FOTOSENSIBILIZACIÓN DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

Moléculas pequeñas, aromáticas y planas pueden intercalarse entre bases adyacentes en la hélice del ácido desoxirribonucleico pudiendo o no provocar distorsiones en su estructura. La intercalación no es indispensable para que se produzca el daño fotoinducido, pero moléculas planas pueden ser capaces de participar en procesos de fotosensibilización del ácido desoxirribonucleico [Armitage, 1998]. Las pterinas son biomoléculas aromáticas y planas, que podrían intercalarse en la doble hélice del ácido desoxirribonucleico. Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el efecto de las pterinas como fotosensibilizadores de material genético, así como evaluar el papel del oxígeno singlete en este proceso, pues la información existente era indirecta y escasa desde el punto de vista fotofísico.

En el *Capítulo 4* se expusieron las razones por las cuales se eligió el plásmido pUC18 como molécula blanco para este estudio. Por otro lado, se eligió pterina como sensibilizador por varias razones. Por un lado, este compuesto es mucho menos fotosensible que otros compuestos de la familia [Thomas, 2001] y, por ende, las reacciones de degradación fotoquímica de este compuesto no interferirán en el análisis de los resultados de los procesos de fotosensibilización que se quiere estudiar. Por otro lado, la ausencia de sustituyentes en la molécula de pterina permite evaluar al doble anillo pterínico como sensibilizador, evitando el efecto de los sustituyentes.

Estudios preliminares.

Se realizó un conjunto de experimentos sencillos con el objeto de detectar un posible efecto de fotosensibilización del ácido desoxirribonucleico plasmídico por pterina. Este estudio preliminar consistió en irradiar soluciones de ácido desoxirribonucleico y soluciones de pterina por separado y, finalmente, una mezcla de ambas.

Como se mencionó anteriormente, el ácido desoxirribonucleico no absorbe luz UV-A y, por consiguiente, este tipo de luz no debiera provocar ningún efecto directo sobre el plásmido pUC18. Los experimentos control, realizados en este sentido, revelan que una solución del plásmido (3.8 x 10⁻⁵ M bp) irradiada en forma continua durante 2 horas no presenta cambios espectrales ni electroforéticos respecto de la misma solución no irradiada.

Por otro lado, los experimentos control realizados sobre soluciones de pterina mostraron que este compuesto tampoco sufre alteraciones químicas al ser irradiado en las condiciones experimentales que luego se utilizaron en los estudios de fotosensibilización. En efecto, se analizó una solución de pterina (1 x 10⁴ M, pH = 6.5) irradiada durante 2 horas mediante espectrofotometría y cromatografía (TLC). No se detectaron cambios espectrales ni productos de fotólisis en las corridas cromatográficas que sugieran cambios químicos significativos en la solución de pterina irradiada.

Sin embargo, cuando se irradió una solución acuosa conteniendo ambos compuestos se observaron cambios espectrales significativos en función del tiempo de irradiación. Estos cambios, inducidos por la luz, evidencian una variación en la composición química del sistema y ocurren únicamente cuando están presentes ambas sustancias.

Por último, se realizaron controles tendientes a descartar una reacción térmica entre el ácido desoxirribonucleico y pterina. Para ello, se mezclaron soluciones de

ambos compuestos y se mantuvieron en la oscuridad durante distintos períodos de tiempo. Posteriormente, estas soluciones fueron analizadas por espectrofotometría y electroforesis. Los resultados de estos controles sugieren que no existen reacciones químicas térmicas entre pterina y la macromolécula estudiada.

En la siguiente sección se analizará detalladamente la evolución de los espectros de absorción en experimentos de irradiación continua. Posteriormente, se expondrá el análisis de las soluciones irradiadas empleando técnicas electroforéticas, a partir de las cuales puede obtenerse información de los cambios estructurales sufridos por el ácido desoxirribonucleico.

Análisis espectrofotométrico.

Se realizaron experimentos de irradiación continua para estudiar las variaciones espectrales que se producen como consecuencia del efecto de la pterina excitada sobre el ácido desoxirrib onucleico. En todos estos estudios de fotosensibilización se procedió sistemáticamente de la misma manera. Se prepararon soluciones madres de pterina y ácido desoxirribonucleico. A partir de ellas se prepararon las soluciones control y la mezcla. Cada solución madre diluida a la mitad con agua se utilizó a modo de control. La solución restante es una mezcla en partes iguales de ambas soluciones madres. Cada solución se sometió a irradiación con luz UV-A de 350 nm en idénticas condiciones experimentales (geometría de irradiación, celda, temperatura, pH, etc) durante un período total de aproximadamente dos horas. Se registró el espectro de absorción de las soluciones antes de la irradiación y posteriormente se tomaron los espectros de absorción a distintos períodos de irradiación. Todos los experimentos que se presentarán en esta sección se realizaron en presencia de oxígeno.

Como se mencionó en la sección anterior, las soluciones control demostraron ser fotoquímicamente estables para el tiempo de irradiación y las condiciones experimentales empleadas.

A diferencia de los controles, en iguales condiciones experimentales, se observaron importantes cambios en los espectros de absorción de soluciones conteniendo pterina y plásmido, desde los primeros minutos de irradiación. En la Figura 13.1 se muestran los resultados de un experimento realizado irradiando una solución mezcla ([ADN] = 3.8 x 10⁻⁵ M bp y [pterina] = 1 x 10⁻⁴ M, pH = 6.5).

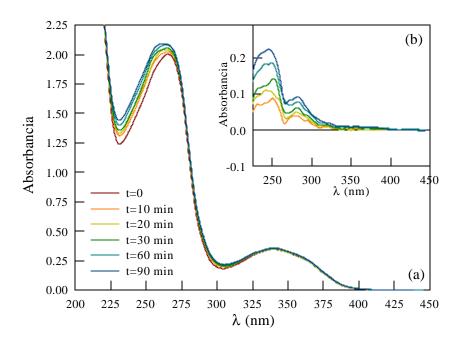


Figura 13.1: (a) Variación del espectro de absorción de una solución de ADN (3.8 x 10^{-5} M bp) y pterina (1 x 10^{-4} M) a pH = 6.5 en el tiempo, al ser irradiada con luz UV de 350 nm. (b) Espectros diferencia.

Como el ácido desoxirribonucleico no absorbe a longitudes superiores a 300 nm, se puede evaluar el comportamiento de la banda de la pterina en la región comprendida entre 300 y 400 nm. Como puede observarse en la Figura 13.1, dicha banda permaneció inalterada durante todo el tiempo de irradiación. Estos resultados sugieren que la pterina no sufre alteraciones químicas significativas como consecuencia de la irradiación. Asumiendo que la pterina resulta inalterada, los cambios espectrales observados (en la región comprendida entre 215 y 300 nm) se pueden atribuir a

modificaciones en las moléculas de ácido desoxirribonucleico. En la Figura 13.2 se muestran los espectros de absorción registrados a distintos tiempos de irradiación a los que se les ha restado el espectro correspondiente a la pterina. De esta manera, en esta figura se muestra la evolución del espectro del plásmido durante el proceso estudiado.

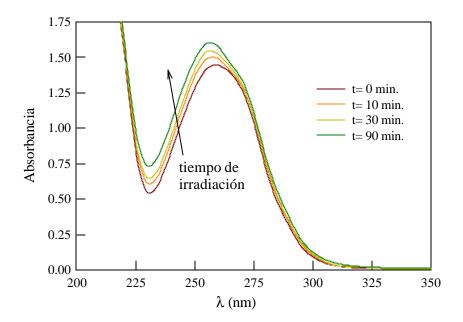


Figura 13.2: Variación del espectro de absorción del ADN en el tiempo, al ser irradiado con luz UV de 350 nm en presencia de pterina

En otra serie de experimentos realizados a concentración de ácido desoxirribonucleico constante (5 x 10⁻⁵ M bp) se analizó la influencia de la concentración de pterina sobre los cambios espectrales observados. En todos los casos se observó, cualitativamente, el mismo tipo de cambio espectral. Es decir, los espectros diferencia normalizados obtenidos en experimentos realizados a distintas concentraciones de pterina son similares. Este hecho sugiere que el proceso observado es siempre el mismo, independientemente de la concentración de pterina.

Sin embargo, la velocidad y la intensidad de los cambio espectrales muestran una fuerte dependencia con la concentración de pterina. En la Figura 13.3 se muestran las variaciones en la absorbancia del ácido desoxirribonucleico en estos experimentos. El análisis cinético de estos resultados revela que el cambio de absorbancia, $(A_t - A_o)$, sigue una ley de primer orden. En la Tabla 13.1 se presentan los resultados de las constantes de velocidad (k) y de $(A_\infty - A_o)$, ajustados con la ecuación (1):

$$(A_t - A_0) = (A_\infty - A_0).[1 - \exp(-k.t)].$$
 (1)

donde A_0 , A_t y A_∞ son las absorbancias a 260 nm antes de iniciar la irradiación , al tiempo t y al tiempo infinito, respectivamente.

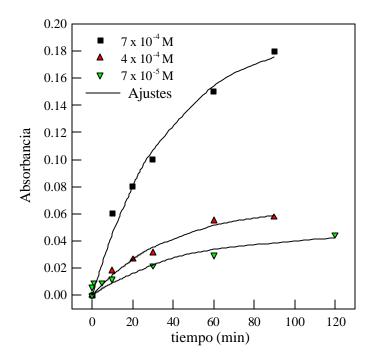


Figura 13.3: Variación de la absorbancia a 260 nm para soluciones ADN (5 x 10⁻⁵ M bp) y distinta concentración de pterina. Las líneas corresponden a ajustes con la ecuación (1).

[Pt]/mM	$(\mathbf{A}_{\mathbf{Y}} - \mathbf{A}_0)$	k/min
7 x 10 ⁻⁴ M	0.04	0.0225
4 x 10 ⁻⁴ M	0.06	0.0259
7 x 10 ⁻⁵ M	0.18	0.0269

Tabla 13.1: Parámetros obtenidos realizando ajustes no lineales de los datos mostrados en la Figura13.3 con la ecuación (1).

Análisis electroforético.

Se realizaron experimentos de irradiación continua similares a los descriptos en la sección anterior, pero en este caso las soluciones irradiadas con luz UV-A en presencia de oxígeno se analizaron mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa descripta en el *Capítulo* 8.

En corridas electroforéticas realizadas con soluciones acuosas no irradiadas del plásmido pUC18 se observan tres formas principales del plásmido, que corresponden a una forma superenrollada (que presenta mayor movilidad), a una forma relajada o con un grado menor de superenrollamiento (de movilidad intermedia) y una forma dimérica (de menor movilidad). Esto puede observarse en la primera calle de la corrida electroforética mostrada en la Figura 13.4 (tiempo cero de irradiación). La intensidad relativa de las bandas da una idea de la proporción de cada topoisómero presente en las soluciones analizadas.

El análisis electroforético de soluciones de plásmido (3.8 x 10⁻⁵ M bp) irradiado con luz UV-A en presencia de pterina (1 x 10⁻⁵ M) revela importantes cambios sobres las cantidades relativas de las tres bandas. La figura 13.4 muestra una corrida

electroforética en la cual fueron sembradas alícuotas tomadas a distintos tiempos de irradiación. Puede apreciarse que disminuye la intensidad de la banda de mayor movilidad electroforética, a la vez que aumenta la intensidad de la forma relajada del plásmido.

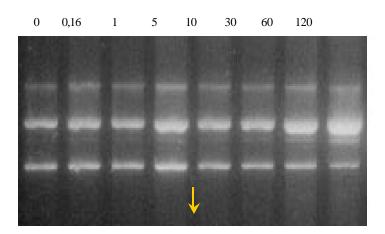


Figura 13.4: Electroforesis de soluciones de ácido desoxirribonucleico irradiadas en presencia de pterina. Los números sobre cada calle representan el tiempo de irradiación en minutos.

A partir de las variaciones en la intensidad de fluorescencia generada por cada fracción se realizó un análisis de los cambios que experimenta la concentración de cada topoisómero del plásmido como función del tiempo de irradiación. Para realizar este análisis se integraron las intensidades de cada banda presente en el gel mediante un programa de computación adecuado. A causa de la menor intercalación del bromuro de etidio en la forma superenrollada, más compacta, debe realizarse una corrección a la intensidad correspondiente a la banda de dicho topoisómero. Para ello se divide a la intensidad en esa banda por 0.8 [Bauer W, 1968]. Luego, para los distintos tiempos de irradiación, se calculó la fracción de intensidad de cada topoisómero sobre la intensidad total correspondiente a cada una de las calles. En la Figura 13.5 puede observarse la

variación de la intensidad relativa de las bandas correspondientes al plásmido relajado y superenrollado.

Las gráficas de la Figura 13.5 muestran claramente que la iluminación del plásmido con luz UV-A en presencia de pterina conduce a la conversión de la forma superenrollada en la forma relajada. Además esta conversión ocurre en un período de tiempo que coincide con el período correspondiente a los cambios espectrales mostrados en la sección anterior.

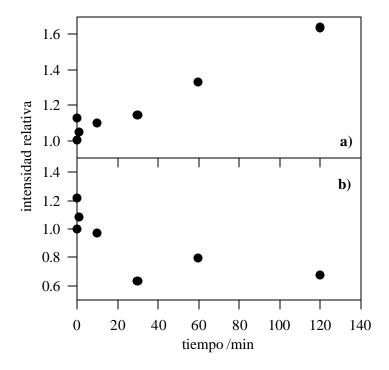


Figura 13.5: Evolución de la intensidad de fluorescencia de las bandas presentes en la corrida electroforética mostrada en la figura 13.4, con el tiempo de irradiación. Se asignó el valor 1 a la fracción de la intensidad a t=0. a) forma relajada. b) forma superenrollada.

Para que ocurra la transformación mencionada es necesario que una de las cadenas de la molécula de plásmido circular superenrollada se corte. Una vez

producida dicha ruptura, la conversión a la forma relajada ocurre espontáneamente. Por consiguiente, estos resultados sugieren que el proceso de fotosensibilización estudiado conduce a la ruptura de un enlace covalente en las cadenas de ácido desoxirribonucleico.

Además, en los tiempos más largos de irradiación, se puede observar la aparición de una nueva banda, la cual tiene una movilidad intermedia entre la forma relajada y la superenrollada. La aparición de esta nueva forma de plásmido, indica claramente que el ácido desoxirribonucleico está experimentando alteraciones importantes en su estructura. Sin embargo, por hallarse con una movilidad intermedia entre las bandas originales, no debería presentar modificaciones significativas en su peso molecular.

Si una molécula de ácido desoxirribonucleico circular sufre un corte en una de sus hebras y otro corte en la otra y las posiciones de estos cortes son lo suficientemente cercanas entre sí, la molécula puede cortarse transformándose en una molécula de plásmido lineal. Para comprobar si la nueva banda que aparece en las soluciones irradiadas corresponde a ácido desoxirribonucleico lineal se preparó un patrón del plásmido "linealizado" por medio de una enzima de restricción.

Las enzimas de restricción son un grupo de enzimas que poseen la capacidad de producir cortes en moléculas de ácido desoxirribonucleico en regiones específicas. Estas enzimas reconocen una secuencia específica sobre el ácido desoxirribonucleico de doble hélice, y lo escinden en ese lugar. Una molécula de ácido desoxirribonucleico circular se convierte en una molécula lineal de igual peso molecular, si se la somete a la acción de una enzima de restricción que reconoce una secuencia de bases que se encuentra presente una sola vez sobre dicha molécula. Cumple con esta condición para el plásmido pUC18 la enzima RI de la bacteria *Escherichia coli (Eco*RI). Cuando el plásmido pUC18 es incubado en presencia de dicha enzima en un buffer adecuado a 37 °C, se corta sobre la siguiente secuencia de bases:



(las flechas indican los punto de corte).

En la Figura 13.6 se muestran los resultados de experimentos que sugieren fuertemente la "linealización" del ácido desoxirribonucleico plasmídico como consecuencia de la irradiación en presencia de pterina. La calle 1 corresponde a una solución de plásmido (3.8 x 10⁻⁵ M bp) y pterina (1 x 10⁻⁵ M) irradiada durante 140 minutos, mientras que la calle 4 corresponde al patrón de ácido desoxirribonucleico lineal. Puede observarse claramente que la banda del patrón presenta la misma movilidad que la banda que aparece al irradiar. Las calles 2 y 3 corresponden a controles, el primero, plásmido no irradiado sin mezclar con pterina y, el segundo, una solución no irradiada de ácido desoxirribonucleico y pterina, ambos en igual concentración que la calle 1.

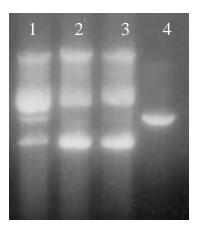


Figura 13.6: Análisis electroforético del experimento que muestra la presencia de ADN lineal en soluciones irradiadas de plásmido en presencia de pterina. El detalle de cada calle se encuentra en el texto.

Los resultados presentados en esta sección, muestran que el proceso de fotosensibilización estudiado conduce, en una primera etapa, a cortes de una cadena que, a su vez, llevan a la relajación del plásmido. En una segunda etapa se producen cortes en la doble hélice generando la "linealización" del plásmido. Una hipótesis que se puede plantear para explicar el proceso total consiste en suponer que la macromolécula sufre cortes en cada hebra acumulativos y al azar. Es decir, cada molécula plasmídica se relaja luego de sufrir el primer corte y sigue acumulando cortes distribuidos al azar al aumentar el tiempo de irradiación. Como se explicó anteriormente, si dos de estos cortes se producen en diferentes cadenas y están lo suficientemente cercanos entre sí, la molécula de plásmido se transforma en una molécula lineal. Experimentalmente esto sólo podrá observarse cuando se acumulen suficientes cortes que hagan apreciable la probabilidad de que se produzca la "linealización".

Papel del oxíge no en el mecanismo de reacción.

Se realizaron estudios similares a los llevados a cabo en soluciones aireadas tendientes a evaluar el rol del oxígeno molecular y algunos de sus derivados (oxígeno singlete, radical hidroxilo) en el mecanismo involucrado en el daño fotoinducido observado sobre el ácido desoxirribonucleico.

Para determinar el papel de las especies reactivas del oxígeno, oxígeno singlete y radical hidroxilo, se utilizaron secuestradores o *quenchers* selectivos para cada una de ellas. Para evaluar el papel del radical hidroxilo, se realizaron experimentos en presencia de sustancias que lo capturan, como ser manitol, etanol, formato de sodio u otros. En este caso, se empleó etanol en concentración 1.7 mM [Chemg *et al.*, 1993; Lesko *et al.*, 1980]. Por otro lado, para evaluar el rol del oxígeno singlete se realizaron experimentos en presencia de histidina. En particular, se utilizó L-monohidroclorohistidina en concentración 1.2 mM [Nilsson *et al.*, 1972].

Ambos ensayos se evaluaron de la misma forma que para las soluciones aireadas: por seguimiento de los espectros de absorción y electroforesis en geles de agarosa. Los cambios fueron similares a los observados en ausencia de histidina y etanol, es decir, se observó la transformación de la forma superenrollada en la forma relajada y la aparición de la forma lineal. Además, estos cambios se produjeron en tiempos similares a los observados anteriormente. Estos resultados proveen evidencia de que el daño fotoinducido por pterina al ácido desoxirribonucleico no es consecuencia de la participación del oxígeno singlete ni del radical hidroxilo.

Por otro lado, se realizaron experimentos en presencia de diferentes concentraciones de oxígeno. Se preparó una solución conteniendo plásmido (3.8 x 10⁻⁵ M bp) y pterina (1 x 10⁵ M) a pH 6.5. Esta solución se dividió en tres alícuotas: en una primera alícuota se eliminó el oxígeno burbujeando nitrógeno (libre de oxígeno y helio) durante 15 minutos, otra se saturó con oxígeno y, la tercera se empleó directamente. En los tres casos se irradió durante 120 minutos con luz de 350 nm en las mismas condiciones experimentales. Los cambios observados, tanto en los espectros de absorción como en las corridas electroforéticas (Figura 13.7), fueron equivalentes en las tres concentraciones de oxígeno.

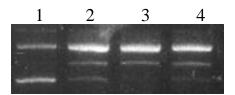


Figura 13.7: Solución de ADN (3.8 x 10^5 M bp) y pterina (1 x 10^{-5} M) sin irradiar (1) e irradiadas en ausencia de O_2 (2), con aire (3) y atmósfera saturada con O_2 (4).

Estos resultados confirman que el oxígeno molecular, o especies reactivas derivadas de él, no tiene un rol principal en el daño fotoinducido del ácido

desoxirribonucleico, que ocurre al irradiar soluciones del mismo con luz UV-A en presencia de pterina.

Si bien para plantear una hipótesis sobre los mecanismos involucrados en el proceso de fotosensibilización estudiado es necesario llevar a cabo más experimentos, pueden realizarse algunas consideraciones sobre este punto. Tal como se explicó en el *Capítulo 3* el oxígeno singlete daña al ácido desoxirribonucleico a través de su reacción con la guanina y, de acuerdo a los resultados presentados en los *Capítulos 11* y 12, la pterina genera oxígeno singlete e induce a la fotooxidación sensibilizada de la 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. Debido a esto, es lógico pensar que debería existir fotosensibilización de ácido desoxirribonucleico por pterinas a través de un mecanismo mediado por oxígeno singlete. Sin embargo, de los experimentos planteados en esta Sección, puede inferirse que el oxígeno singlete no es la única especie reactiva implicada, e, incluso que el mismo no es el responsable principal de los cambios observados sobre moléculas de plásmido al ser irradiado por luz UV-A en presencia de pterina.

Es importante resaltar que el daño fotoinducido por la pterina al ácido desoxirribonucleico tiene relevancia biológica. La presencia de derivados pterínicos en los sistemas biológicos hace que este proceso fotosensibilizado pueda ocurrir en organismos vivos en zonas expuestas a la luz solar. Por otro lado, las pterinas podrían tener aplicación en técnicas biomédicas que usan la destrucción fotoinducida del ácido desoxirribonucleico con diversos fines, tales como la fototerapia de procesos neoplásicos y la esterilización de fluidos biológicos.