

PROPIEDADES FOTSENSIBILIZADORAS DE LAS PTERINAS SOBRE NUCLEÓTIDOS

Como se describió anteriormente en el *Capítulo 3*, muchas veces las moléculas reaccionan en presencia de luz de longitudes de onda que no es absorbida por ellas. No obstante puede ocurrir una reacción fotoquímica si está presente una especie capaz de absorber dicha luz, y transferir la energía a una molécula potencialmente reactiva. Este proceso se llama fotosensibilización. En el mencionado capítulo se expusieron los diferentes mecanismos involucrados en algunos procesos de fotosensibilización y, en particular, se describieron los mecanismos de las oxidaciones fotosensibilizadas. Asimismo se mencionó la importancia de procesos fotosensibilizados que involucran biomoléculas y, especialmente, aquéllos en los cuales el ácido desoxirribonucleico y sus componentes sufren distintos tipos de alteraciones.

Con el objeto de investigar la participación de pterinas en este tipo de procesos, se encararon varios estudios. En el presente capítulo se muestran resultados de un estudio realizado sobre tres nucleótidos, utilizando pterina como sensibilizador.

Características espectroscópicas de los nucleótidos

Los nucleótidos no absorben luz de 350 nm pero son susceptibles de participar en reacciones fotosensibilizadas al ser expuestos a luz de dicha longitud de onda en presencia de algunas moléculas que sí la absorben.

Todos los nucleótidos utilizados presentan absorción en la zona UV a longitudes de onda menores de 300 nm. En la Figura 12.1. se muestran los espectros de los tres nucleótidos que se emplearon en los experimentos descritos en este capítulo: 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (dGMP), 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato (dAMP) y 2'-desoxicitosina-5'-monofosfato (dCMP).

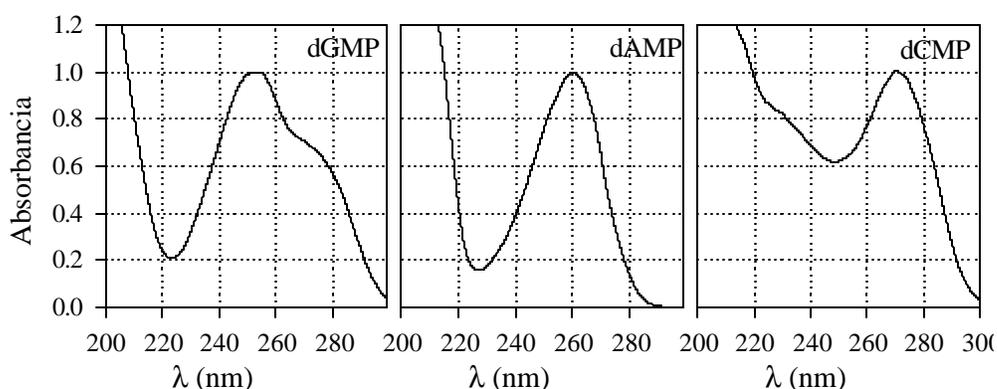


Figura 12.1: Espectros de absorción normalizados de soluciones de dGMP, dAMP y dCMP.

Irradiación continua de nucleótidos en presencia de pterinas. Estudios espectrales.

Se realizaron experimentos de irradiación continua (luz de 350 nm) sobre soluciones de nucleótidos y pterina (pH = 6.0). Se llevaron a cabo experimentos tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. También se realizaron estudios en presencia de azida sódica (NaN_3), un poderoso agente secuestrador de oxígeno singlete. Cada nucleótido es analizado por separado, debido a que los resultados son diferentes para cada uno de ellos.

2'-desoxiguanosina -5' -monofosfato: En las Figuras 12.2 y 12.3 se muestran los cambios espectrales que ocurren en una solución acuosa aireada de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (500 μM) y pterina (50 μM) a pH 6.0, al ser irradiada con luz UV-A ($\lambda = 350 \text{ nm}$).

Puede observarse un claro aumento de la absorbancia entre 216 y 240 nm, con un máximo en 224 nm, y entre 290 y 400 nm, con un máximo en 305nm. Esto se ve más claramente en los espectros diferencia presentados en la figura 12.3. También se observan 3 puntos isosbéticos a 214, 242 y 290 nm, que se mantienen durante los 30 minutos que se irradia la solución, sugiriendo que existe un único proceso en el período de tiempo analizado.

Por otro lado, con el objetivo de investigar si existe reacción térmica entre 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y pterina, se realizaron controles sobre mezclas de soluciones de ambos compuestos no irradiadas: se mezclaron soluciones de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y pterina, y se tomaron espectros de absorción a distintos tiempos luego de realizar la mezcla. En estos experimentos no se observaron cambios espectrales. Además se comparó el espectro de la solución mezcla con la suma de los espectros de ambas soluciones por separado (considerando el efecto de la dilución). Los resultados obtenidos con estos experimentos permiten descartar reacciones térmicas entre 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y pterina en solución acuosa.

Paralelamente se irradió, en idénticas condiciones, una solución de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato en ausencia de pterina, a modo de control. No se observaron cambios espectrales de dicha solución. También se realizaron controles irradiando soluciones de pterina y no se observaron cambios en los mismos tiempos de la irradiación. Teniendo en cuenta los resultados de estos experimentos de control puede inferirse que tanto 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato como pterina son fotoestables en las condiciones de irradiación empleadas. Si embargo, cuando estos compuestos son irradiados conjuntamente se produce un proceso fotoquímico que se evidencia por los cambios espectrales.

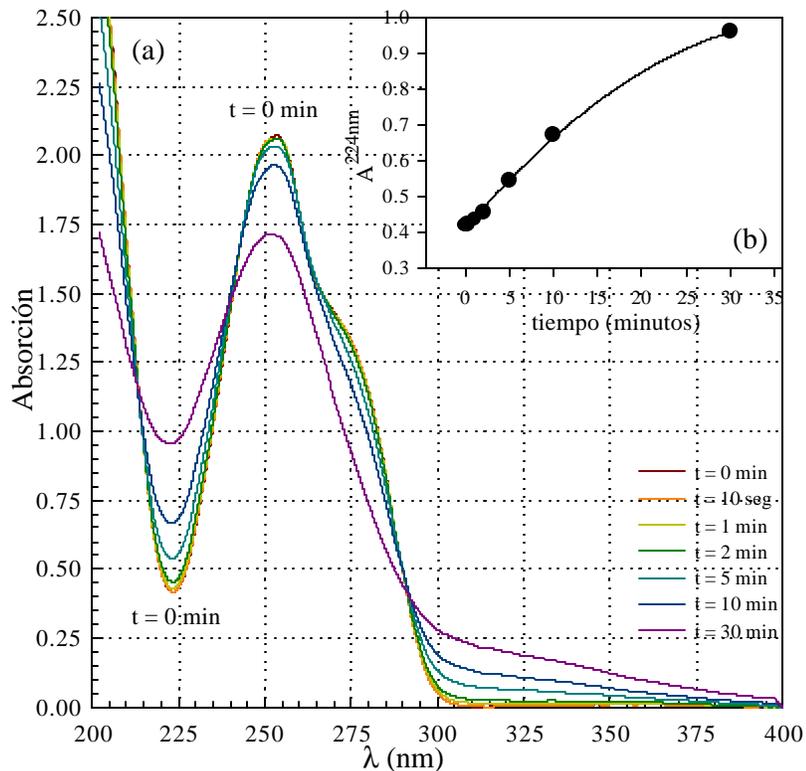


Figura 12.2: (a) Evolución de los espectros de absorción de una solución de pterina ($5 \times 10^{-5}\text{M}$) y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato ($5 \times 10^{-4}\text{M}$) a pH 6.0 durante la irradiación a 350 nm (se restó el espectro de la pterina). (b) Variación de la absorbancia de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato a 224 nm con el tiempo de irradiación.

Con el objeto de investigar el efecto del pH sobre el proceso en estudio, se realizó un conjunto de experimentos en condiciones similares al descrito en los párrafos anteriores, pero a pH = 10.5. Los resultados en esta condición de pH son muy similares a los obtenidos a pH 6.0: no existe reacción térmica entre 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y pterina, ambos compuestos son fotoestables

cuando se encuentran separados y se observan significativos cambios espectrales cuando se irradian una mezcla de ambos, revelando un proceso fotoquímico.

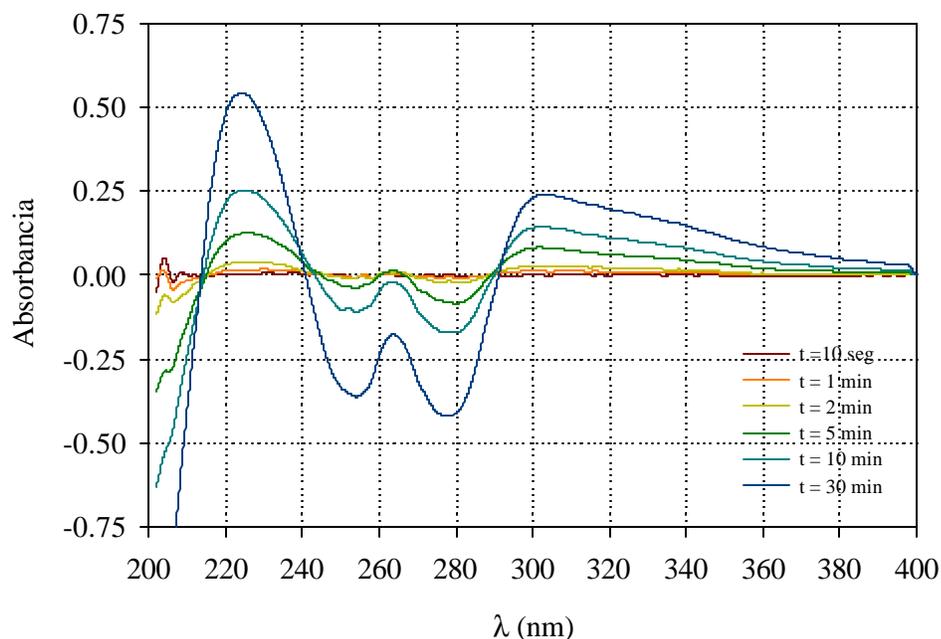


Figura 12.3: Espectros diferenciales correspondientes a la irradiación de dGMP en presencia de pterina con luz de 350 nm de la Figura 12.2.

2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato: Se realizó un estudio análogo para 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato. Los resultados de estos experimentos llevados a cabo en medio ácido (pH = 6.0) permiten inferir conclusiones similares a las propuestas para 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. Es decir, a pH 6.0, el nucleótido 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato no reacciona térmicamente con pterina y no sufre alteraciones al ser irradiado aisladamente a 350 nm. Por el contrario, existe un proceso fotoquímico cuando ambos compuestos son irradiados en forma conjunta. Sin embargo,

los cambios espectrales observados en este caso son mucho más lentos que los observados en los experimentos con el nucleótido 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato.

Por otro lado, los experimentos llevados a cabo en medio alcalino muestran resultados completamente diferentes. En este caso, cuando se irradia una mezcla de 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato y pterina a pH 10.7, no se observan cambios espectrales, aún luego de dos horas de irradiación. Estos experimentos fueron realizados en las mismas condiciones experimentales (concentración irradiación, etc) que los correspondientes al estudio con 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. Los controles, por su parte, mostraron resultados equivalentes a los controles para los estudios anteriores: no existe reacción térmica entre pterina y 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato y el nucleótido no sufre alteraciones cuando se irradia a 350 nm en forma aislada.

2'-desoxicitosina-5'-monofosfato: Se realizaron los mismos estudios que a los dos nucleótidos anteriores. Tanto en medio ácido como en medio alcalino se observaron resultados análogos: al irradiar 2'-desoxicitosina-5'-monofosfato no se observan cambios espectrales, tanto en presencia como ausencia de pterina.

A fin de evaluar el papel del oxígeno en los procesos fotoquímicos detectados, se efectuaron experimentos en soluciones burbujeadas con nitrógeno. Estos experimentos, realizados en anaerobiosis, se llevaron a cabo en idénticas condiciones de pH, concentración e irradiación que aquellos descritos anteriormente. En los tres casos analizados (2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato, pH 6.0 y pH 10.5, y 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato, pH 6.0) se observó el mismo resultado: no se observaron cambios espectrales.

Vale la pena, en este punto, analizar en conjunto los resultados experimentales expuestos hasta el momento en este Capítulo. El nucleótido

2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato, que contiene en su estructura una base púrica, parece ser el nucleótido más sensible a alteraciones fotoinducidas por la pterina, y este efecto se observa tanto para la forma ácida como para la alcalina de la pterina. El nucleótido 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato, que también posee una base púrica, es menos sensible en medio ácido y es resistente a este tipo de procesos en medio alcalino. El nucleótido 2'-desoxicitosina-5'-monofosfato, el único analizado que posee una base pirimídica, es fotoestable en presencia de pterina en ambas condiciones de pH. Debido a que los procesos detectados no ocurren en ausencia de oxígeno, puede sugerirse que se trata de oxidaciones fotosensibilizadas.

Estas diferencias en el comportamiento frente a la irradiación continua a 350 nm podrían explicarse con los potenciales de reducción de las diferentes bases. Las purinas tienen menor potencial de reducción que las pirimidinas. Entre las purinas la guanina es la que posee menor potencial de reducción, siendo entonces la más reactiva [Saito et al., 1995]. Así, el orden en la reactividad encontrado en los nucleótidos analizados coincide con el orden creciente de los potenciales de oxidación.

Para evaluar el papel del oxígeno singlete en las oxidaciones fotosensibilizadas que se acaban de describir se realizaron experimentos en presencia de azida sódica (NaN_3). Este compuesto es un potente secuestrador de oxígeno singlete, debido a que su constante de velocidad de *quenching* total de oxígeno singlete (k_T) es muy elevada. En estos experimentos se irradiaron mezclas de pterina 50 μM , 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato 500 μM y azida sódica 100 mM. Se tomaron los espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación. En cada caso se realizó un control del experimento en las mismas condiciones pero en ausencia de azida. Para los tres casos analizados (soluciones ácidas y alcalinas de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y soluciones ácidas de 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato) no se observaron cambios espectrales apreciables en las irradiaciones realizadas en presencia de azida sódica. Es decir, la presencia de un secuestrador de oxígeno singlete inhibe las fotooxidaciones detectadas en los experimentos anteriores. Si bien no se pueden

descartar otros mecanismos de reacción, estos experimentos sugieren fuertemente que en los procesos observados el oxígeno singlete tiene un papel fundamental como especie reactiva.

Irradiación continua de nucleótidos en presencia de pterinas. Análisis cromatográficos.

Se analizaron mediante cromatografías soluciones irradiadas de pterina y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. Estos dos compuestos pueden ser separados por TLC. En las placas cromatográficas de celulosa con indicador fluorescente descritas en el *Capítulo 8*, la pterina aparece como una mancha fluorescente cuando se expone la placa a luz de 350 nm. La 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato no se observa con luz de 350 nm, pero aparece como una mancha opaca sobre fondo fluorescente cuando la placa se ilumina con luz de 254 nm.

Se preparó una solución de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (0.5×10^{-3} M) y de pterina (0.5×10^{-4} M) a pH 6.0. Se irradiaron alícuotas de dicha solución a distintos tiempos. En la misma placa se siembran soluciones irradiadas a tiempos diferentes y soluciones de pterina y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato por separado según el esquema de la Figura 12.4, donde cada número corresponde a una solución diferente: (1) pterina (0.5×10^{-4} M), (2) 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (0.5×10^{-3} M), (3), (4) y (5) soluciones de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (0.5×10^{-3} M) y pterina (0.5×10^{-4} M) irradiadas durante 0, 1 y 30 minutos respectivamente. Con fines comparativos se sembró la misma cantidad de gotas en todas las calles. Como fase móvil se utilizó NH_4Cl al 0.3 % p/v.

Luego de realizar la corrida se observan tres manchas diferentes representadas en el esquema de la Figura 12.4:

-mancha **A** ($R_f = 0.75$), que corresponde a 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato;

-mancha **B** ($R_f = 0.52$) que corresponde a pterina;

-mancha C ($R_f = 0$) que corresponde a un producto que aparece solamente después de la irradiación.

Se observó que la mancha B, correspondiente a pterina, es igual en las calles correspondientes a las mezclas irradiadas e igual a la de la solución testigo. Estos resultados sugieren que la pterina no se modifica durante la irradiación y, por ende, actúa como sensibilizador. La mancha A, correspondiente a 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato, por el contrario, muestra una progresiva disminución en su intensidad al aumentar el tiempo de irradiación, indicando que el nucleótido sufre una transformación química. Por último, la mancha C, que no se detecta en la mezcla no irradiada, aparece luego de la irradiación y se intensifica con el tiempo. El compuesto de esta mancha es, evidentemente, un producto que sólo se genera al irradiar una mezcla 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y de pterina.

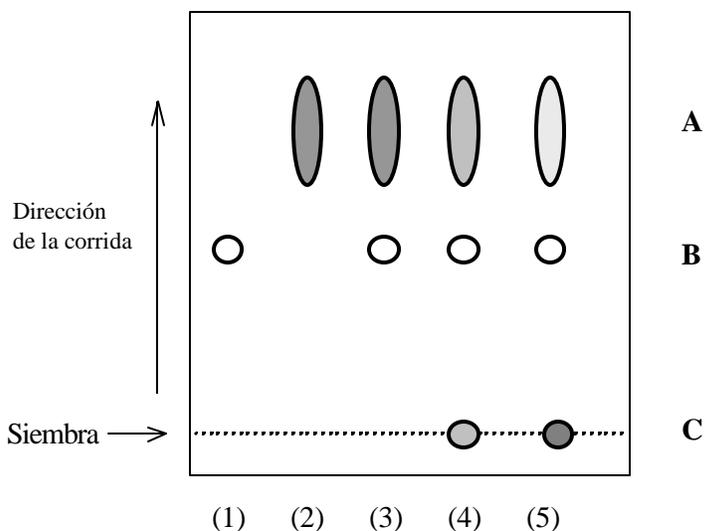


Figura 12.4: Esquema de la corrida cromatográfica de una irradiación continua de pterina y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. (Las calles se explican en el texto).

Efecto del oxígeno singlete.

Se realizaron experimentos para investigar si el oxígeno singlete generado por pterina sufre *quenching* por los nucleótidos estudiados. Para ello se utilizó el equipo descrito en el *Capítulo 7* y la técnica allí explicada para determinar *quenching* total de oxígeno singlete. Estos experimentos se realizaron irradiando mezclas de pterina (1.7×10^{-4} M) y un nucleótido en D_2O a 367 nm.

Se prepararon soluciones de pterina con y sin nucleótidos. Puede observarse, en la Figura 12.5, que la concentración estacionaria de oxígeno singlete se vuelve despreciable en la solución que contiene 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (6×10^{-4} M). En la Figura 12.6 se observa que la concentración estacionaria de oxígeno singlete disminuye, sólo parcialmente, en la solución que contienen 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato en una concentración mayor (2.4×10^{-3} M). Para este nucleótido se eligió una concentración mayor debido a que se observaron pequeños cambios en la señal, pero dentro del error experimental. Al concentrar la muestra en el nucleótido la señal disminuye en forma apreciable. No se observan cambios en la señal de la solución que contiene 2'-desoxicitosina-5'-monofosfato (6×10^{-4} M).

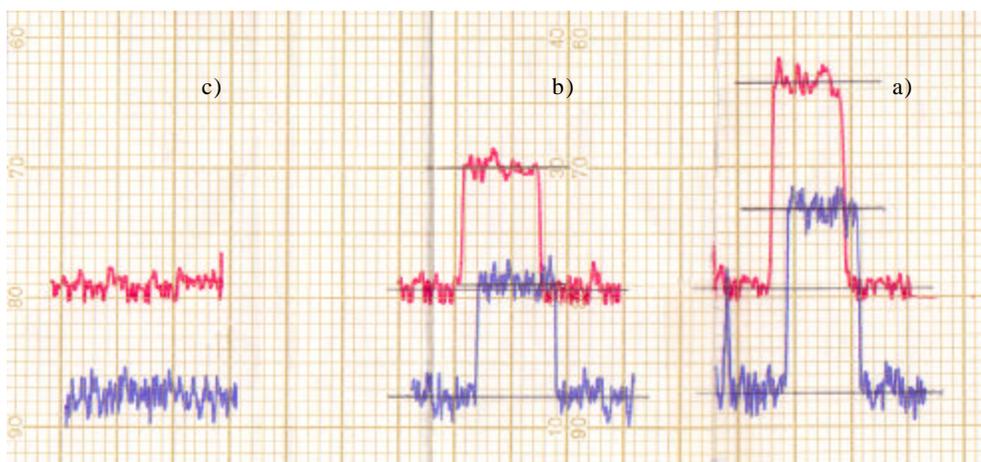


Figura 12.5: Señales de oxígeno singlete para soluciones de a) rosa de bengala, b) pterina y c) pterina y dGMP (6×10^{-4} M).

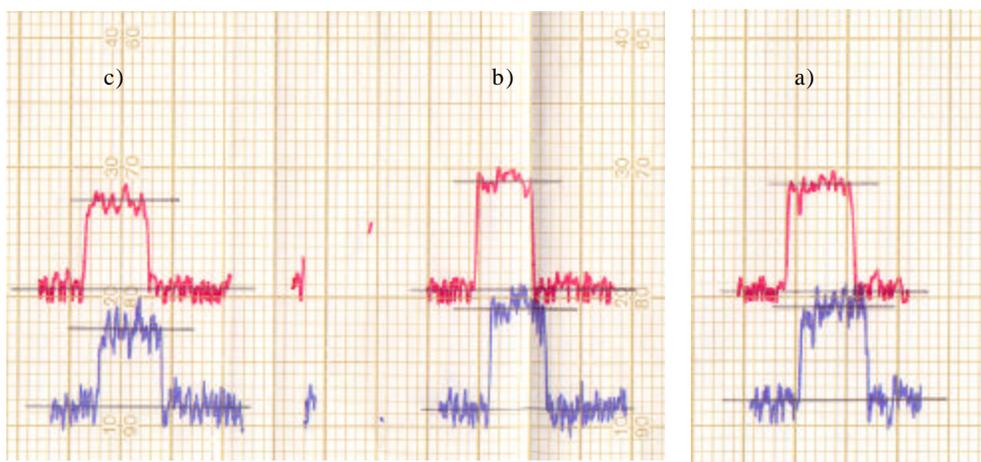


Figura 12.6: Señales de oxígeno singlete para soluciones de a) pterina, b) pterina y dCMP (6×10^{-4} M) y c) pterina y dAMP (2.5×10^{-3} M).

Irradiación de nucleótidos en presencia de pterina. Medida electroquímica de oxígeno.

Los resultados mostrados hasta el momento sugieren que los procesos estudiados son oxidaciones fotosensibilizadas, en las cuales interviene el oxígeno singlete generado a partir del oxígeno presente en las soluciones. Si esta hipótesis es verdadera, la concentración del oxígeno disuelto en la mezcla debería disminuir con el tiempo de irradiación. Para corroborar esto se realizaron experimentos en los cuales se irradiaron soluciones conteniendo pterina y un nucleótido (a un determinado pH) y se determinó en las mismas la concentración de oxígeno, empleando para ello un electrodo sensible a dicho gas (ver *Capítulo 8*). A modo de control y con el objeto de evaluar si la irradiación de pterina en solución acuosa genera cambio en la concentración de

oxígeno, se efectuaron experimentos similares con soluciones de pterina en ausencia de nucleótidos.

Como puede apreciarse en la Figura 12.7 la irradiación de una solución conteniendo pterina ($92 \mu\text{M}$) y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato ($380 \mu\text{M}$) a pH 5,5 provoca una disminución en la concentración de oxígeno de casi un orden de magnitud en una hora. En la misma figura se muestra, con fines comparativos, la evolución en la concentración de oxígeno en función del tiempo de irradiación obtenida en un experimento control, realizado con una solución de pterina de la misma concentración ($92 \mu\text{M}$) y el mismo pH, y con la misma geometría de irradiación. Puede observarse que en este experimento el consumo de oxígeno es prácticamente despreciable durante más de una hora, descartando que procesos que le ocurren a la pterina en ausencia de nucleótidos puedan contribuir al descenso de la concentración de oxígeno en los experimentos realizados irradiando las mezclas de pterina y nucleótidos.

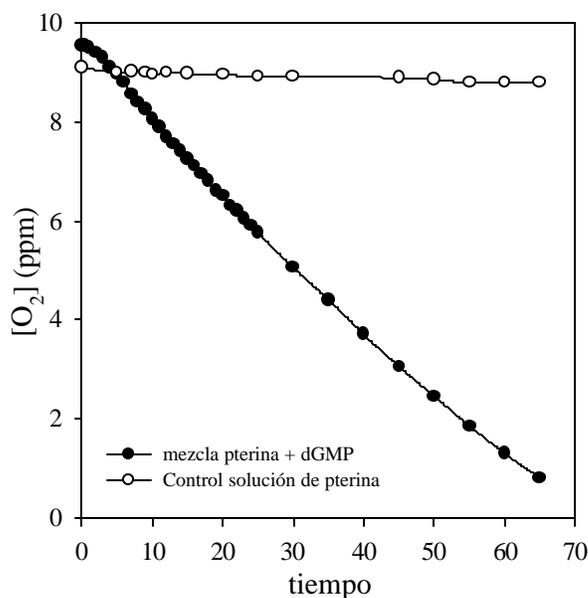


Figura 12.7. Cambios en la concentración de O_2 disuelto durante la irradiación de una solución de pterina (92 mM) y dGMP (380 mM) a pH 5,5 y una solución control de pterina en las mismas condiciones de concentración y pH.

Resultados similares se encontraron para experimentos del mismo tipo (irradiación de mezclas de pterina y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato), pero realizados en medio alcalino. En la Figura 12.8 se muestra la evolución de la concentración de oxígeno en un experimento realizado irradiando una solución con pterina (94 μ M) y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (375 μ M) a pH 10,4. Considerando que este experimento se efectuó en condiciones prácticamente iguales que las del experimento expuesto en el párrafo anterior, pueden compararse las dos velocidades de consumo de oxígeno, siendo las mismas muy parecidas entre sí. En la Figura 12.8 puede apreciarse además el correspondiente control realizado en ausencia de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato.

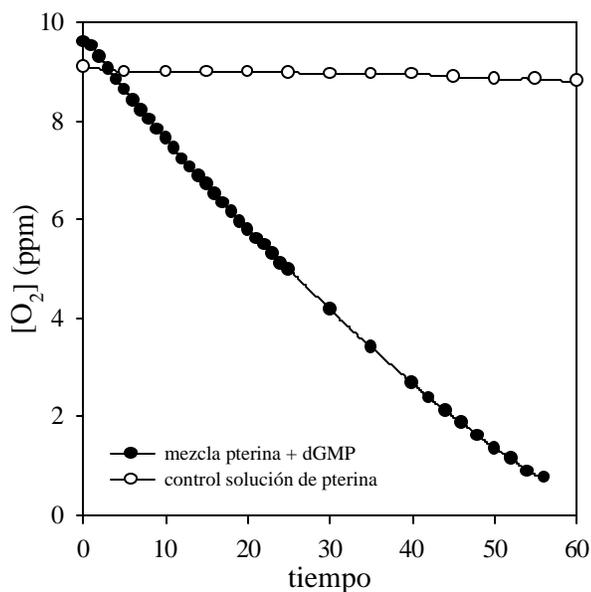


Figura 12.8. Evolución de la concentración de O_2 durante la irradiación de una solución conteniendo pterina (94 mM) y dGMP (375 mM) a pH 10,4 y una solución control conteniendo pterina en las mismas condiciones de concentración y pH.

Por último, se llevaron a cabo experimentos similares con 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato. En medio ácido se observó un consumo de oxígeno apenas superior al mostrado por el correspondiente blanco. En medio alcalino, por su parte, las diferencias en las velocidades de consumo de oxígeno, prácticamente caen dentro del error experimental del método. En la figura 12.9 se muestran las curvas experimentales correspondientes a estos experimentos. Estos resultados están de acuerdo con los experimentos de irradiación continua expuestos anteriormente.

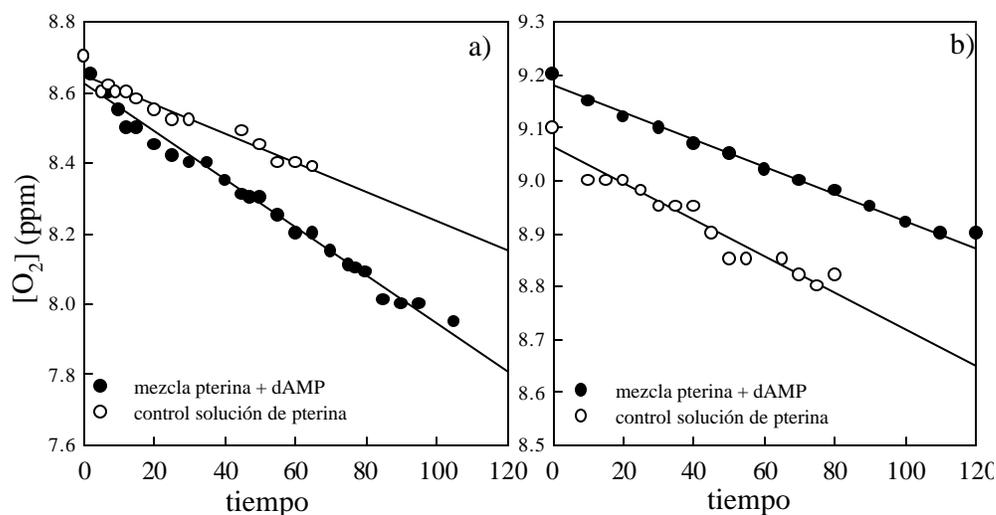


Figura 12.9: Evolución de la concentración de O_2 durante la irradiación de una solución conteniendo: a) pterina (94 mM) y dAMP (380 mM) a pH 5,5 y una solución control conteniendo pterina en las mismas condiciones de concentración y pH; y b) pterina (92 mM) y dAMP (388 mM) a pH 10.4 y una

solución control conteniendo pterina en las mismas condiciones de concentración y pH.

Puede inferirse de los experimentos analizados en esta sección la misma conclusión obtenida del estudio espectrofotométrico: el proceso que ocurre al irradiar una solución ligeramente ácida conteniendo pterina y 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato es más lento que aquél que ocurre en las soluciones conteniendo pterina y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. Asimismo el proceso que ocurre en medio alcalino al irradiar una mezcla de pterina y 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato es despreciable.