 16 (rosado). B. Posición adoptada por CUM 17 (turquesa). C. Posición adoptada por CUM 19 (morado). El fragmento de la proteína observado se visualiza en gris claro, destacándose los residuos más importantes en la interacción con las cumarinas.

Los resultados no permitieron determinar el sitio de unión de las cumarinas a la GPα para lograr su inhibición (o si se unen a más de uno). Los resultados de docking en cuanto a las

interacciones formadas, que mejor explican las diferencias observadas en los resultados de inhibición enzimática, son los observados en el sitio alostérico; ya que si bien las tres cumarinas estudiadas (CUM 19, 17 y 16), establecen interacciones hidrofóbicas a través del núcleo base de la cumarina, CUM 16 (de gran potencia inhibitoria) además establece interacciones hidrofóbicas gracias al sustituyente tiofeno y establece un puente de hidrógeno a través del sustituyente hidroxilo (el cual la caracteriza y diferencia estructuralmente de las otras cumarinas). En cambio, CUM 17 (capacidad inhibitoria significativamente menor en comparación a CUM 16) si bien establece un puente de hidrógeno mediante el carbonilo del núcleo base, a diferencia de la CUM 16, no manifiesta interacciones hidrofóbicas con el grupo tiofeno. Mientras que CUM 19 (sin actividad inhibitoria de la GPa y solo con el grupo bromotiofeno como sustituyente) establece interacciones hidrofóbicas a través del tiofeno, pero no establece ningún puente de hidrógeno.

Sumado a lo anterior, es importante destacar que no se observaron grandes diferencias en las interacciones establecidas por las tres cumarinas estudiadas en el sitio catalítico de GPa. Tampoco se observan grandes diferencias entre las cumarinas en el sitio de interfaz dimérica (CUM 16 es significativamente más potente que CUM 17 para inhibir a GPa, pero ambas establecen varios puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en este bolsillo de unión) y además, los valores de energía de afinidad para este sitio entregados por el ensayo de docking, fueron los menos favorables. En el sitio inhibidor, los residuos más importantes son Phe285 y Tyr613, los cuales constituyen el centro de este sitio y la mayoría de los inhibidores que se unen a este bolsillo establecen interacciones del tipo π -stacking con ellos, formando un complejo tipo *sándwich* que estabiliza la conformación menos activa de la enzima (Tsitsanou et al., 2000; Tsitsanou et al., 2013); en relación a esto las dos cumarinas con capacidad inhibitoria frente GPa, CUM 16 y CUM 17, manifestaron estas importantes interacciones hidrofóbicas a diferencia de CUM 19 (que no manifestó actividad inhibitoria enzimática) y por lo tanto, se podría racionalizar la diferencia en cuanto a actividad enzimática. Sin embargo la diferencia existente en la potencia inhibitoria entre CUM 16 y CUM 17 no se logra explicar con las interacciones observadas en este sitio, ya que son muy similares, incluso se observan más interacciones con CUM 17.

En cambio, como se explicó previamente, en el sitio alostérico de GPa (sitio alostérico de AMP) existen mayor cantidad de interacciones con CUM 16 que pueden justificar su mayor potencia inhibitoria y además, otros inhibidores descritos anteriormente que se unen al sitio alostérico, demostraron interacciones similares con residuos en común con esta cumarina tales como

Arg81, Arg193, Arg310, Gln71, Tyr155, Trp67 y Val40 (Deng et al., 2005), confirmando la importancia de estas interacciones observadas.

3.4. Estudios frente a tirosina fosfatasa 1B

3.4.1. Ensayo de inhibición de la actividad de PTP-1B

Se evaluaron distintas concentraciones de las cumarinas seleccionadas luego del ensayo preliminar, con el fin de determinar la potencia inhibitoria, expresada como CI_{50} . En la Figura 28 se observan los gráficos de inhibición vs concentración de algunos de los inhibidores estudiados.

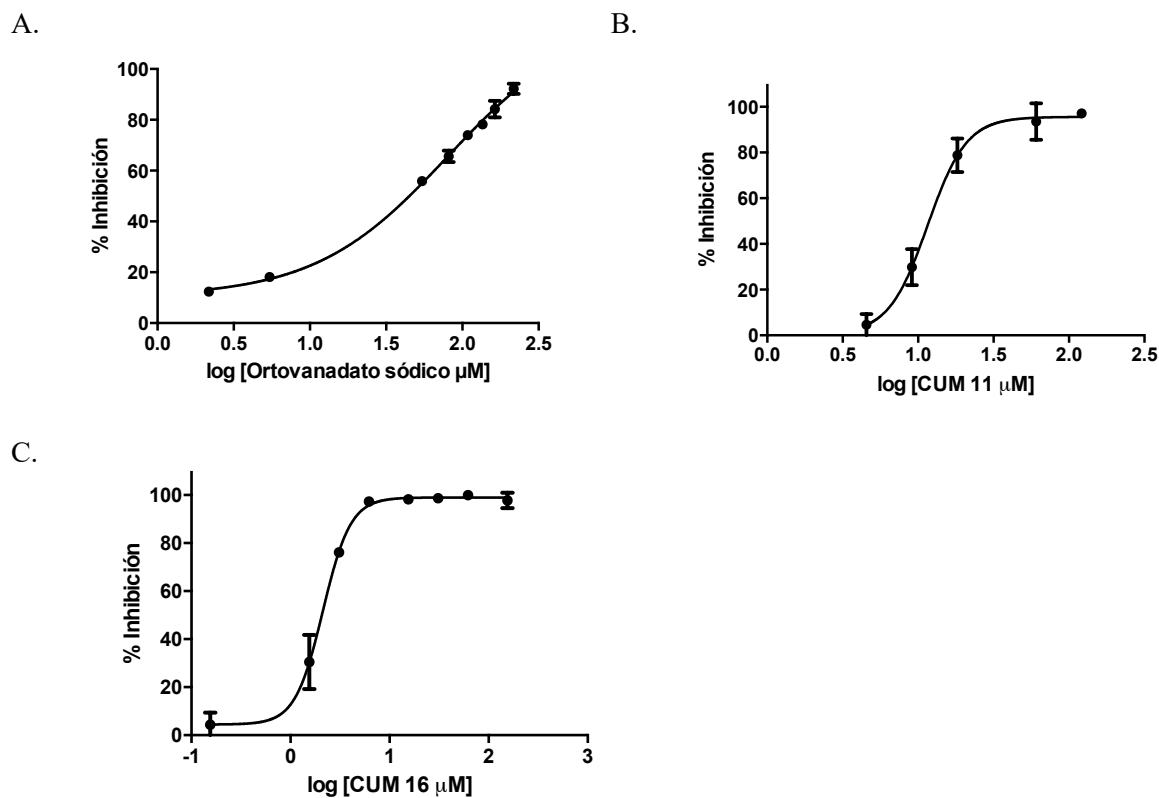


Figura 28. Porcentajes de inhibición de PTP-1B vs concentración (μM) del inhibidor. A: inhibidor estándar utilizado (ortovanadato sódico); B: CUM 11; C: CUM 16.

Los resultados de potencia inhibitoria obtenidos por las cumarinas se exponen en la Tabla 13 y Figura 29.

Tabla 13. Potencia inhibitoria de las muestras frente a PTP-1B

MUESTRAS	CI ₅₀ (μM)	DS
CUM 2	N.C (↑ 6,6 %)	--
CUM 5	N.C (↑ 60,2 %)	--
CUM 9	N.C (↑ 8,5 %)	--
CUM 11	11,37	0,78
CUM 12	N.C (↑ 13,4 %)	--
CUM 13	N.C (↑ 9,8 %)	--
CUM 16	2,10	0,28
CUM 17	4,82	0,31
CUM 18	10,38	0,75
CUM 19	4,06	0,46
Ortovanadato sódico	80,42	9,01

DS: Desviación estándar, N.C: No cuantificable, ↑: % inhibición máximo obtenido

Todas las cumarinas fueron capaces de inhibir la actividad de la PTP-1B, pero sólo cinco moléculas fueron lo suficientemente eficaces para determinar sus CI₅₀ (CUM 11, CUM 16, CUM 17, CUM 18 y CUM 19).

Al comparar las CI₅₀, se observó que las cinco cumarinas son significativamente más potentes para inhibir la enzima que la molécula estándar utilizada, ortovanadato sódico.

Las CI₅₀ de las CUM 11 y CUM 18 no se diferenciaron de forma significativa. Éstas corresponden a las moléculas menos potentes de las cinco. Las CI₅₀ de las CUM 17 y CUM 19, tampoco se diferenciaron de forma significativa.

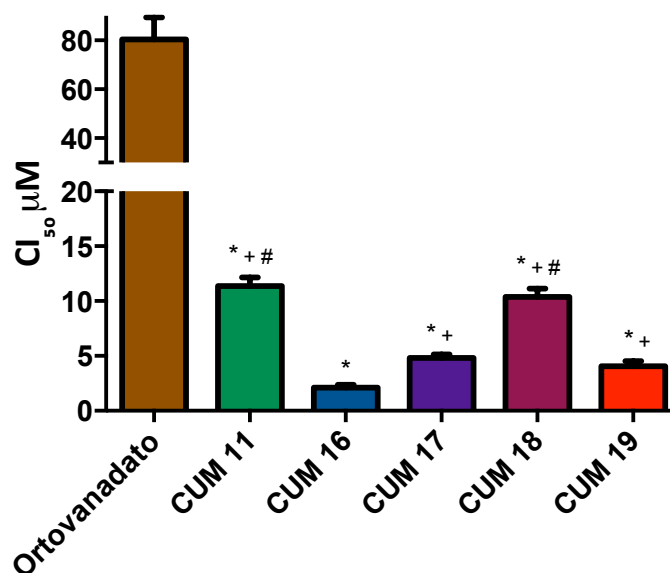


Figura 29. CI₅₀ de los inhibidores de la actividad de la PTP-1B y análisis estadístico. * = diferencias significativas respecto al ortovanadato, + = diferencias significativas respecto a la CUM 16, # = diferencias significativas respecto a la CUM 17 y CUM 19, utilizando el test de ANOVA, seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey considerando un $p \leq 0,05$. CUM: cumarina.

En relación con los resultados de los ensayos enzimáticos anteriormente mostrados, las CUM 11, CUM 16, CUM 17, CUM 18 y CUM 19 fueron potentes inhibidoras de la actividad tanto de la α -glucosidasa como de la PTP-1B; por lo tanto, en esta tesis se presentan varias moléculas capaces de inhibir concomitantemente dos enzimas de gran importancia en el control glicémico. De esta forma, las CUM 11, 16, 17, 18 y 19 son buenas candidatas para continuar con ensayos pre-clínicos, ya que se esperaría que al ser capaces de actuar en dos blancos farmacológicos distintos y de forma simultánea, se podría traducir en un mejor control glicémico (diferentes mecanismos de acción, pero con la misma finalidad). Es importante destacar además, que CUM 16 y CUM 17 manifestaron también actividad inhibitoria de la actividad de GPα, por lo tanto estas dos cumarinas son capaces de actuar en tres blancos enzimáticos diferentes. Si bien la CUM 17 no mostró una elevada potencia inhibitoria para GPα (CI₅₀ significativamente mayor que el de la cafeína), la CUM 16 si obtuvo potencias elevadas y similares para las tres enzimas bajo estudio.

Si correlacionamos los resultados con las estructuras químicas, podemos inferir que la adición del grupo clorofenil (CUM 11) como sustituyente de las cumarinas de la familia 2, aumenta el efecto inhibitorio sobre la actividad de la PTP-1B. Además, al igual que para la α -glucosidasa, para PTP-1B se observa que los compuestos pertenecientes a la familia 3 (poseen al bromotiofeno como principal sustituyente) son todos potentes inhibidores, por lo tanto, el sustituyente bromotiofeno de las cumarinas también podría influir positivamente en la actividad inhibitoria de PTP-1B. Asemejándose a lo propuesto por Tang et al. (2013) sobre la unión al sitio alostérico de la enzima por inhibidores con grupos tiazoles en su estructura. Además, la actividad inhibitoria se ve favorecida aún más por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 6 de la cumarina como sucede con la CUM 16.

Un estudio anterior sobre inhibición enzimática (α -glucosidasa, GP_a, PTP-1B, entre otras) y actividad antihiper glucémica de una serie de piranocumarinas, demostró que tales derivados cumarínicos manifestaron una mayor capacidad en reducir la glicemia en comparación a la metformina, y un efecto antihiper glucémico similar al de rosiglitazona. Sin embargo, las potencias inhibitorias obtenidas por las piranocumarinas, fueron bastante inferiores en comparación a los resultados obtenidos por las cumarinas estudiadas en este trabajo. Las piranocumarinas no alcanzaron una eficacia suficiente en inhibir a la α -glucosidasa y GP_a, por lo que no se logró determinar los CI₅₀, mientras que para PTP-1B, las CI₅₀ determinadas fueron todas superiores a 24 μ M, por lo menos 10 veces menos potente que la CUM 16 (Kumar et al., 2009).

3.4.2. Cinética de inhibición enzimática frente PTP-1B

En la Tabla 14, se muestran los valores de V_{max} y K_m obtenidos, junto a las diferencias significativas encontradas y en la Figura 30 se observan los gráficos de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos de las cinco cumarinas con capacidad inhibitoria y el ortovanadato sódico.

Tabla 14. Valores de V_{max} y K_m obtenidos en la inhibición de PTP-1B

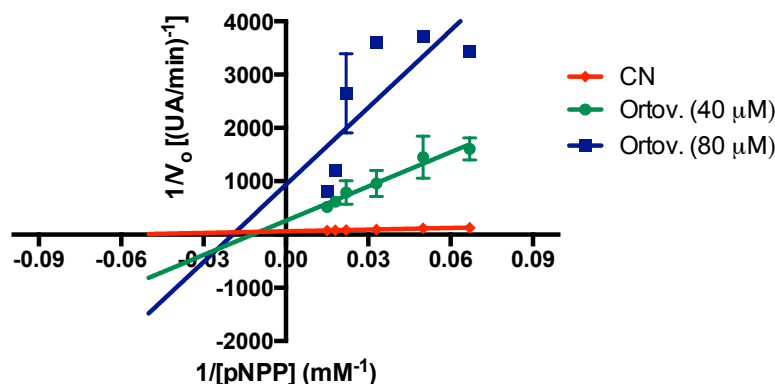
Muestras (μM)	V_{max} (UA/min) \pm D.S	K_m (mM) \pm D.S
CN	0,0165 \pm 0,0009	17,07 \pm 1,24
CUM 11 (7,5)	0,0215 \pm 0,0008	34,88 \pm 3,20
CUM 11 (15)	0,0184 \pm 0,0010	21,97 \pm 1,39
CUM 11 (30)	0,0149 \pm 0,0007	17,67 \pm 1,97
CUM 16 (2)	0,0185 \pm 0,0040	24,19 \pm 7,93
CUM 16 (4)	0,0182 \pm 0,0036	58,21 \pm 1,37
CUM 17 (3)	0,0226 \pm 0,0018	34,02 \pm 6,61
CUM 17 (7)	0,0132 \pm 0,0013	23,05 \pm 5,07
CUM 18 (6)	0,0140 \pm 0,0012	21,30 \pm 4,65
CUM 18 (12)	0,0136 \pm 0,0012	26,18 \pm 4,67
CUM 18 (24)	0,0258 \pm 0,0116	146,23 \pm 96,08 *
CUM 19 (2)	0,0187 \pm 0,0011	23,89 \pm 2,80
CUM 19 (4)	0,0141 \pm 0,0010	16,85 \pm 2,72
CUM 19 (8)	0,0176 \pm 0,0017	29,97 \pm 6,61
O. Sódico (40)	0,0041 \pm 0,0010 *	85,52 \pm 20,34 *
O. Sódico (80)	0,0011 \pm 0,0001 *	56,97 \pm 1,38

CN: control negativo (sin inhibidor), V_{max} : velocidad máxima enzimática, K_m : constante de Michaelis Menten, S.D.: desviación estándar, UA: unidades de absorbancia, min: minutos. * representa diferencias significativas con el control negativo, según el test ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Tukey.

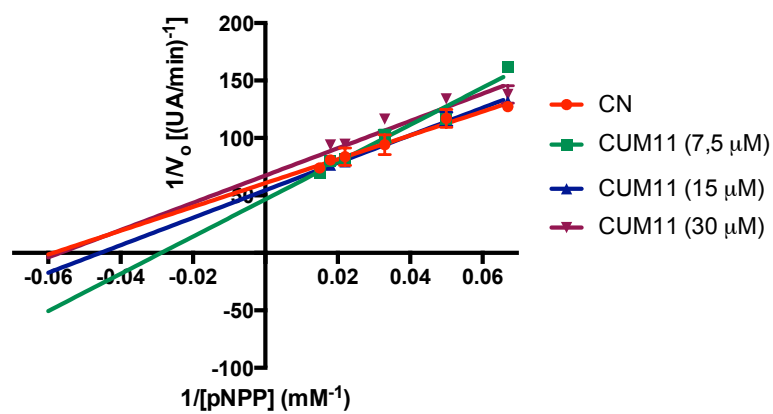
Luego de un análisis tanto numérico como gráfico se establecieron los modelos de inhibición enzimática para los distintos inhibidores. A pesar de que el ortovanadato sódico aumentara la K_m y disminuyera la V_{max} , de forma significativa, con respecto al control negativo (sin inhibidor), no se pudo determinar el tipo de inhibición con las concentraciones evaluadas, ya que en el gráfico de Lineweaver-Burk no se observa un comportamiento claro a la concentración mayor evaluada. Con respecto a los resultados obtenidos con las cumarinas, CUM 11 aumenta la V_{max} y la K_m con respecto al control negativo, a las dos concentraciones inferiores, mientras que a la concentración superior se comporta como inhibidor mixto,

disminuyendo la V_{\max} pero aumentando la K_m , es por este comportamiento que no se pudo determinar el tipo de inhibición que ejerce sobre PTP-1B. CUM 16 si bien aumenta levemente la V_{\max} , aumenta considerablemente la K_m con respecto al control negativo, además gráficamente se observa que la intersección de las rectas ocurre en el eje de las ordenadas, actuando por lo tanto, como un inhibidor competitivo. Para la CUM 17 en ambas concentraciones evaluadas se distingue un aumento en la K_m , sin embargo, no se observa un efecto claro sobre la V_{\max} y además en el gráfico de dobles recíprocos no se observa un comportamiento claro, por lo que no se logró determinar el tipo de inhibición para esta cumarina. CUM 18 muestra un tipo de inhibición mixto a las dos concentraciones más bajas evaluadas, disminuyendo la V_{\max} y aumentando la K_m con respecto al control negativo, observando en el gráfico la intersección de las rectas en el segundo cuadrante, sin embargo, a la concentración mayor evaluada, este comportamiento cambia y se observa un aumento tanto de la V_{\max} como de la K_m , esta última aumenta a un valor significativamente más alto. Finalmente, CUM 19 a las concentraciones de 2 y 8 μM aumenta levemente la V_{\max} y aumenta en mayor medida la K_m , además en el gráfico se observa la intersección en el eje de las ordenadas, actuando por lo tanto, como un inhibidor competitivo, sin embargo a la concentración de 4 μM se pierde este comportamiento y actúa como inhibidor acompetitivo, disminuyendo ambos parámetros cinéticos.

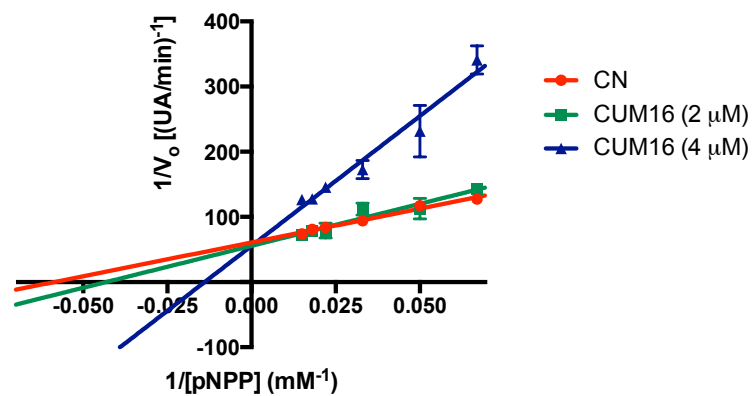
A.



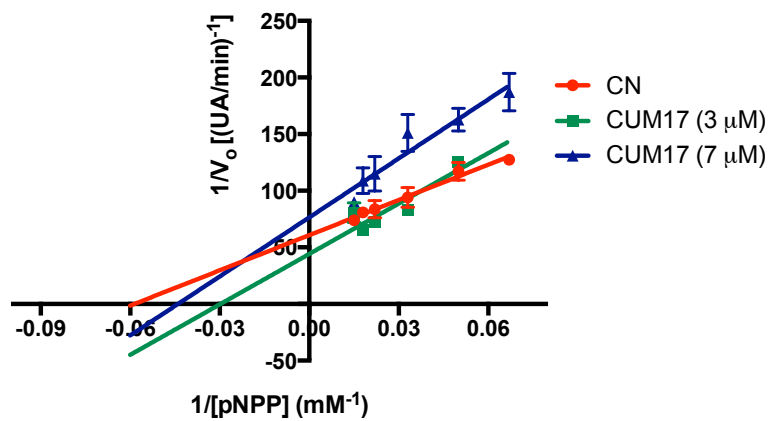
B.



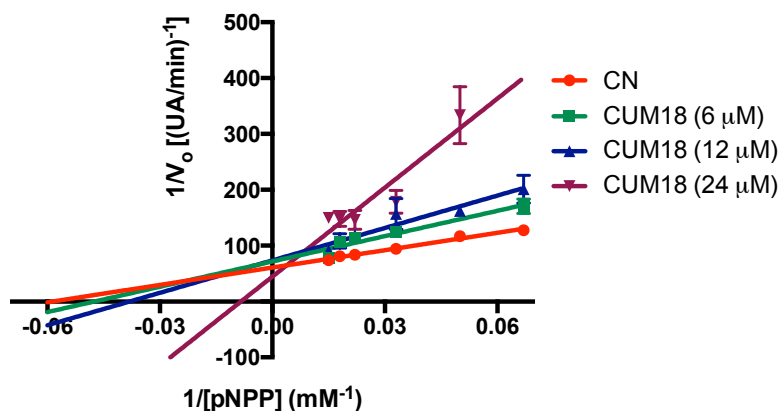
C.



D.



E.



F.

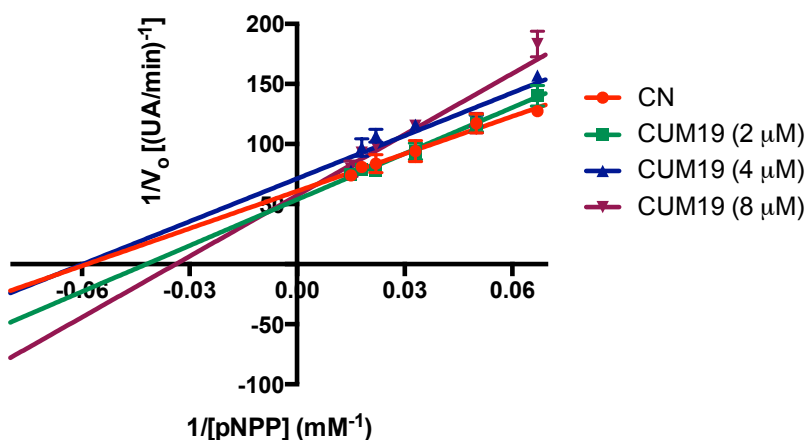


Figura 30. Gráficos de Lineweaver-Burk para el ortovanadato sódico y las cumarinas. A: inhibidor estándar, ortovanadato sódico (tipo de inhibición no determinado). B: cumarina 11 (tipo de inhibición no determinado). C: cumarina 16 (inhibidor competitivo). D: cumarina 17 (tipo de inhibición no determinado). E: cumarina 18 (inhibidor mixto a las concentraciones menores). G: cumarina 19 (inhibidor competitivo a la concentración menor y mayor).

3.4.3. Estudio computacional por Docking de unión de los inhibidores al sitio catalítico y sitio alostérico de la PTP-1B

Se estudiaron dos bolsillos de unión en la enzima, el sitio catalítico (SCAT) y el sitio alostérico (SALO), con el fin de determinar el bolsillo por el cual las cumarinas tienen mayor afinidad para unirse y lograr la inhibición de la PTP-1B (Figura 31).

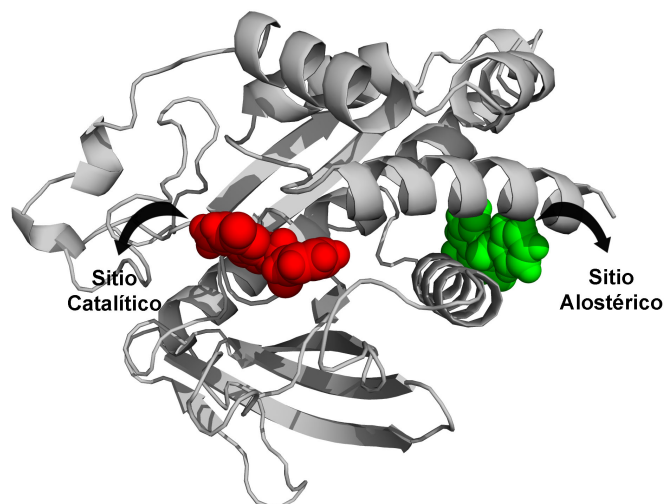


Figura 31. Sitios de unión de los inhibidores a la PTP-1B mediante docking. En la figura se muestra la posición de los diferentes sitios de unión estudiados para la interacción cumarina-PTP-1B. En rojo el sitio catalítico y en verde el sitio alostérico de la enzima.

Como se observa en la Tabla 15, no hay diferencias energéticas suficientes (igual o mayor a una unidad) que determinen la preferencia de unión entre ambos bolsillos, por parte de las cumarinas. Solo en la cumarina 13 neutra existe una mayor afinidad de unión por el sitio catalítico de la enzima, *versus* el sitio alostérico.

Tabla 15. Energías de afinidad de unión para PTP-1B

Energías de afinidad (kcal) para PTP-1B											
Bolsillos	CUM 2	CUM 5	CUM 9	CUM 11	CUM 12	CUM 13P	CUM 13N	CUM 16	CUM 17	CUM 18	CUM 19
SCAT	-5,9	-6,4	-6,9	-6,9	-6,7	-6,8	-6,8	-6,1	-5,8	-6,4	-6,2
SALO	-5,2	-6,0	-6,2	-6,2	-6,0	-5,9	-5,7	-5,5	-5,7	-5,5	-6,2

SCAT: sitio catalítico; SALO: sitio alostérico; kcal: kilocalorías; CUM 13P: cumarina 13 protonada; CUM 13N: cumarina 13 neutra.

Para racionalizar los resultados enzimáticos obtenidos y tratar de dilucidar los grupos funcionales de mayor importancia para lograr la inhibición de la PTP-1B, se estudiaron las interacciones enzima-inhibidor de dos amidocumarinas, CUM 9 (CI_{50} no determinado por falta de eficacia como inhibidor) y CUM 11 (11,4 μM), y de dos bromotiofeno cumarinas, CUM 16 (2,1 μM) y CUM 19 (4,1 μM), en los dos sitios de unión estudiados.

En el sitio catalítico observamos que CUM 9 establece dos puentes de hidrógeno entre el sustituyente hidroxilo de la cumarina y dos residuos: Arg221 (3.10 Å) y Gln266 (3.35 Å). Además de formar interacciones hidrofóbicas con el núcleo base de la cumarina y Gly220, Ile219, Ala217 y Gln262, junto con interacciones hidrofóbicas entre el sustituyente fenilo y los residuos Thr263 y Gly183 (Figura 32, A).

CUM 11 no establece ningún puente de hidrógeno, pero si se observa interacción π -stacking entre el sustituyente fenil de la cumarina y Tyr46. Además, el núcleo base de la cumarina presenta interacciones hidrofóbicas con los residuos Gly220, Arg221, Gln266 y Trp179 (Figura 32, A).

En el sitio catalítico CUM 16 presenta una interacción de puente de hidrógeno débil entre el oxígeno de la cumarina y Arg221 (3.28 Å), además de un puente de hidrógeno entre el sustituyente hidroxilo de la cumarina con la amina del enlace peptídico de Gly220 (2.99 Å) (Figura 32, B).

Finalmente CUM 19, establece un puente de hidrógeno entre el oxígeno de la cumarina y la cadena lateral de Arg221 (3.27 Å). Además, el núcleo base de la cumarina presenta interacciones hidrofóbicas con los residuos: Gln262, Gly220, Ile219 y Cys215, mientras que el sustituyente tiofeno de la cumarina presenta interacción hidrofóbica con Thr263 (el bromo se orienta afuera de la cavidad) (Figura 32, B).

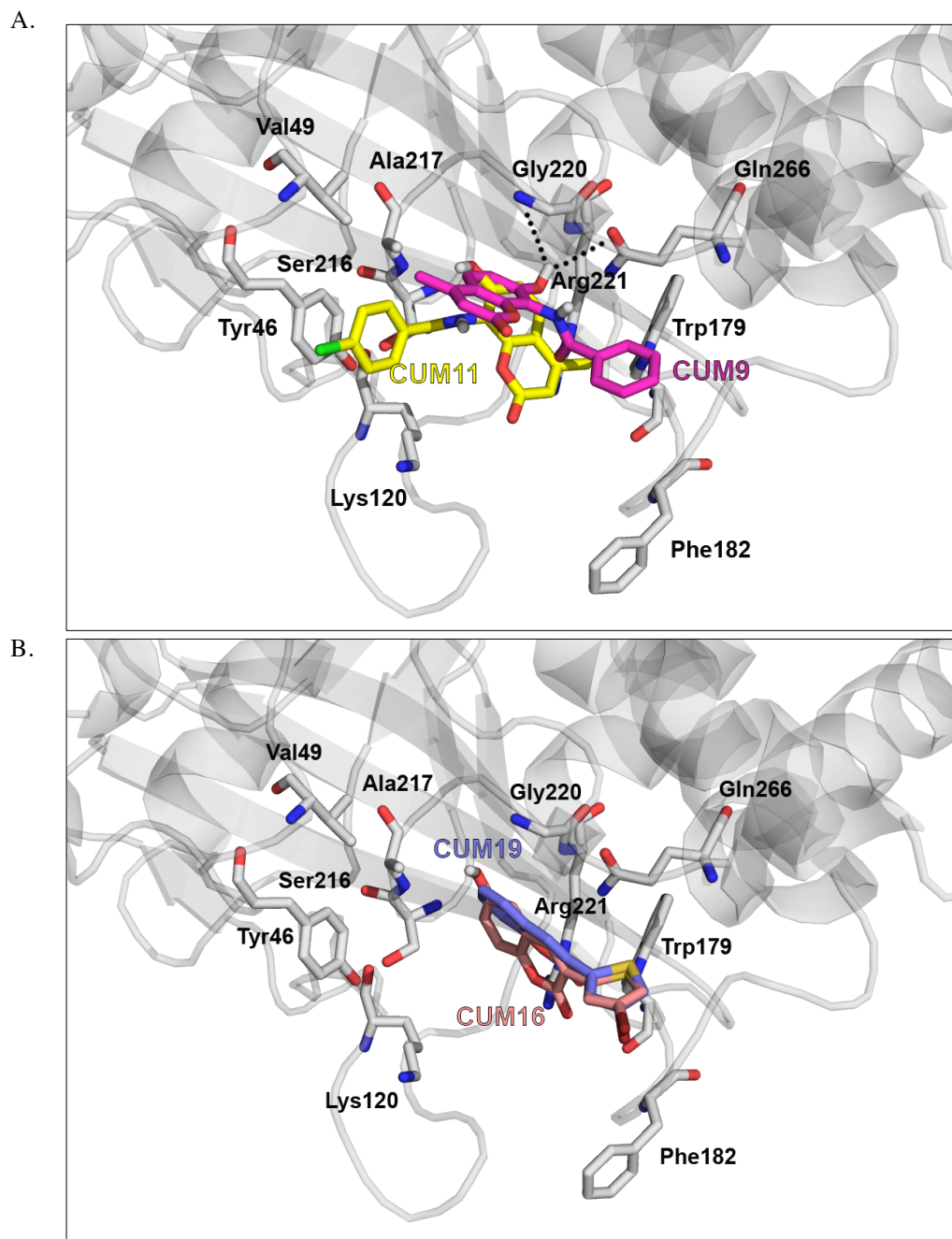


Figura 32. Interacciones observadas en el sitio catalítico de PTP-1B. A. Posición adoptada por CUM 9 (rosado) y CUM 11 (amarillo) en el sitio catalítico. B. Posición adoptada por CUM 16 (rosa) y CUM 19 (morado) en el sitio catalítico. El fragmento de la proteína observado se distingue en gris claro, destacándose los residuos más importantes en la interacción con las cumarinas.

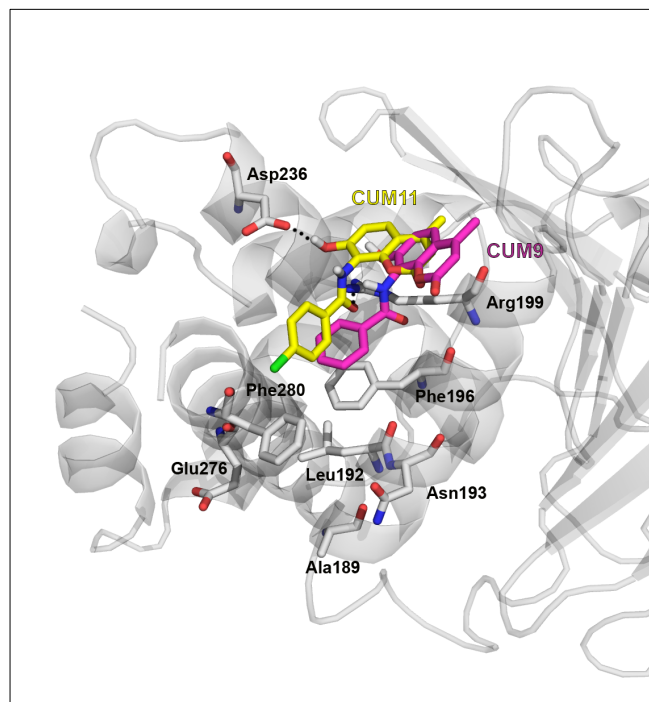
En el sitio alostérico de PTP-1B observamos que CUM 9 no establece ningún puente de hidrógeno, mientras que se observan interacciones hidrofóbicas entre el núcleo base de la cumarina y las cadenas alifáticas de los residuos Arg199 y Glu200, además de interacciones π -stacking entre el sustituyente fenil de la cumarina y Phe196, junto con interacciones hidrofóbicas entre el mismo sustituyente y los residuos Ile281 y Phe280 (Figura 33, A).

CUM 11 en este sitio de unión forma un puente de hidrógeno entre el carbonilo de la amida de la cumarina y Arg199 (3.09 Å) y un segundo puente de hidrógeno entre sustituyente hidroxilo de la cumarina y Asp236 (2.76 Å). Además, se observan interacciones hidrofóbicas entre el núcleo base de la cumarina y los residuos Glu200 y Ser205, junto con interacciones hidrofóbicas entre el sustituyente fenil y los residuos Phe280 e Ile281, además de una interacción del tipo *edge to face* entre el mismo sustituyente y Phe196 (Figura 33, A).

En el sitio alostérico CUM16 no establece ningún puente de hidrógeno, sin embargo se observan interacciones hidrofóbicas entre el núcleo base de la cumarina y los residuos Arg199 y Glu200 (parte alifática), además de existir una interacción aromática con Phe196. Al igual que con CUM 11, se observa que el sustituyente tiofeno presenta una interacción *edge to face* con Phe280 (Figura 33, B).

Finalmente en este bolsillo de unión, CUM 19 se aprecia totalmente plano y no estableció ningún puente de hidrógeno con la enzima, sin embargo se observan interacciones hidrofóbicas entre el núcleo base de la cumarina y los residuos Phe280, Glu200, Arg199 e Ile281. Además de una interacción π -stacking entre el núcleo base de la cumarina y Phe196. También se observa una interacción hidrofóbica entre el sustituyente tiofeno de la cumarina y el residuo Arg199 (Figura 33, B).

A.



B.

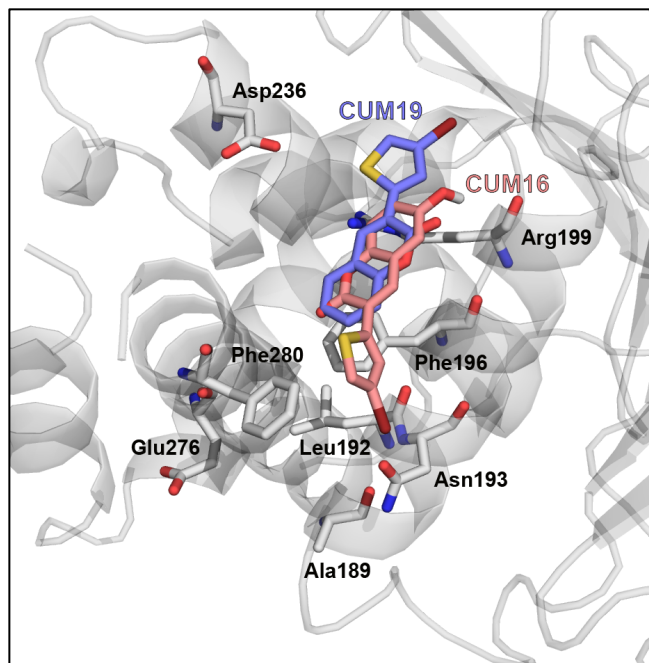


Figura 33. Interacciones observadas en el sitio alostérico de PTP-1B. A. Posición adoptada por CUM 9 (rosado) y CUM 11 (amarillo) en el sitio alostérico. B. Posición adoptada por CUM 16 (rosa) y CUM 19 (morado) en el sitio alostérico. El fragmento de la proteína observado se distingue en gris claro, destacándose los residuos más importantes en la interacción con las cumarinas.

Con los resultados de energía de afinidad entregados por el docking no se pudo establecer con seguridad a que bolsillo se unen las cumarinas para inhibir la actividad de la PTP-1B. A pesar de que para el sitio catalítico los resultados son levemente menores y por lo tanto más favorables en comparación al sitio alostérico, los valores energéticos obtenidos en ambos bolsillos son muy similares (diferencias entre ambos menores a una unidad, a excepción de CUM 13 neutra que posee mayor afinidad de unión por el sitio catalítico) y por lo tanto, ninguno sitio de unión se puede descartar. Sin embargo, se puede apreciar en el sitio catalítico que la CUM 16, la cual corresponde a la cumarina que inhibe de forma más potente a la enzima, posee menos interacciones en comparación a las otras cumarinas estudiadas; y si bien aparecen interacciones con residuos importantes del sitio activo como Arg221, Cys215, Tyr46 y Gln262, existen varios residuos de importancia para la acción catalítica de la enzima y para la inhibición de ésta, que no se observan en los resultados, como por ejemplo interacciones con Asp181, Phe182, Ala217, Asp48 y Val49.

En el sitio alostérico podemos apreciar que para las amidocumarinas estudiadas, CUM 9 la cual no logró inhibir a la PTP-1B de forma eficaz, establece solo interacciones aromáticas e hidrofóbicas, en cambio CUM 11 (adición de un sustituyente cloro en su estructura) que posee acción inhibitoria potente (CI_{50} : 11,37 μ M) estableció además de las interacciones hidrofóbicas y aromáticas, dos puentes de hidrógeno con Arg199 y Asp236, lo que puede explicar su actividad inhibitoria. Para las bromotiofeno cumarinas no parece ser importante la presencia de puentes de hidrógeno, ya que tanto CUM 16 como CUM 19 son inhibidores potentes de la enzima y ninguna de las dos cumarinas estableció este tipo de interacciones, por el contrario ambas cumarinas desarrollan diversas interacciones hidrofóbicas y aromáticas tanto con el núcleo base de la cumarina, como con el sustituyente bromotiofeno, destacándose las interacciones con los residuos Phe196 y Phe280. Es probable que la presencia de las interacciones del tipo *edge to face* sean más favorables para lograr una potente inhibición de la actividad de la PTP-1B, de forma similar a lo observado con la α -glucosidasa, ya que se aprecia en dos de las tres cumarinas con elevada actividad inhibitoria estudiadas, en CUM 11 (única cumarina activa de la familia 2) que se establece entre el sustituyente fenil y Phe196; y en CUM 16 (cumarina más potente) que se establece entre el sustituyente tiofeno y Phe280. Además, otros inhibidores publicados previamente que logran la inhibición de PTP-1B al unirse al sitio alostérico, también establecen interacciones con los residuos Phe196, Phe280, Leu192 y Ala189, teniendo por lo tanto un papel

importante en este bolsillo enzimático (Jian et al., 2012; Tonks N., 2003; Dong et al., 2017; Park et al., 2009; Tang et al., 2013; Liu et al., 2013).

Finalmente hay que destacar que las cinco cumarinas que lograron inhibir de forma potente a la PTP-1B, poseen CI_{50} menores a 15 μ M, superando a otros inhibidores previamente reportados. Park y colaboradores (2009) estudiaron una serie de compuestos los cuales demostraron valores de energía de afinidad menores a -20 kcal/mol y CI_{50} superiores a 20 μ M en la mayoría de los compuestos. Aunque los valores de energía de afinidad de las cumarinas estudiadas en esta tesis, no son tan favorables como en dicho estudio, éstas sobresalen por su mayor potencia inhibitoria.

3.5. Actividad antioxidante *in vitro* frente a radical peroxilo, ORAC-FL

Al utilizar la FL se obtendrán valores antioxidantes relacionados con la estequiometría de las muestras (número de moléculas de radicales libres neutralizados por cada molécula del antioxidante), dado que el mecanismo oxidativo de esta sonda sigue un patrón de HAT (cesión de un átomo de hidrógeno) (Alarcón et al., 2008).

El compuesto estándar utilizado fue el trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E), el cual posee un bajo potencial de reducción y por lo tanto, regenera rápidamente el radical fluoresceinyl formado, hacia fluoresceína nuevamente, preservando la fluorescencia en el ensayo (Bisby et al., 2008). El trolox como resultado produjo una pendiente de decaimiento de la fluoresceína de $2,48E^{+08} \pm 0,48$ y se estableció para ella un índice ORAC = 1.

La curva de decaimiento de la fluorescencia liberada por la fluoresceína en presencia de distintas concentraciones del trolox y de las cumarinas 11 y 16 se observan en la Figura 34 y 35 respectivamente.

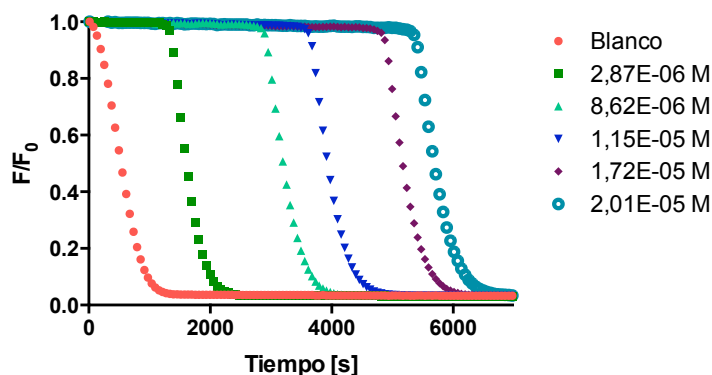


Figura 34. Decaimiento de la fluorescencia de la fluoresceína en presencia del trolox. F/F_0 = fluorescencia emitida/fluorescencia inicial. Se observa la protección otorgada por trolox a la fluoresceína, dado que el decaimiento de la fluorescencia progresa más lentamente en su presencia en comparación al blanco (sin antioxidante) y a medida que se aumenta la concentración del antioxidante, aumenta más la protección.

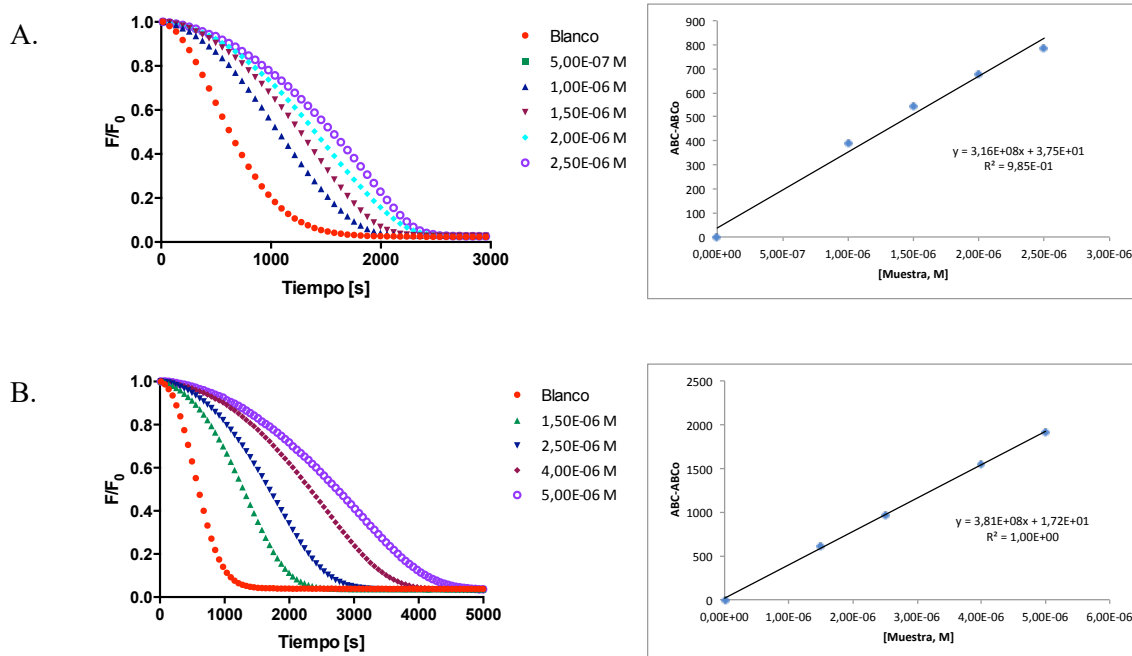


Figura 35. Decaimiento de fluorescencia y ecuaciones lineales obtenidas por CUM 11 y CUM 16. F/F_0 = fluorescencia emitida/fluorescencia inicial. A: Decaimiento de la fluorescencia en concentraciones crecientes de CUM 11 y ecuación de la recta obtenida. B: Decaimiento de la fluorescencia en concentraciones crecientes de CUM 16 y ecuación de la recta obtenida.

Los resultados de las pendientes de decaimiento y de los índices ORAC para las cumarinas y el trolox, se expresan en la Tabla 16.

Tabla 16. Pendientes e índices ORAC-FL

MUESTRAS	PROMEDIO PENDIENTES	PROMEDIO ÍNDICES ORAC ± DS
CUM 2	4,22E ⁺⁰⁸	1,70 ± 0,07
CUM 5	2,85E ⁺⁰⁸	1,15 ± 0,09
CUM 9	6,16E ⁺⁰⁸	2,48 ± 0,03
CUM 11	3,26E ⁺⁰⁸	1,31 ± 0,06
CUM 12	6,37E ⁺⁰⁸	2,57 ± 0,08
CUM 13	5,79E ⁺⁰⁸	2,33 ± 0,02
CUM 16	3,95E ⁺⁰⁸	1,59 ± 0,01
CUM 17	0,82E ⁺⁰⁸	0,33 ± 0,04
CUM 18	5,10E ⁺⁰⁸	2,06 ± 0,02
CUM 19	0,72E ⁺⁰⁸	0,29 ± 0,01
TROLOX	2,48E ⁺⁰⁸	1,00 ± 0,00

DS: Desviación estándar

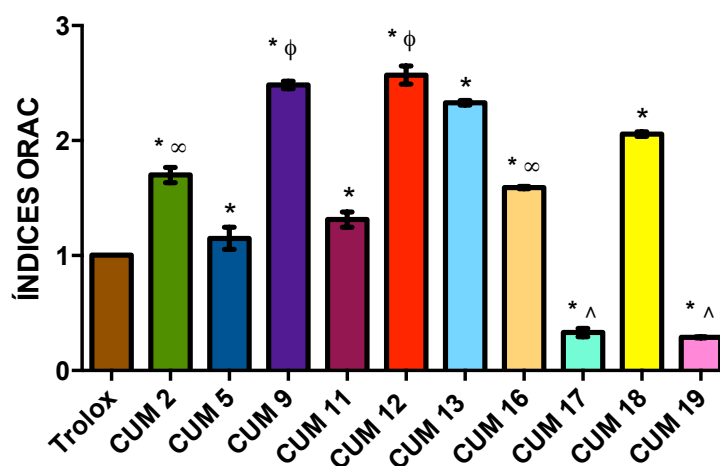


Figura 36. Índices ORAC-FL y análisis estadístico. * = Diferencias significativas con respecto al trolox; igual símbolo señala diferencia no significativa utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey. CUM: cumarina.

Como resultado de este ensayo, se observa que ocho cumarinas poseen mayor actividad antioxidante que el trolox para contrarrestar los efectos del radical peroxilo, de forma significativa, y por lo tanto, se consideran buenos compuestos antioxidantes (Figura 36).

Al comparar entre las cumarinas, observamos que los índices ORAC para la CUM 9 y CUM 12 son equivalentes, al no presentar diferencias significativas entre ellos, y por lo tanto ambos se consideran los compuestos más activos para este ensayo antioxidante.

Además, se observa que la adición de un grupo metoxifenil en la familia uno (CUM 2 vs CUM 5) y el cambio de un grupo fenil a una piridina o a un clorofenil en la familia dos (CUM 9 vs CUM 11 y CUM 13 respectivamente), disminuyen los índices ORAC. La disminución del efecto antioxidante en una cumarina sintética con un sustituyente clorofenil, también fue observada con anterioridad por Pérez-Cruz y colaboradores (2012).

La CUM 17 y CUM 19 son las únicas dos cumarinas que obtuvieron índices ORAC inferiores al trolox (sin diferencias significativas entre ellas como se observa en la Figura 36), por lo que no se consideran compuestos antioxidantes en este ensayo. Es importante destacar que ambas estructuras químicas son las únicas que carecen de una molécula de hidroxilo, por lo que se puede inferir que es fundamental su presencia para el efecto antioxidante determinado por ORAC-FL, tal cual como se concluye en trabajos previos (Pérez et al., 2013 b).

El orden descendente en actividad para las cumarinas es:

CUM 12 = CUM 9 > CUM 13 > CUM 18 > CUM 16 = CUM 2 > CUM 11 > CUM 5 > CUM 17 = CUM 19

Si analizamos las distintas estructuras, podemos inferir que en general aquellas cumarinas que poseen un mejor índice ORAC pertenecen a la segunda familia de compuestos, las cuales poseen tres sustituyentes bases, un metilo en la posición 4, un hidroxilo en la posición 7 y una amida en la posición 8. En esta familia, el grupo clorofenil (CUM 11) pareciera perjudicar la actividad antioxidante frente el radical peroxilo, dado que el índice ORAC disminuye de forma significativa, con respecto a los otros sustituyentes.

En general, si comparamos los índices ORAC obtenidos con los resultados de otras cumarinas, podemos ver que son inferiores en algunos casos (Pérez et al., 2013 a; Pérez et al., 2013 b;

Matos et al., 2013) por lo tanto, la serie de cumarinas estudiada en este trabajo no posee una capacidad antioxidante mediante ORAC-FL destacada.

3.6. Actividad antioxidante *in vitro* frente a radical hidroxilo, EPR

Este ensayo permite determinar la reactividad antioxidante entre las muestras en estudio. Con el fin de prolongar el tiempo de vida media del radical hidroxilo se utiliza una molécula como atrapador (spin trap), en este caso el 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), el cuál forma un patrón de acoplamiento hiperfino determinado cuando se une al radical hidroxilo (cuatro líneas con intensidades de proporciones 1:2:2:1), en presencia de un campo magnético externo. Al adicionar una muestra antioxidante, el DMPO compite con ésta por el radical hidroxilo para formar el aducto con éste, de tal forma que, si las muestras antioxidantes son lo suficientemente reactivas, superando al DMPO, el patrón de acoplamiento disminuye en intensidad. De esta forma, al adicionar las cumarinas al sistema se espera reducir la intensidad del espectro de resonancia de espín electrónica formado por el aducto DMPO-OH (señal blanco) (Figura 38) (Pérez et al., 2013 a; Robledo-O’Ryan et al., 2009).

3.6.1. EPR no catalítico

Los resultados obtenidos, expresados como porcentaje de apagamiento, para las cumarinas estudiadas se exponen en la Tabla 17 y Figura 37.

Tabla 17. Porcentajes de apagamiento para el radical hidroxilo en EPR no catalítico

CUMARINAS	PORCENTAJE APAGAMIENTO RADICAL HIDROXILO (%)	DS
CUM 2	79,8	3,3
CUM 5	81,2	3,6
CUM 9	82,2	9,6
CUM 11	73,8	2,6
CUM 12	59,6	1,5
CUM 13	61,5	1,5
CUM 16	29,3	7,5
CUM 17	3,5	5,0
CUM 18	0,0	0,0
CUM 19	0,0	0,0

DS: Desviación estándar

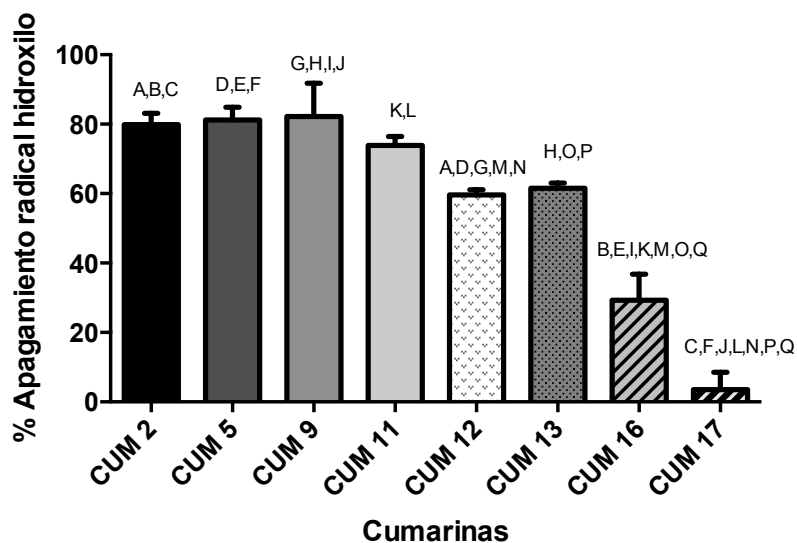


Figura 37. Resultados de EPR no catalítico y análisis estadístico. Letras iguales demuestran diferencias significativas según ANOVA de una vía, seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey

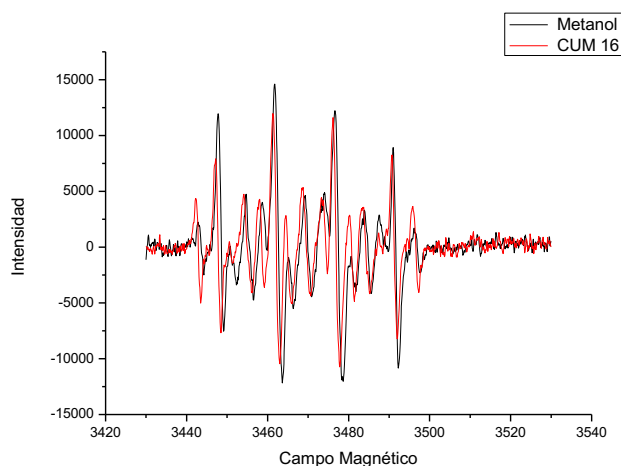
Como resultado del EPR no catalítico se observa que ocho cumarinas pudieron apagar el radical hidroxilo, aunque la cumarina 17 tiene una actividad muy baja (menor a un 5%) (Figura 37). Los mejores efectos los observamos en las amidocumarinas, mientras que de las bromotiofeno cumarinas solo tuvo un efecto considerable la cumarina 16, por lo que podemos inferir que el sustituyente bromotiofeno de la posición 3 que caracteriza a este grupo, puede estar interfiriendo con la actividad antioxidante para el radical hidroxilo. Las cumarinas más activas son las CUM 2, CUM 5, CUM 9 y CUM 11, sin diferencias significativas entre ellas. A diferencia de los resultados obtenidos en ORAC-FL, la introducción de un metoxifenil (CUM 5) como sustituyente, no disminuyó la actividad con respecto a la CUM 2. Así mismo, la presencia de un clorofenil como sustituyente (CUM 11), no disminuyó la actividad en comparación a las otras amidocumarinas de estructura similar.

El orden descendente en actividad para las cumarinas es:

CUM 9 > CUM 5 > CUM 2 > CUM 11 > CUM 13 > CUM 12 > CUM 16 > CUM 17

En la Figura 38 se puede apreciar como el patrón hiperfino disminuye en presencia de una cumarina con respecto al blanco utilizado (metanol). En donde la cumarina 9 posee una actividad apagadora del radical hidroxilo mucho mayor que la cumarina 16.

A.



B.

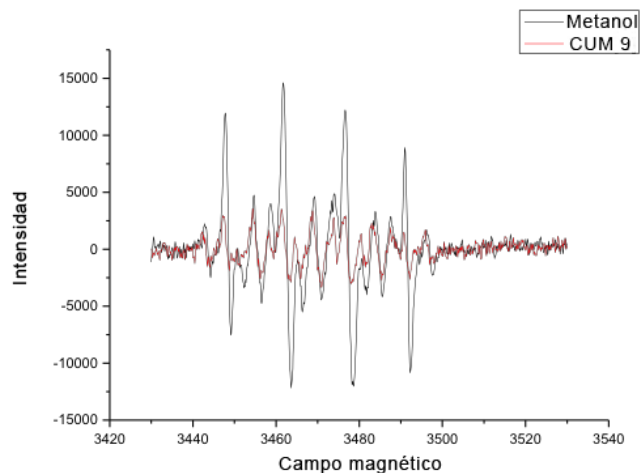


Figura 38. Espectro de resonancia de espín electrónica obtenido en EPR no catalítico. A: cumarina 16; B: cumarina 9. Al añadir las cumarinas como muestras antioxidantes, claramente se observa una disminución del patrón hiperfino producido por la unión del spin tramp DMPO y el radical hidroxilo (patrón rojo) con respecto al patrón producido por el vehículo utilizado, metanol (patrón negro).

3.6.2.EPR fotolítico

Los resultados obtenidos, expresados como porcentaje de apagamiento del radical hidroxilo, para las cumarinas estudiadas se exponen en la Tabla 18 y Figura 39.

Tabla 18. Porcentajes de apagamiento para el radical hidroxilo en EPR fotolítico

CUMARINAS	PORCENTAJE APAGAMIENTO RADICAL HIDROXILO (%)	DS
CUM 2	83,4	0,5
CUM 5	77,4	13,8
CUM 9	72,9	15,9
CUM 11	19,6	13,9
CUM 12	9,3	8,7
CUM 13	39,2	7,0
CUM 16	56,9	15,6
CUM 17	35,7	5,4
CUM 18	24,6	18,6
CUM 19	38,9	0,5

DS: Desviación estándar

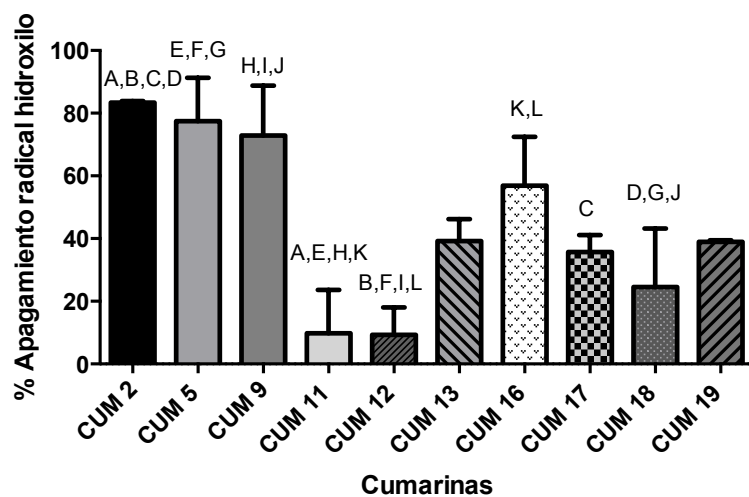


Figura 39. Resultados de EPR fotolítico y análisis estadístico. Letras iguales demuestran diferencias significativas según ANOVA de una vía, seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey.

Como resultado del EPR fotolítico se observa que las diez cumarinas pudieron apagar el radical hidroxilo, aunque las cumarinas 11 y 12 tienen una actividad bastante baja (Figura 39). Nuevamente las cumarinas más activas son las CUM 2, CUM 5 y CUM 9, sin embargo se observa una disminución en la actividad en comparación al EPR no catalítico para las cumarinas 11, 12 y 13. Al contrario, para las cumarinas 16 y 17 aumenta la actividad, apareciendo también efecto en las cumarinas 18 y 19. El aumento de la actividad antioxidante en las CUM 16 y 18 se podría explicar por el cambio de pH en el medio, ya que en el EPR fotolítico se trabaja a pH neutro, pero en el EPR no catalítico se trabaja en medio básico (NaOH), y éste puede afectar la disponibilidad de los hidrógenos en los hidroxilos, dado que pueden tender en mayor proporción hacia la desprotonación y así formar fenolatos, perjudicando la actividad antioxidante vía HAT.

El orden descendente en actividad para las cumarinas es:

CUM 2 > CUM 5 > CUM 9 > CUM 16 > CUM 13 > CUM 19 > CUM 17 > CUM 18 > CUM 11 > CUM 12

3.7. Actividad antioxidante celular (AAC)

Los ensayos celulares a diferencia de las distintas metodologías *in vitro*, incluyen condiciones reales como el metabolismo celular y la capacidad de las muestras para atravesar membranas. En este ensayo se utilizó como sensor redox la 2'-7-dihidro-dicloro-fluoresceína (DCFH₂), la cual es oxidada por los radicales peroxilos (provenientes de la descomposición térmica del AAPH) a diclorofluoresceína (DCF), molécula fluorescente (Figura 40). Así, este método determina la habilidad de las cumarinas para prevenir la oxidación intracelular de DCFH₂ (hacia DCF) al cuantificar la fluorescencia emitida, de esta forma un compuesto antioxidante al prevenir la oxidación del sensor, reduce los niveles de fluorescencia. El efecto antioxidante puede ser consecuencia de distintas acciones, directamente reaccionando con los radicales libres o indirectamente induciendo una respuesta celular antioxidante (por ejemplo aumentando la expresión de enzimas antioxidantes como catalasa o SOD, o bien, disminuyendo la expresión de enzimas pro-oxidantes como xantina oxidasa o mieloperoxidasa), que en suma reduce el estatus oxidante celular.

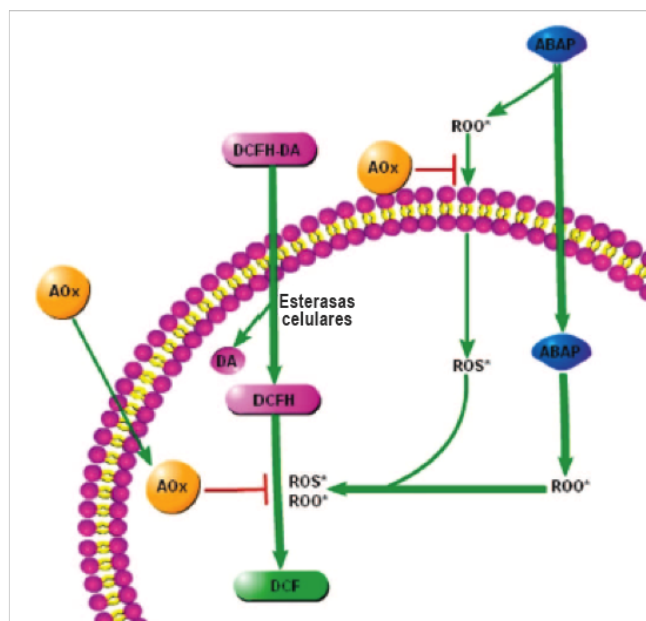


Figura 40. Fundamento del ensayo AAC. (López-Alarcón & Denicola, 2013). Los antioxidantes impiden la oxidación del sensor y por lo tanto, la emisión de fluorescencia (Wolfe & Liu, 2007). AOx: antioxidante, DCFH-DA: dicloro-dihidro-fluoroscéina diacetato, ABAP: AAPH, DCFH: dicloro-dihidro-fluoroscéina, DCF: diclorofluoroscéina.

Si las muestras reducen la fluorescencia liberada por el sensor, con respecto al control positivo (células con estrés oxidativo inducido por AAPH), y por lo tanto presentan actividad antioxidante, nos entrega un indicio de la capacidad que poseen las cumarinas para atravesar membranas biológicas, ya que de acuerdo a la metodología empleada y el fundamento del ensayo, el sensor fluorescente se genera a nivel intracelular mediante la oxidación producida por las EROs disponibles al interior de la célula.

En las Tablas 19 y 20 se detallan los resultados de AAC obtenidos por las cumarinas a concentraciones de 1 y 10 μM respectivamente. Estas concentraciones fueron utilizadas, ya que anteriormente otras cumarinas pertenecientes a la misma biblioteca de compuestos, habían sido evaluadas utilizando la misma metodología y lograron resultados favorables a dichas concentraciones (Figuroa Guíñez Roberto, 2014).

Tabla 19. AAC de las cumarinas a 1 μ M

CUMARINA	% AAC	DS
CUM 2	19,3	13,1
CUM 5	11,8	2,5
CUM 9	17,4	6,9
CUM 11	23,4	2,7
CUM 12	30,8	6,6
CUM 13	35,5	5,8
CUM 16	27,7	3,9
CUM 17	33,0	3,8
CUM 18	32,4	5,8
CUM 19	32,6	2,1

% AAC: porcentaje de actividad antioxidante célula, DS: desviación estándar.

Tabla 20. AAC de las cumarinas a 10 μ M

CUMARINA	% AAC	DS
CUM 2	12,3	11,5
CUM 5	9,6	2,5
CUM 9	9,6	7,2
CUM 11	16,4	9,1
CUM 12	26,1	7,8
CUM 13	28,0	7,1
CUM 16	27,2	0,4
CUM 17	30,1	9,3
CUM 18	30,0	7,4
CUM 19	38,9	2,4

% AAC: porcentaje de actividad antioxidante célula, DS: desviación estándar.

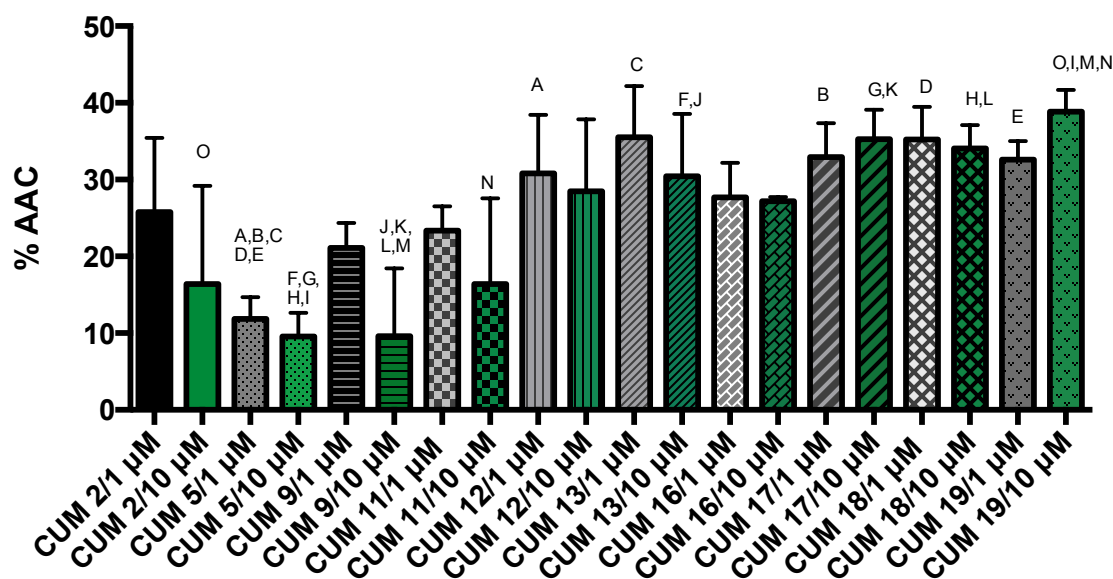


Figura 41. Porcentajes de actividad antioxidante celular y análisis estadístico. % AAC: porcentaje de actividad antioxidante celular. Letras iguales demuestran diferencias significativas según test de ANOVA, seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey. En tonos grises se muestran las cumarinas a 1 µM y en verde a 10 µM.

Como se puede apreciar en la Figura 41, no existen diferencias significativas entre las dos concentraciones evaluadas (1 y 10 µM) por cada cumarina; a la concentración menor evaluada, CUM 13 fue la cumarina con mayor AAC (35,5 %), mientras que a la concentración mayor CUM 19 fue la cumarina con mayor AAC (38,9 %).

De modo general, se observa a diferencia de los ensayos antioxidantes *in vitro* realizados, que las cumarinas 2, 5 y 9 (amidocumarinas) son las que presentan menor actividad antioxidante celular, incluso diferenciándose de forma significativa de las cumarinas 17, 18 y 19 (bromotiofeno cumarinas), las cuales exhibieron los mejores resultados del ensayo. Es importante destacar que de las amidocumarinas, CUM 12 y CUM 13 fueron las que presentaron un mayor efecto antioxidante celular, de forma comparable a las bromotiofeno cumarinas (sin diferencias significativas entre ellas). La disminución de la actividad de las amidocumarinas 2, 5 y 9, con respecto a los ensayos *in vitro*, puede deberse por ejemplo, a modificaciones en sus estructuras químicas producto del metabolismo celular, reduciéndose su capacidad antioxidante o también, se puede deber a una menor capacidad para atravesar las membranas celulares por

parte de estas amidocumarinas. El mayor efecto antioxidante celular de las bromotiofeno cumarinas, se podría deber a no solo un efecto antioxidante directo con los radicales libres, sino también a un efecto antioxidante indirecto, por ejemplo a consecuencia del aumento en la actividad y/o expresión de enzimas antioxidantes.

CUM 1 junto con otras cumarinas (aminocumarinas, amidocumarinas y fenil cumarinas) sintetizadas por el mismo grupo de colaboradores a cargo del profesor Eugenio Uriarte (Santiago de Compostela, España), obtuvieron resultados similares, donde a la concentración de 1 μM se obtuvo como máximo un 26,0% de AAC obtenido por una fenil cumarina y a la concentración de 10 μM un valor máximo de 37,7% de AAC obtenido por CUM 1. En este estudio se determinó también la AAC de trolox, obteniendo un resultado de 25,5% a 10 μM , inferior a las cumarinas 12, 13, 16, 17, 18 y 19 (Figueroa Guíñez Roberto, 2014).

Estos resultados no solo son importantes por la actividad antioxidante celular *per se*, sino que también nos entregan la información de la ausencia de efectos tóxicos o viabilidad celular adecuada a las concentraciones utilizadas y también que las muestras son capaces de atravesar membranas celulares, pudiendo alcanzar blancos farmacológicos al interior de las células.

4. CONCLUSIONES

En relación a los estudios enzimáticos realizados para las cumarinas seleccionadas, aquellas que pertenecen a la familia 3 (bromotiofeno cumarinas) fueron las que presentaron mayor potencia inhibitoria de la actividad de GP_a, α -glucosidasa y PTP-1B.

Las cumarinas 16 y 17 inhibieron la actividad de las tres enzimas estudiadas, mientras que las cumarinas 11, 16, 17, 18 y 19 fueron capaces de inhibir con gran potencia la actividad tanto de la α -glucosidasa como de la PTP-1B.

En relación a la primera hipótesis, la presencia y posición de sustituyentes tipo amida e hidroxilos no demostraron ser influyentes en la capacidad inhibitoria de las amidocumarinas sobre la actividad de las enzimas. Sin embargo, el sustituyente hidroxilo en el carbono número 6 de las bromotiofeno cumarinas si contribuyó a alcanzar una mayor potencia inhibitoria en las tres enzimas bajo estudio.

Se acepta la segunda hipótesis ya que la presencia de sustituyentes aromáticos y halógenos aumentaron la potencia inhibitoria de las cumarinas en la actividad de las tres enzimas, destacándose el sustituyente bromotiofeno presente en la familia 3 de compuestos y el sustituyente clorofenil presente en la cumarina 11 de la familia 2.

Las cumarinas que lograron inhibir a α -glucosidasa, se unen al sitio catalítico de la enzima, pero en una zona superficial, por lo que no interfieren con la unión del sustrato, actuando como inhibidores mixtos o incompetivos principalmente.

Las interacciones más comunes entre las cumarinas inhibitorias de la actividad de la α -glucosidasa son de carácter hidrofóbicas, del tipo aromáticas *edge to face* entre el grupo aromático de Phe157 o Phe177 y el núcleo base o sustituyente aromático de las cumarinas, siendo residuos de gran importancia para la unión e inhibición de la enzima.

No se determinó el sitio de unión de las cumarinas en GP_a y PTP-1B, sin embargo es probable que se unan al sitio alostérico de cada enzima.

Se destaca que frente a la GP_a y a la PTP-1B, se desarrollan varias interacciones aromáticas e hidrofóbicas formadas gracias al núcleo base de las cumarinas y/o los sustituyentes aromáticos

que poseen, mientras que las interacciones polares y puentes de hidrógenos contribuyen a la actividad inhibitoria.

Ocho de las cumarinas (CUM 2, CUM 5, CUM 9, CUM 11, CUM 12, CUM 13, CUM 16, CUM 18) seleccionadas manifestaron capacidad antioxidante moderada, determinada por ORAC-FL, destacándose principalmente las amidocumarinas CUM 2, CUM 5 y CUM 9, sin embargo, los resultados obtenidos demuestran una actividad inferior si los comparamos con otras moléculas antioxidantes como la quercetina o catequina, probablemente por el menor número de hidroxilos presentes.

Siete de las cumarinas seleccionadas (CUM 2, CUM 5, CUM 9, CUM 11, CUM 12, CUM 13, CUM 16, CUM 17) manifestaron buena capacidad para apagar al radical hidroxilo, determinada por EPR no catalítico. En cambio, todas las cumarinas mostraron actividad antioxidante frente el radical hidroxilo, mediante EPR fotolítico, destacándose principalmente las amidocumarinas CUM 2, CUM 5 y CUM 9, que se consideran antioxidantes con buena reactividad (acción rápida).

Se confirma la tercera hipótesis, debido a que todas las cumarinas mostraron actividad antioxidante *in vitro* frente a uno o ambos radicales estudiados. Además, todas exhibieron actividad antioxidante celular, destacándose principalmente la familia 3 constituida por bromotiofeno cumarinas.

5. PROYECCIONES

Los resultados obtenidos tienen muchas proyecciones en la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos para la diabetes mellitus tipo dos, ya que las cumarinas 11, 16, 17, 18 y 19, inhibieron con gran potencia y en forma concomitante la actividad tanto de la α -glucosidasa como de la PTP-1B y teniendo en cuenta además que las cumarinas 16 y 17 inhibieron también la actividad de la GP_a. Si dichos resultados se replican *in vivo*, se disminuiría tanto la absorción de glucosa a nivel intestinal, como la glicogenólisis hepática y también la resistencia a la insulina observada en pacientes con hiperglicemia, apuntando a diferentes mecanismos de acción de forma simultánea que se podría traducir en un mejor control glicémico. Además, todas las cumarinas estudiadas presentaron actividad antioxidante, lo que ayudaría a prevenir y/o atenuar las complicaciones fisiopatológicas que se observan en los pacientes con diabetes.

De todas las cumarinas estudiadas, CUM 16 es la mejor candidata para continuar con su estudio debido a que posee una excelente potencia inhibitoria frente a las tres enzimas estudiadas, destacándose de forma significativa entre la serie de compuestos estudiados. Por lo que sería interesante continuar con estudios preclínicos para confirmar tanto su eficacia como su seguridad.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcón E., Campos A., Edwards A., Lissi E., López C. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. Food Chemistry 107: 1114–1119, 2008.

Azam S., Uddin R., Wadood A. Structure and dynamics of alpha-glucosidase through molecular dynamics simulation studies. Journal of Molecular Liquids 174: 58–62, 2012.

Barata Vallejo, Sebastián. Identificación de cumarinas en especies autóctonas del género pterocaulon ell. Carrera de Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano, 2010.

Benfeito S., Oliveira C., Soares P., Fernandes C., Silva T., Teixeira J., Borges F. Antioxidant therapy: Still in search of the ‘magic bullet’. Mitochondrion 13: 427–435, 2013.

Bharatham K., Bharatham N., Park K., Lee K. Binding mode analyses and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of a-glucosidase inhibitors. Journal of Molecular Graphics and Modelling 26: 1202–1212, 2008.

Bisby R., Brooke R., Navaratnam S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. Food Chemistry 108: 1002–1007, 2008.

Bucolo C., Ward K., Mazzon E., Cuzzocrea S., Drago F. Protective Effects of a Coumarin Derivative in Diabetic Rats. Investigative Ophthalmology & Visual Science 50, N°8, 2009.

Castellano J., Guinda A., Delgado T., Rada M., Cayuela J. Biochemical Basis of the Antidiabetic Activity of Oleanolic Acid and Related Pentacyclic Triterpenes. Diabetes 62, 2013.

Deng Q., Lu Z., Bohn J., Ellsworth K., Myers R., Geissler W., Harris G., Willoughby C., Chapman K., McKeever B., Mosley R. Modeling aided design of potent glycogen phosphorylase inhibitors. Journal of Molecular Graphics and Modelling 23: 457–464, 2005.

Dinparast L., Valizadeh H., Bahadori M., Soltani S., Asghari B., Rashidi M. Design, synthesis, α -glucosidase inhibitory activity, molecular docking and QSAR studies of benzimidazole derivatives. Journal of Molecular Structure 1114: 84-94, 2016.

Dong S., Lei Y., Jia S., Gao L., Li J., Zhu T., Liu S., Hu W. Discovery of core-structurally novel PTP1B inhibitors with specific selectivity containing oxindole-fused spirotetrahydrofurochroman by one-pot reaction. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 27: 1105–1108, 2017.

Ezquer M., Ezquer F., Ricca M., Allers C., Conget P. Intravenous administration of multipotent stromal cells prevents the onset of non-alcoholic steatohepatitis in obese mice with metabolic syndrome. Journal of Hepatology 55: 1112–1120, 2011.

Figueiredo-Gonzalez M., Grosso C., Valentao P., Andrade P. α -glucosidase and α -amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose?. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 118: 322-327, 2015.

Figueroa Guíñez, Roberto. Evaluación de la actividad tripanocida y capacidad antioxidante de nuevos compuestos derivados de chalconas y cumarinas. Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Química. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2014.

Fu Y., Alashib A., Younga J., Therkildsen M., Alukob R. Enzyme inhibition kinetics and molecular interactions of patatinpeptides with angiotensin I-converting enzyme and renin. International Journal of Biological Macromolecules 101: 207-213, 2017.

Girgih A., Nwachukwu I., Hasan F., Fagbemi T., Malomo S., Gill T., Aluko R. Kinetics of in vitro enzyme inhibition and blood pressure-lowering effects of salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. Journal of Functional Foods 20: 43–53, 2016.

Gum R., Gaede L., Koterski S., Heindel M., Clampit J., Zinker B., Trevillyan J., Ulrich R., Jirousek M., Rondinone C. Reduction of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Increases Insulin-Dependent Signaling in ob/ob Mice. Diabetes 52, 2003.

Gupta S., Dutta S., Gajbhiye R., Jaisankar P., Sen A. Synthesis, in vitro evaluation and molecular docking studies of novel amide linked triazolyl glycoconjugates as new inhibitors of α -glucosidase. Bioorganic Chemistry, 2017.

Hoeneisen M., Hernandez V., Becerra J., Silvaa M., Bittnera M., Jakupovic J. 5-Methyl coumarins and a new phenol from *Nassauvia pyramidalis* and *N. digitata*. Phytochemistry 52: 1667-1669, 1999.

Holmes C., Macher N., Grove J., Jang L., Irvine J. Designing better coumarin-based fluorogenic substrates for PTP1B. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18: 3382–3385, 2008.

Jayashree B., Kumar A., Pai A. Synthesis characterization and antidiabetic evaluation of novel coumarin analogues. Pharmacologyonline 3: 1061-1076, 2011.

Jiang C., Liang L., Guo Y. Natural products possessing protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity found in the last decades. Acta Pharmacologica Sinica 33: 1217–1245, 2012.

Kato A., Kobayashi K., Narukawa K., Minoshima Y., Adachi I., Hirono S., Nash R.J. 6,7-Dihydroxy-4-phenylcoumarin as inhibitor of aldose reductase 2. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20: 5630–5633, 2010.

Khairunissa N., Zawawi N., Taha M., Ahmat N., Ismail N., Wadood A., Rahim F., Rehman A. Synthesis, in vitro evaluation and molecular docking studies of biscoumarin thiourea as a new inhibitor of α -glucosidases. Bioorganic Chemistry 63: 36–44, 2015.

Kumar A., Awatar R., Sharma S., Ahmad P., Singh A., Bhatia G., Srivastava A. Pyranocoumarins: A new class of anti-hyperglycemic and anti-dyslipidemic agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 19: 6447–6451, 2009.

Li H., Zheng X., Wang H., Zhang Y., Xin H., Chen X. XLF-III-43, a novel coumarin–aspirin compound, prevents diabetic nephropathy in rats via inhibiting advanced glycation end products. European Journal of Pharmacology 627: 340–347, 2010.

Liu J., Zhang S., Nie F., Yang Y., Tang Y., Yin W., Tian J., Ye F., Xiao Z. Discovery of novel PTP1B inhibitors via pharmacophore-oriented scaffold hopping from Ertiprotafib. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 23: 6217–6222, 2013.

López-Alarcón C., Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. Analytica Chimica Acta 763: 1–10, 2013.

Lordan S., Smyth T., Soler A., Stanton C., Ross P. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. Food Chemistry 141: 2170–2176, 2013.

Ma Y., Tao R., Liu Q., Li J., Tian J., Zhang X., Xiao Z., Ye F. PTP1B inhibitor improves both insulin resistance and lipid abnormalities in vivo and in vitro. Mol Cell Biochem 357: 65–72, 2011.

Martin W., Hoover D., Armento S., Stock I., Mcpherson K., Danley D., Stevenson R., Barretti E., Treadway J. Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1776–1781, 1998.

Matos M., Pérez F., Vazquez S., Uriarte E., Santana L., Borges F., Olea C. Remarkable antioxidant properties of a series of hydroxy-3-arylcoumarins. Bioorganic & Medicinal Chemistry 21: 3900–3906, 2013.

Matos M., Rodríguez-Enríquez F., Borges F., Santana L., Uriarte E., Estrada M., Rodríguez-Franco M., Laguna R., Viña D. 3-Amidocoumarins as Potential Multifunctional Agents against Neurodegenerative Diseases. ChemMedChem 10: 2071–2079, 2015.

Moorthy H., Ramos M., Fernandes P. Structural analysis of α -glucosidase inhibitors by validated QSAR models using topological and hydrophobicity based descriptors. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 109: 101–112, 2011.

Murray R., Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V., Weil P., Harper: Bioquímica Ilustrada, 28ª edición. Editorial The McGraw-Hill Companies, 2009.

Nelson D. & Cox M. Lehninger Principles of Biochemistry, 4ª edición. Editorial Omega: 209-211, 2005.

Nieto-Vazquez I., Fernández-Veledo S., De Alvaro C., Rondinone C., Valverde A., Lorenzo M. Protein–Tyrosine Phosphatase 1B–Deficient Myocytes Show Increased Insulin Sensitivity and Protection Against Tumor Necrosis Factor- α Induced Insulin Resistance. Diabetes 56: 404-413, 2007.

Olivares J. & Arellano A. Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina. Revista de educación bioquímica 27(1): 9-18, 2008.

Pari L. & Rajarajeswari N. Efficacy of coumarin on hepatic key enzymes of glucose metabolism in chemical induced type 2 diabetic rats. Chemico-Biological Interactions 181: 292–296, 2009.

Park H., Bhattarai B., Hamc S., Cho H. Structure-based virtual screening approach to identify novel classes of PTP1B inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry 44: 3280–3284, 2009.

Park S., Hyun S., Yu J. Selective α -glucosidase substrates and inhibitors containing short aromatic peptidyl moieties. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 21: 2441–2444, 2011.

Pérez F., Villamenab F., Zapata G., Dasb A., Headleyb C., Quezadad E., Lopez C., Olea C. Selected hydroxycoumarins as antioxidants in cells: physicochemical and reactive oxygen species scavenging studies. Journal of Physical Organic Chemistry 26: 773–783, 2013 a.

Pérez F., Vázquez S., Joao M., Herrera A., Villamena F., Das A., Gopalakrishnan B., Olea C., Santana L., Uriarte E. Synthesis and Electrochemical and Biological Studies of Novel Coumarin–Chalcone Hybrid Compounds. Journal of Medicinal Chemistry 56: 6136–6145, 2013 b.

Pérez-Cruz F, Serra S, Delogu G, Lapier M, Maya J, Olea-Azar C, Santana L, Uriarte E. Antitrypanosomal and antioxidant properties of 4-hydroxycoumarins derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22: 5569-5573, 2012.

Polyák M., Varga G., Szilágyi B., Juhász L., Docsa T., Gergely P., Begum J., Hayes J., Somsák L. Synthesis, enzyme kinetics and computational evaluation of N-(b-D-glucopyranosyl) oxadiazolecarboxamides as glycogen phosphorylase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry 21: 5738–5747, 2013.

Queiroz D., Ferreira A., Lima A., Lima E., Lima M. Isolation and identification of α -glucosidase, α -amylase and lipase inhibitors from *Hortia longifolia*. International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences 5, 2013.

Rajarajeswari N. & Pari L. Antioxidant Role of Coumarin on Streptozotocin–Nicotinamide-Induced Type 2 Diabetic Rats. Biochem Molecular Toxicology 25 N°6, 2011.

Raju B., Tiwari A., Kumar A., Ali Z., Agawane S., Saidachary G., Madhusudana K. α -Glucosidase inhibitory antihyperglycemic activity of substituted chromenone derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry 18: 358–365, 2010.

Rath V., Ammirati M., Danley D., Ekstrom J., Gibbs M., Hynes T., Mathiowetz A., McPherson K., Olson T., Treadway J., Hoover D. Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. Chemistry & Biology 7 N° 9, 2000.

Robledo-O’Ryan N, Matos M, Vazquez-Rodriguez S, Santana L, Uriarte E, Moncada-Basualto M, Mura F, Lapier M, Maya J, Olea-Azar C. Synthesis, antioxidant and antichagasic properties

of a selected series of hydroxy-3-arylcoumarins. Bioorganic & Medicinal Chemistry 25: 621–632, 2017.

Rubilar M., Jara C., Poo Y., Acevedo F., Gutierrez C., Sineiro J., Shene C. Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.): Sources of Antioxidant Compounds and α -Glucosidase/ α -Amylase Inhibitors. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59: 1630–1637, 2011.

Serrano F., Sánchez J., García L. Caffeine Inhibition of Glycogen Phosphorylase from *Mytilus* goprotinialis Mantle Tissue. Journal of Biochemistry and Cell Biology 27: 911-916, 1995.

Simirgiotis M., Ramirez J., Schmeda G. Kennelly E. Bioactive coumarins and HPLC-PDA-ESI-ToF-MS metabolic profiling of edible queule fruits (*Gomortega keule*), an endangered endemic Chilean species. Food Research International 54: 532–543, 2013.

Tang L., Yu J., Leng Y., Feng Y., Yang Y., Ji R. Synthesis and Insulin-Sensitizing Activity of a Novel Kind of Benzopyran Derivative. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 13: 3437–3440, 2003.

Tang Y., Lu D., Chen Z., Hub C., Yang Y., Tian J., Ye F., Wud L., Zhang Z. Design, synthesis and insulin-sensitising effects of novel PTP1B inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 23: 2313–2318, 2013.

Teixeira J., Silva T., Benfeito S., Gaspar A., Garrido M., Garrido J., Borges F. Exploring nature profits: Development of novel and potent lipophilic antioxidants based on galloylcinnamic hybrids. European Journal of Medicinal Chemistry 62: 289-296, 2013.

Tonks N. PTP1B: From the sidelines to the front lines!. FEBS Letters 546: 140-148, 2003.

Torres R., Faini F., Modak B., Urbina F., Labbe C., Guerrero J. Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. Phytochemistry 67: 984–987, 2006.

Tsitsanou K., Hayes J., Keramioti M., Mamais M., Oikor N., Kato a., Leonidas d., Zographos S. Sourcing the affinity of flavonoids for the glycogen phosphorylase inhibitor site via crystallography, kinetics and QM/MM-PBSA binding studies: Comparison of chrysin and flavopiridol. Food and Chemical Toxicology, 2013.

Tsitsanou K., Skamnaki V., Oikonomakos N. Structural Basis of the Synergistic Inhibition of Glycogen Phosphorylase a by Caffeine and a Potential Antidiabetic Drug. Archives of Biochemistry and Biophysics 384 (2): 245-254, 2000.

Varga G., Docsa T., Gergely P., Juhász L., Somsák L. Synthesis of tartaric acid analogues of FR258900 and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 23: 1789–1792, 2013.

Viña D., Matos M., Yañez M., Santana L., Uriarte E. 3-Substituted coumarins as dual inhibitors of AChE and MAO for the treatment of Alzheimer's disease. Medicinal Chemistry Communications 3: 213-218, 2012.

Wolfe K., Liu R. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. Journal of Agricultural And Food Chemistry 55: 8896–8907, 2007.

Wright S., Rath V., Genereux P., Hageman D., Levy C., McClure L., McCoid S., McPherson K., Schelhorn T., Wilder D., Zavadoski W., Gibbs M., Treadway J. 5-Chloroindoloyl glycine amide inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, in vitro, in vivo, and X-ray crystallographic characterization. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 15: 459–465, 2005.

Yang X., Huang M., Jin Y., Sun L., Song Y., Chen H. Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. Fitoterapia 83: 1169–1175, 2012.

Zhang L., Chen X., Liu J., Zhu Q., Leng Y., Luo X., Jiang H., Liu H. Discovery of novel dual-action antidiabetic agents that inhibit glycogen phosphorylase and activate glucokinase. European Journal of Medicinal Chemistry 58: 624-639, 2012 a.

Zhang S., Yang J., Li H., Li Y., Liu Y., Zhang D., Zhang F., Zhou W., Chen X. Skimmin, a coumarin, suppresses the streptozotocin-induced diabetic nephropathy in wistar rats. European Journal of Pharmacology 692: 78-83, 2012 b.