

FOTOSENSIBILIZACIÓN DE NUCLEÓTIDOS POR PTERINA

Sandra Estébanez Ruiz; Carolina Lorente; Andrés H. Thomas

Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Dpto. de Química. Fac. de Ciencias. Exactas., Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Calle 64 Diag. 113, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.

sestebanez@inifta.unlp.edu.ar

RESUMEN: Las pterinas son compuestos heterocíclicos presentes en gran variedad de sistemas vivos que participan en funciones biológicas importantes. Bajo excitación con luz UV-A pueden fluorescer, experimentar fotooxidación y generar especies reactivas de oxígeno. En presencia de oxígeno, actúan como fotosensibilizadores a través de un mecanismo tipo I y/o tipo II. Se realizaron estudios de degradación de 2'-desoxitimidina en presencia de pterina bajo radiación UV-A. Bajo condiciones anaeróbicas se observó la formación de aductos entre el sustrato y el fotosensibilizador. En presencia de O₂ el estado excitado triplete de la pterina tiene un rol fundamental en el proceso fotosensibilizado, siendo el proceso un mecanismo de oxidación tipo I, que involucra la transferencia de electrones.

PALABRAS CLAVE: fotosensibilización, pterinas, nucleótidos

La radiación UV es la porción más energética que alcanza la superficie terrestre, y es capaz de inducir modificaciones en la estructura química de algunas macromoléculas y metabolitos presentes en los tejidos. Más concretamente, los daños generados en proteínas y ADN pueden provocar disfunciones en el metabolismo, mutaciones en la secuencia de bases del ADN, procesos neoplásicos, e incluso, la muerte celular. Estas modificaciones ocasionadas por la radiación UV se pueden dar de forma directa o indirecta [1]. La radiación UV-B (280 – 320 nm) puede dañar al ADN a través de la excitación directa de las nucleobases. Por otra parte, en los procesos indirectos, un compuesto conocido como sensibilizador o fotosensibilizador, absorbe radiación UV-A (320 – 400 nm) y/o visible volviéndose reactivo. El sensibilizador en su estado excitado puede reaccionar con otras moléculas mediante una transferencia de energía o de electrones. Actualmente, se conocen numerosos compuestos heterocíclicos que actúan como fotosensibilizadores, como las porfirinas, las ftalocianinas, las flavinas, las lumazinas y las pterinas (Ptrs). Las Ptrs se encuentran en los sistemas biológicos y constituyen una amplia familia de compuestos. Cuando éstas absorben radiación UV-A participan en reacciones fotosensibilizadas, generando especies reactivas de oxígeno (¹O₂, O₂^{•-} y H₂O₂) [2,3]. En presencia de oxígeno, actúan como fotosensibilizadores a través de un mecanismo tipo I (transferencia electrónica) y/o tipo II (transferencia de energía) [4,5].

Se realizaron estudios de degradación de un nucleósido pirimidínico, 2'-desoxitimidina (dT) en presencia de Ptr (**Fig. 1**) bajo radiación UV-A. Las degradaciones fotosensibilizadas de dT por pterina fueron estudiadas en soluciones acuosas a pH 5.5 bajo irradiación con luz UV-A (350 nm) y a temperatura ambiente, bajo diferentes condiciones experimentales. El sistema de irradiación estaba formado por tres lámparas Rayonet RPR3500A (350 nm). Se emplearon celdas de fluorescencia de camino óptico de 1x0.4 cm, irradiando con una lámpara por el camino de 1 cm y con dos por el camino de 0.4 cm. Los procesos fotoquímicos fueron seguidos por espectrofotometría UV-Vis y cromatografía líquida de alta resolución con detección espectrofotométrica y fluorométrica (HPLC Prominence Shimadzu). En los diferentes ensayos se empleó una columna de fase reversa, Synergi 4 μm POLAR-RP 80A (150 x 4.6 mm, 4 mm, Phenomenex). Como fase móvil se utilizó una mezcla de ácido fórmico 25 mM y acetonitrilo (96-4%) a pH 3.3, con un flujo de 1 mL/min.

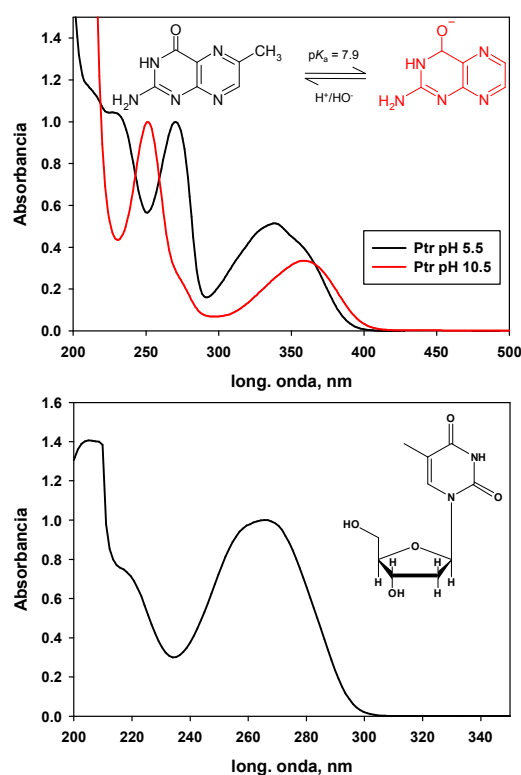


Fig. 1. Estructuras moleculares de Ptr y dT, junto con los correspondientes espectros de absorción en solución acuosa.

El principal objetivo de este trabajo fue evidenciar si la Ptr es capaz de inducir algún tipo de daño químico a la dT. Para ello se irradiaron durante diferentes períodos de tiempo mezclas acuosas de dT en presencia de Ptr y se siguieron las cinéticas mediante HPLC. Para comprobar si el estado excitado triplete del fotosensibilizador estaba implicado en el mecanismo de reacción, se realizaron experimentos en presencia de yoduro de potasio (KI). El ión yoduro es un desactivador específico de los estados excitados de moléculas orgánicas, y cuando su concentración es superior a 0.1 mM inhibe el estado excitado triplete del sensibilizador [6]. Para estudiar la posible participación del anión superóxido (O₂^{•-}) en el mecanismo de reacción, se irradiaron las disoluciones en presencia de superóxido dismutasa (SOD), con una

concentración de 50 U/mL. Esta enzima cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ en peróxido de hidrógeno y oxígeno [7].

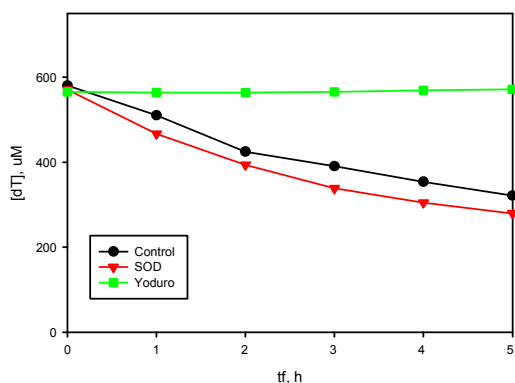


Fig. 2. Evolución temporal de la concentración de dT en presencia de Ptr en soluciones acuosas en función del tiempo de irradiación.

En la **Figura 2** se observa cómo el consumo de dT es inhibido cuando el anión yoduro está presente en el medio de reacción. Debido a ello, se puede afirmar que el estado excitado triplete de la Ptr está implicado en el mecanismo de reacción. En un mecanismo tipo I entre la Ptr y el nucleósido se forma el correspondiente par de radicales, el catión de nucleósido y el anión de Ptr. El anión de Ptr reacciona rápidamente con O_2 para formar $O_2^{\cdot-}$ [8]. El $O_2^{\cdot-}$ reacciona con el catión del nucleósido formado, y se recupera el nucleósido original. Cuando la solución es irradiada en presencia de SOD, se puede observar un ligero aumento de la velocidad de consumo del sustrato. Esto se debe a que se está eliminando dicha vía de recuperación del nucleósido.

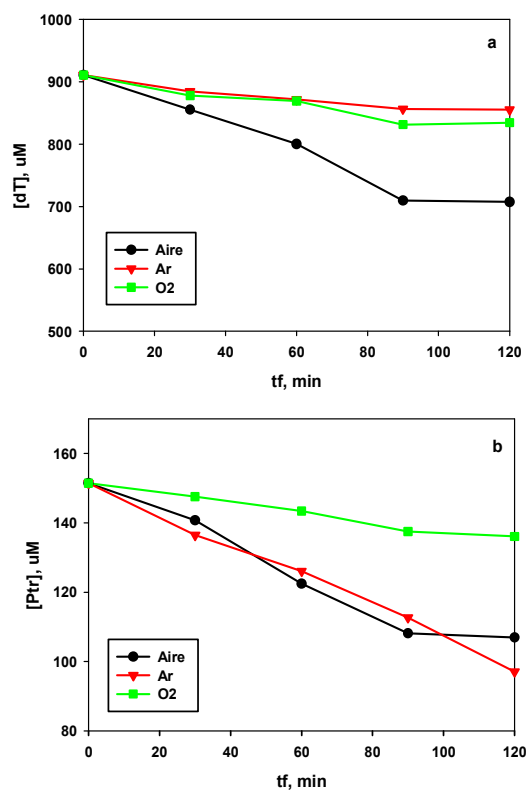


Fig. 3. Evolución temporal de la concentración de dT (figura 3.a) y Ptr (figura 3.b) en soluciones acuosas aireadas (●), con atmósfera anaeróbica (▼) y en atmósfera saturada de oxígeno (■) en función del tiempo de irradiación.

En la **Figura 3.a**, se puede observar que la dT se consume en las tres condiciones, pero este consumo es mayor en la solución aireada. En el

caso de la Ptr (**Fig. 3.b**), la velocidad de consumo disminuye considerablemente en las soluciones con atmósfera saturada de oxígeno. Esto se debe a que el oxígeno molecular desactiva los estados excitados tripletes del fotosensibilizador. Sin embargo, en condiciones anaeróbicas se observa un consumo importante de la Ptr, lo cual es interesante porque la Ptr no se consume bajo estas condiciones por su propia fotoquímica.

Además, al analizar los cromatogramas obtenidos con el HPLC, se observa la aparición de un pico que aumenta con el tiempo de irradiación. Este producto presenta propiedades fluorescentes similares a las de la Ptr (**Fig. 4**).

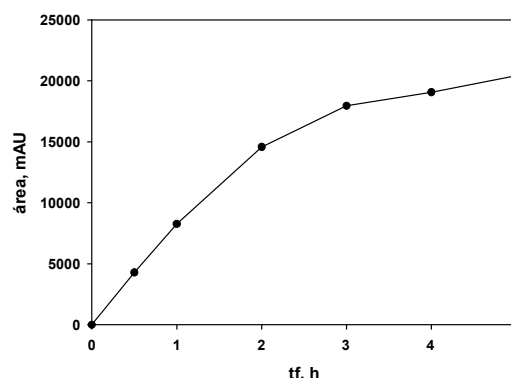


Fig. 4. Área del pico cromatográfico del aducto generado en función del tiempo de irradiación.

Para evaluar la dependencia de este proceso fotosensibilizado con el oxígeno del medio, se irradió la mezcla acuosa durante diferentes períodos de tiempo en condiciones anaeróbicas y en atmósfera saturada de oxígeno (**Fig. 3**). Estas condiciones se consiguieron tras burbujear la celda durante 10 minutos con argón y oxígeno, respectivamente.

El estudio avanzó con el fin de obtener más información acerca de este nuevo producto. Para ello se repitieron las experiencias en condiciones anaeróbicas y se analizó el consumo en moles del fotosensibilizador y del sustrato (**Fig. 5**).

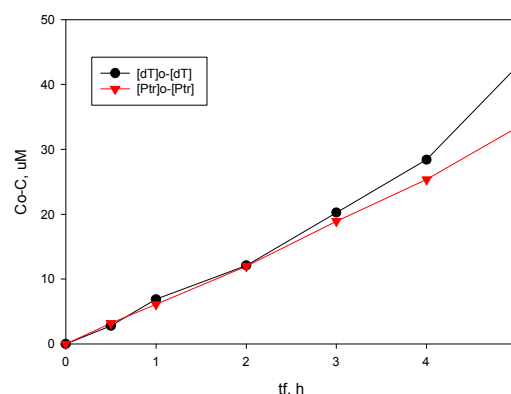


Fig. 5. Consumo en moles del sustrato (●) y del fotosensibilizador (▼).

La **Figura 5** nos muestra de una forma muy evidente que la relación entre el consumo de moles de Ptr y el consumo de moles de dT presenta una relación 1:1, por lo menos durante las primeras 4 horas de irradiación. Esto nos hace pensar que ese producto generado es un aducto formado por la unión de la Ptr y la dT.

Para concluir, se puede decir que la Ptr es capaz de fotoinducir modificaciones químicas a la dT, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Además, en ausencia de oxígeno y medio ácido se forma un

aducto estable entre la Ptr y la dT con una relación 1:1, que presenta fluorescencia de características similares a la Ptr.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET- PIP 0425), por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP-X712) y por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-PICT 2012-0508).

REFERENCIAS

- [1] J.L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components", *J. Photochem. Photobiol.*, B, **2001**, 63- 88.
- [2] G. Petroselli, M.L. Dántola, F.M. Cabrerizo, A.L. Capparelli, C. Lorente, E. Oliveros, A.H. Thomas, "Oxidation of 2'-Deoxyguanosine 5'-Monophosphate Photoinduced by Pterin: Type I versus Type II Mechanism", *J. Am. Chem. Soc.*, 130, **2008**, 3001-3011.
- [3] C. Lorente, A.H. Thomas, "Photophysics and Photochemistry of Pterins in Aqueous Solution", *Acc. Chem. Res.*, **2006**, 395-402.

- [4] E. Oliveros, M.L. Dántola, M. Vignoni, A.H. Thomas, C. Lorente, "Production and quenching of reactive oxygen species by pterin derivatives, an intriguing class of biomolecules", *Pure Appl. Chem.*, **83**, **2011**, 801-811.
- [5] G. Petroselli, R.E. Balsells, F.M. Cabrerizo, C. Lorente, A.L. Capparelli, A. M. Braun, E. Oliveros, A.H. Thomas, "Photosensitization of 2'-deoxyadenosine-5'-monophosphate by pterina", *Org. Biomol.Chem.*, **2007**, 2792-2799.
- [6] M.P. Denofrio, P.R. Ogilby, A.H. Thomas, C. Lorente, "Selective quenching of triplet excited states of pteridines", *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, 1058-1065.
- [7] I. Fridovich, "Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle", *Photochem. Photobiol.* **1978**, 733-741.
- [8] M.L. Dántola, M. Vignoni, C. González, C. Lorente, P. Vicendo, E. Oliveros, A.H. Thomas, "Electron-transfer processes induced by the triplet state of pterins in aqueous solutions", *Free Rad. Biol. Med.* **49**, **2010**, 1014-1022.