Capítulo 2

ASPECTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LAS PTERINAS

Las pterinas son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos ampliamente distribuida en la naturaleza, y con variadas funciones [Hopkins, 1993, Nichol *et al*., 1995]. Los primeros trabajos científicos sobre pterinas son de fines del siglo XIX, y en ellos se publican intentos por aislar pigmentos pterínicos amarillos y blancos de las alas de ciertas mariposas [Hopkins, 1895; Hopkins, 1889a; Hopkins 1889b]. Sin embargo, F. G. Hopkins no pudo aislarlos con suficiente pureza como para caracterizar su estructura. Recién a mediados del siglo XX se propuso que eran derivados del heterociclo pirazina[2,3-d]pirimidina al que se llamó pteridina (Figura 2.1) [Schöpf *et al.*, 1941].

Estructura química de las pterinas.

Las pterinas son compuestos heterocíclicos, con una estructura común a todas de doble anillo con 10 átomos, 4 de nitrógeno y el resto carbonos. Este tetra-azo-naftaleno, llamado pteridina, puede observarse en la siguiente figura:

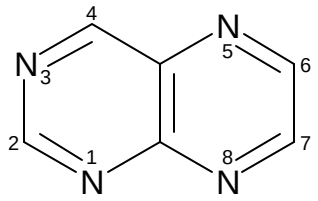


Figura 2.1: Pteridina: estructura básica de las pterinas y lumazinas.

De la pteridina derivan dos grupos de moléculas que se encuentran en los seres vivos: las pterinas y las lumazinas. Las pterinas poseen como sustituyentes un grupo amino en la posición 2 y un oxígeno en la posición cuatro. La molécula resultante es la 2-amino-4-pteridinona o pterina. La lumazinas, por su parte, derivan de una molécula de pteridina con un oxígeno en la posición 2 y otro en la posición 4 (2,4-pteridindiona) (Figura 2.2).

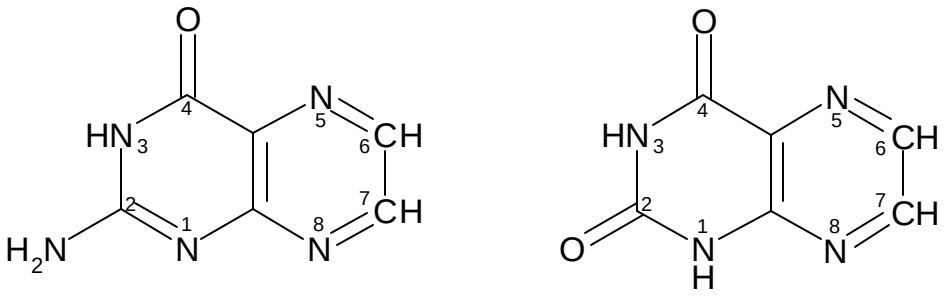
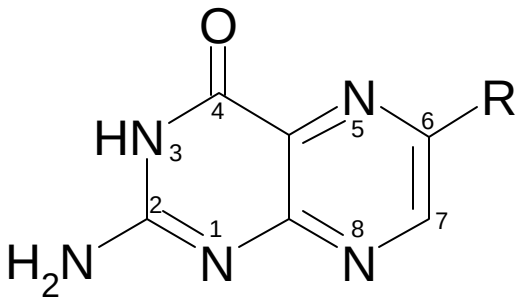


Figura 2.2: Estructura química de pterinas y lumazinas

Todas las pterinas comparten la misma estructura, llamada habitualmente doble anillo pterínico, y difieren entre sí por los sustituyentes ligados a esta estructura común. La mayor parte de las pterinas naturales poseen sustituyentes en la posición 6 (Figura 2.3). La 6-carboxipterina, por ejemplo, tiene como sustituyente un grupo carboxilo (-COOH), la 6-formilpterina tiene un grupo formilo (-CHO), la xantopterina un grupo hidroxilo (-OH), la biopterina y la neopterina poseen cortas cadenas con alcoholes, (-CHOH-CHOH-CH_3 y -CHOH-CHOH-CH_2OH, respectivamente). El ácido fólico tiene un sustituyente mucho más complejo que la mayoría de las pterinas naturales formado por una molécula de ácido *p*-aminobenzoico y otra de ácido glutámico (un aminoácido natural). El sustituyente se muestra en la Figura 2.4.



R	Compuesto
-H	pterina
-CHO	6-formilpterina
-COOH	6-carboxipterina
-CHOH-CHOH-CH_3	biopterina
-CHOH-CHOH-CH_2OH	neopterina
-OH	xantopterina
(*) Figura 2.4	ácido fólico

Figura 2.3: Estructura química de pterinas naturales (pterinas 6-sustituidas).

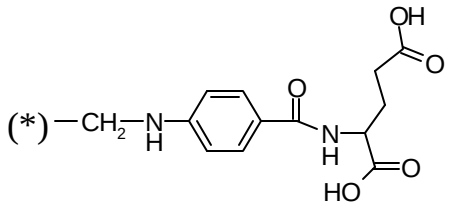


Figura 2.4: Estructura molecular del sustituyente de la molécula de ácido fólico.

Propiedades ácido-base de las pterinas.

Las pterinas se comportan como ácidos débiles en las soluciones acuosas. Como publicó Albert para varios derivados de pterina, el único equilibrio pertinente en las condiciones de pH de este trabajo (4 - 12) es aquél entre el grupo amida y el fenolato (Figura 2.5) [Albert, 1953]. Por ello, en adelante, se hará referencia a estas dos formas ácido-base denominándolas “forma ácida” y “forma alcalina”, respectivamente. El pKa de este equilibrio está alrededor de 8 para todas las pterinas estudiadas (Tabla 2.1) [Thomas *et al.*, 2000; Albert, 1953; Thomas

et al., 1996; Cabrerizo, 2002].

Otros grupos funcionales de la estructura pterínica (por ejemplo: el grupo 2-amino) o los nitrógenos anulares tienen un pKa menor a 2 [Albert, 1953]. Otros equilibrios ácido-base son particulares de cada pterina, dependiendo de la presencia de grupos ionizables en el sustituyente del carbono 6. Por ejemplo, la 6-carboxipterina posee un equilibrio adicional, con un pKa de aproximadamente 3 [Monópoli *et al*, 2000] debido al grupo carboxilo. Tanto el comportamiento fotoquímico como fotofísico de las diferentes formas ácido-base de cada compuesto presentan diferencias significativas [Baur *et al.*, 1979; Pfleiderer *et al.*, 1984; Thomas, 2001].

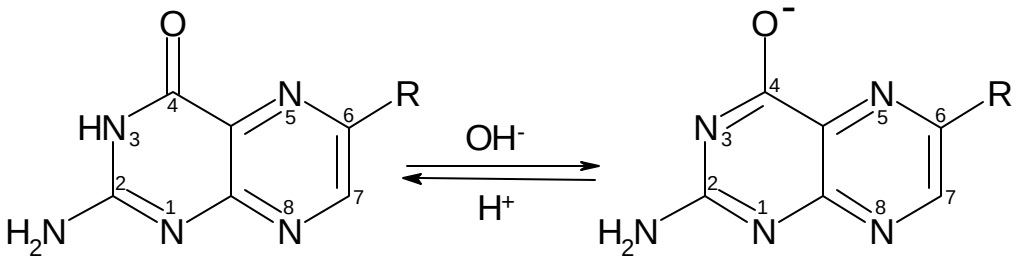


Figura 2.5: Equilibrio ácido-base del anillo pterínico en soluciones acuosas de pH entre 7 y 9.

Compuesto	**pK_a**
pterina	7.91
6-carboxipterina	7.33
6-formilpterina	7.89
ácido fólico	8.07
neopterina	8.00
biopterina	8.06

Tabla 2.1: pKa del equilibrio amida-fenolato en las pterinas.

Las pterinas en la naturaleza.

En la actualidad se conocen numerosas moléculas pertenecientes a la familia de las pterinas, que se encuentran en la naturaleza. Están presentes en casi todos los seres vivos en muy pequeñas cantidades, participando de variadas reacciones bioquímicas. Se las encuentra en cantidades considerables como pigmentos amarillos y blancos en las alas de diversas mariposas. El tetrahidrofolato, un derivado reducido del ácido fólico, y la tetrahidrobiopterina son los integrantes de esta familia de compuestos que más han sido estudiados en relación con su participación en reacciones químicas presentes en los seres vivos. Ambos están involucrados en reacciones metabólicas indispensables para los mamíferos; tal es así que su deficiencia produce serias alteraciones bioquímicas que conducen al desarrollo de graves enfermedades [Rapaport, 1988]. Otras pterinas están presentes en molibdoproteinas [Pfleiderer *et al.*, 1984]. El papel que desempeñan muchas pterinas no se conoce en detalle aún.

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble incluida en la serie conocida como complejo vitamínico B. El derivado activo de esta molécula es el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico, denominado normalmente tetrahidrofolato, el cual actúa como coenzima transportando unidades activas de un átomo de carbono. La variedad e importancia de las reacciones metabólicas en las que participa este derivado hacen que, el ácido fólico sea una molécula indispensable para la vida de los mamíferos [Stryer, 1995].

De todas las reacciones bioquímicas en las que participan los derivados del ácido fólico las más importantes son las involucradas en la síntesis de nucleótidos (monómeros de los ácidos nucleicos). Cuando estas reacciones se interrumpen por algún motivo, déficit de ácido fólico, por ejemplo, los ácidos nucleicos no pueden sintetizarse y, como consecuencia de esto, las células no pueden replicarse. Así las células sanguíneas y la mucosa intestinal, que requieren de duplicación celular constante, se ven seriamente afectadas. De esta manera, la alteración en la síntesis de ácido desoxirribonucleico que existe en el déficit de ácido fólico conduce a una patología con un cuadro morfológico característico en la sangre periférica y en la

médula ósea, que se conoce con el nombre de anemia megaloblástica. Por otra parte, se produce una atrofia de la mucosa del tubo digestivo que puede provocar un estado de malabsorción que puede, a su vez, intensificar el déficit primario.

Además del ácido fólico, otros compuestos relacionados con la familia de las pterinas participan en reacciones bioquímicas del metabolismo de los animales superiores. La 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina, un derivado reducido de la biopterina, y ciertos derivados pterínicos azufrados son los ejemplos mejor conocidos. La biopterina participa en la transformación de la fenilalanina a tirosina, una importantísima reacción del metabolismo de los aminoácidos catalizada por la fenilalanina hidroxilasa [Stryer, 1995]. Esta enzima pertenece a la familia de las monooxigenasa, las cuales catalizan reacciones en las que participa el O_2 disuelto en el medio. Uno de los átomos del mismo se incorpora al compuesto que se oxida (generalmente se hidroxila), mientras que el restante aparece en forma de H_2O (Figura 2.6).

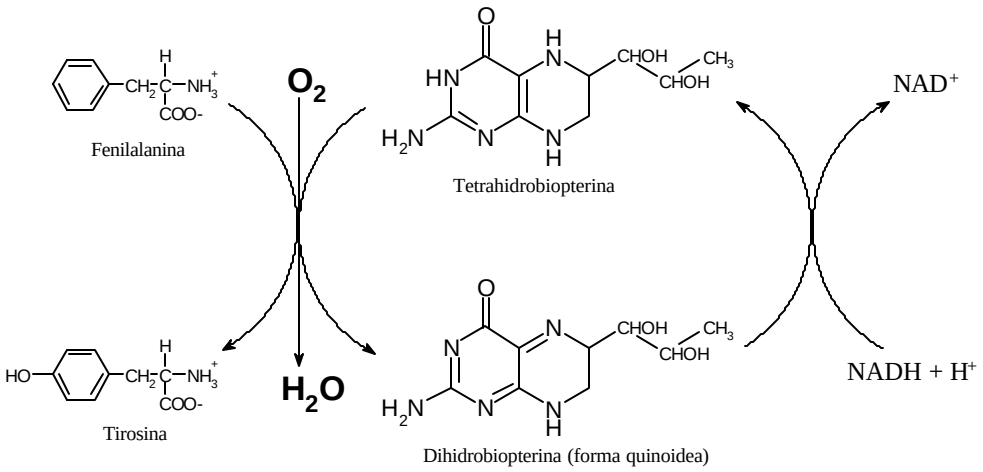


Figura 2.6: Participación de la tetrahidrobiopterina en la conversión de fenilalanina a tirosina.

Se ha demostrado en algunos casos y sugerido en otros la participación de diversos derivados pterínicos en procesos fotobiológicos. En un proceso

fotobiológico la luz es captada por una molécula que actúa como antena, y como consecuencia se produce una excitación electrónica en la molécula que puede conducir a cambios químicos o físicos, y, con ellos, a cambios fisiológicos. Por ejemplo, se han detectado diversos derivados pterínicos en una gran variedad de organismos en áreas expuestas a la luz como la piel de los vertebrados, tegumentos de los artrópodos o en órganos foto-sensitivos como los ojos de vertebrados e invertebrados [Pirie y Simpson, 1946].

En particular, a la fecha, es motivo de discusión su participación en algunas etapas de la fotorrecepción ocular y en la captación de la luz azul por parte de algunas plantas [Maier y Ninnemann, 1995]. En general, estos fotorreceptores son sustancias incluidas, como grupos prostéticos, en complejas estructuras proteicas que, a su vez, pueden tener otros grupos prostéticos y cofactores, necesarios para generar una señal química a partir del fenómeno primario de absorción de luz. Se ha demostrado que ciertas flavinas, formando parte de las denominadas flavoproteínas, y compuestos carotenoides cumplen este tipo de funciones en una variedad de organismos. Si bien todavía no existe evidencia concluyente, como la hay para las flavinas y compuestos carotenoides, la participación de las pterinas en respuestas fisiológicas controladas por la luz azul ha sido propuesta en varios organismos. El ejemplo mejor conocido, tal vez sea la nitrato reductasa de *Neurospora*, enzima que está involucrada en este tipo de procesos fotobiológicos y que contiene en su estructura tanto complejos de molibdeno con pterinas como flavinas [Klemm y Ninneman, 1979; Ninneman, 1984; Siefermann-Harms, *et al.*; 1985]. Asimismo, derivados pteridínicos podrían jugar un papel importante en combinación con las flavinas en ciertas especies de *Phycomyses* [Berns y Vaughn, 1970; Hohl *et al.*, 1992], particularmente, se demostró la existencia de biopterina en *Phycomyses blakesleeanus* [Kiewisch y Fukshansky, 1991]. Por último, fue postulada la participación de las pterinas como fotorreceptores en procesos de fototaxis presentes en *Euglena gracilis* [Galland, *et al.*, 1990; Schmidt, *et al.*, 1990; Brodhum y Häder, 1990].

La luz UV de longitudes de onda menores a 320 nm es altamente nociva para los seres vivos. Mata rápidamente a las células y, entre las supervivientes, se encuentra una elevada frecuencia de mutaciones [Stanier *et al.*, 1984]. Esto explica

los daños que produce la luz UV sobre la piel del ser humano y la tendencia a generar cáncer de piel en las zonas expuestas. Estos daños sobre el ácido desoxirribonucleico pueden ser reparados por diversos mecanismos enzimáticos. Uno de estos mecanismos se conoce como fotorreactivación [Kelner, 1949] y está a cargo de la enzima ADN-fotoliasa (fotoliasa) que contiene un derivado del ácido fólico. Este derivado del ácido fólico, N^5, N^{10}-meteniltetrahidrofolato, es el que absorbe la luz UV-A que activa a otra porción de la enzima para realizar la reparación del ácido desoxirribonucleico. En exposiciones prolongadas a la luz solar se recibe tanto luz UV-C y UV-B que dañan a las moléculas de ácido desoxirribonucleico, como luz UV-A necesaria para iniciar el mecanismo de reparación de las mismas. Es decir que el daño y la reparación ocurren simultáneamente, dando lugar a una competencia que decide el destino de la célula expuesta a la radiación.

El vitiligo, una de las patologías cutáneas más frecuentes en el ser humano, consiste en un desorden en la pigmentación que produce típicas manchas blancas sobre la piel. Los pacientes que sufren esta enfermedad, muestran una característica fluorescencia en sus manchas cutáneas cuando son sometidos a la denominada examinación con luz de Wood (351 nm). Se ha demostrado que este fenómeno ocurre por la acumulación de pterinas en las zonas afectadas por la enfermedad [Schallreuter *et al*.1994b; Schallreuter *et al.*, 1994c]. Es interesante comentar el papel que juegan varios derivados pterínicos en el vitiligo.

Se mencionó anteriormente que la 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina es un cofactor importante en la síntesis de tirosina. Este aminoácido es un sustrato fundamental en la síntesis de melanina (proceso conocido como melanogénesis) que ocurre en los melanocitos de la piel. La actividad de una de las enzimas más importantes en la melanogénesis, la tirosinasa, es regulada por la tetrahidrobiopterina. Pero este cofactor es oxidado a otra pterina, 6-biopterina (Figura 2.3), que es extremadamente citotóxica para los melanocitos humanos *in vitro* [Schallreuter *et al*.,1994a]. Consecuentemente, para asegurar la viabilidad de estas células, un mecanismo muy eficiente de reducción recupera la tetrahidrobiopterina. Esta reducción es catalizada enzimáticamente con la participación del radical anión superóxido generado por absorción de luz UV.

Debido a esto los melanocitos poseen las vías metabólicas para la síntesis y reciclado de la tetrahidrobiopterina.

En pacientes con vitiligo los melanocitos presentan alteraciones en el metabolismo que conducen a un aumento en la producción de tetrahidrobiopterina, la generación de agua oxigenada y a la inhibición de la síntesis de melanina. La 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina se oxida a 6-biopterina por reacción tanto con el oxígeno como con el agua oxigenada. En el vitiligo el mecanismo de recuperación de la 6-biopterina no es adecuado. Consecuentemente, este compuesto se acumula en zonas de la piel con déficit de pigmentación y, por ende, sin protección contra la radiación proveniente del sol.

En definitiva, todos los procesos fotofísicos y fotoquímicos que sufre la biopterina en soluciones acuosas pueden ocurrir en las zonas afectadas de la piel de los pacientes con vitiligo. Se ha demostrado, recientemente, que la fotooxidación *in vivo* de la 6-biopterina, anteriormente mencionada, produce, en un primer paso, 6-formilpterina y este compuesto, a su vez, se transforma en 6-carboxipterina [Rokos et al., 2002]. Estas transformaciones generan, además, agua oxigenada como producto de fotólisis, incrementando los efectos nocivos de este compuesto.

Conocimientos previos sobre la fotofísica de pterinas.

En la literatura no se encuentran muchos trabajos con información fotofísica de las pterinas. La mayoría de los trabajos sobre pterinas son de carácter biomédico. También existen numerosas publicaciones sobre la caracterización y cuantificación de diversos derivados pterínicos presentes en fluidos biológicos, con aplicaciones analíticas en el campo de la bioquímica clínica.

En la década del ’70 se publicaron los espectros de emisión fluorescente y fosforescente del ácido fólico en agua [Aaron y Winefordner, 1972]. El espectro de emisión es débil, mientras que la fosforescencia, que no se detecta a temperatura ambiente, se registra a 77 K.

Uno de los primeros y más importantes trabajos sistemáticos realizados sobre fotofísica de pterinas data de 1981 [Chahidi *et al.*, 1981]. En esta publicación, realizada solamente sobre pterina, se informa que dicho compuesto presenta emisión fluorescente mucho más fuerte que el ácido fólico y que el espectro de emisión es dependiente del pH. Asimismo se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia a pH 10. Se estudió la variación de los espectros de fosforescencia a 77 K con el pH, observando que la emisión fosforescente a temperatura ambiente se encuentra por debajo del límite de detección de los métodos empleados. También se muestran en este trabajo resultados de un estudio de Fotolisis de Flash, informándose los tiempos de vida para los decaimientos de los estados triplete. Se detectó el *quenching* de los estados excitados tripletes por oxígeno, indicando la posible generación de oxígeno singlete.

Más recientemente, se estudió la fotofísica de otros dos derivados, la 6,7-dimetilpterina y 6-tetrahidroxibutilpterina [Neverov *et al.* 1996]. En esta última publicación se muestran los espectros de fluorescencia a temperatura ambiente y a 77 K y los espectros de fosforescencia a 77 K, junto con los correspondientes rendimientos cuánticos. En este estudio se detectó la generación de $^1O_2$ por parte de ambos compuestos, midiendo la fosforescencia a 1270 nm del $^1O_2$ presente en soluciones de los compuestos estudiados en agua pesada (D_2O) y se informaron los correspondientes rendimientos cuánticos.

Ya en la década del '80 se conocía que las pterinas presentan emisión fluorescente. Esta propiedad ha sido una herramienta por demás útil para desarrollar muchos de los métodos analíticos de detección de pterinas [McCormack y Newman, 1985]. Los estudios analíticos de pterinas, incluso de coenzimas de ácido fólico, se ven facilitados por la absorción característica de estos compuestos en el rango UV-visible del espectro y la alta fluorescencia que presentan (el ácido fólico posee una baja intensidad de fluorescencia, pero puede ser oxidado cuantitativamente a 6-carboxipterina, que posee una intensidad de emisión mucho mayor, con permanganato en medio alcalino). En particular, se han usado, y se continúan usando en la actualidad, diversas técnicas cromatográficas en las cuales se detecta y cuantifica pterinas mediante su fluorescencia.

En estudios recientes se ha evaluado la incorporación de pterinas a moléculas de ácido desoxirribonucleico en reemplazo de las bases en los nucleótidos. Esto no modifica la estructura del ácido desoxirribonucleico en forma apreciable, como lo demuestran medidas de temperaturas de fusión, debido a la gran similitud entre una molécula de pterina y la guanina. Estas moléculas de ácido desoxirribonucleico que contienen pterinas, presentan la fluorescencia característica de las mismas, herramienta por demás útil para proporcionar información sobre la estructura del ácido desoxirribonucleico y su respuesta a interacciones con otras moléculas, como por ejemplo proteínas. Cualquier interacción de un compuesto con una molécula de ácido desoxirribonucleico que contiene pterina, provoca un cambio en la fluorescencia de la misma con una alta sensibilidad [Hawkins *et al.*, 2001].