

UNIVERSIDAD: UNLP

NÚCLEO DISCIPLINARIO/COMITÉ ACADÉMICO/TEMA PROPUESTO: Química

TÍTULO DEL TRABAJO: **FOTOSENSIBILIZACIÓN DE dGMP POR PTERINA: ROL DEL ANIÓN SUPERÓXIDO**

AUTOR(ES): Gabriela Petroselli, Andrés Thomas

CORREOS ELECTRÓNICOS DE LOS AUTORES: gpetroselli@inifta.unlp.edu.ar,
athomas@inifta.unlp.edu.ar

PALABRAS CLAVES: fotosensibilización, pterina, anión superóxido

Introducción

La radiación solar es un agente genotóxico y está involucrada en la producción de cáncer de piel.^{1,2} Las bases nucleicas pueden sufrir excitación directa por absorción de luz UV-C y UV-B ($\lambda < 320$ nm).³ Además la luz UV-A (320-400 nm) puede ser responsable de daños a las bases, a pesar de que no absorben a esa longitud de onda, a través de reacciones fotosensibilizadas.^{3,4} Estas pueden ocurrir mediante mecanismos de transferencia de un electrón (Tipo I) o por oxígeno singlete (Tipo II).⁵

En el presente trabajo se utiliza como sensibilizador a la molécula de pterina (PT). Las pterinas absorben luz UV-A y reaccionan con el oxígeno molecular produciendo oxígeno singlete, el cual es una especie altamente reactiva que puede causar daño a moléculas biológicas. En la figura 1 se muestran los espectros y las estructuras de PT y dGMP en sus distintas formas ácido-base. En trabajos previos se demostró que la PT es capaz de fotosensibilizar nucleótidos purínicos en soluciones acuosas.^{6,7} Adicionalmente, se probó que el mecanismo de fotosensibilización predominante depende del pH al que se estudia la reacción.

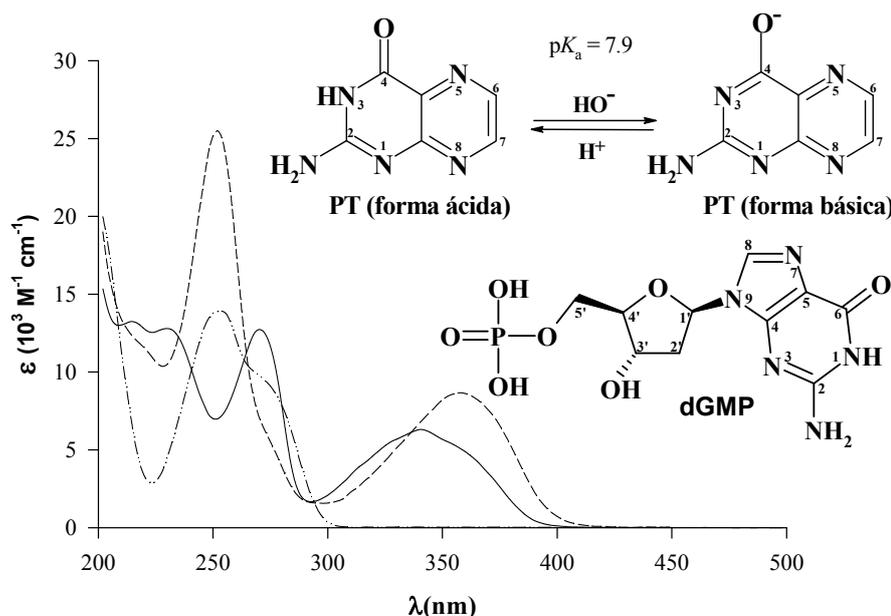


Figura 1: Espectros de absorción y estructura química de dGMP y PT. El espectro de la forma ácida de PT se muestra en líneas llenas, el espectro de la forma alcalina de PT en líneas intermitentes y el correspondiente a dGMP en líneas y puntos.

La formación de anión superóxido es muy frecuente en los procesos fotosensibilizados que ocurren mediante un mecanismo tipo I. Con el objetivo de investigar la participación de esta especie reactiva de oxígeno en el mecanismo de reacción, se realizaron experimentos de fotosensibilización en presencia de la enzima superóxido dismutasa. Esta enzima cataliza la conversión de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 y O_2 .

Objetivos

Estudiar la participación del anión superóxido en el mecanismo de fotosensibilización de 2'-deoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP) por pterina (PT) en solución acuosa en medio ácido y alcalino (pH= 5,5 y 10,5, respectivamente).

Materiales y métodos

Sustancias: se utilizó pterina (PT) (Schircks Laboratories), 2'-deoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP) (Sigma-Aldrich) y superóxido dismutasa (SOD) de eritrocitos bovinos (Sigma Chemical Co) de la máxima pureza disponible. El pH de las soluciones se ajustó adicionando gotas de HCl o NaOH con micropipeta.

Rol del anión superóxido: se irradiaron soluciones de PT (50 μ M) y dGMP (100 μ M) en presencia de SOD (260 U/ml) a pH 5,5 en celdas de cuarzo (b=1 cm) a temperatura ambiente. La irradiación se realizó con lámparas Rayonet RPR de emisión a 350 nm (Southern N.E. Ultraviolet Co.). Se realizaron controles: irradiación de solución sin SOD y fotólisis a 350 nm de SOD. También se estudió la reacción térmica entre los reactivos y SOD.

Análisis espectrofotométrico: los espectros UV-visible se registraron con un espectrofotómetro Cary 3 (Varian) utilizando celdas de cuarzo (b=1 cm).

Determinación de H₂O₂: se utilizó el kit de colesterol de Wiener. El H₂O₂ se cuantifica por el color que produce (absorbancia a 505 nm) al reaccionar con 4-aminofenazona y fenol.⁸

Análisis de productos: se utilizó un HPLC Shimadzu el cual consta de un detector UV-VIS de arreglos de diodos (rango 200 y 800 nm) y una bomba cuaternaria. Se utilizó una columna Pinnacle-II C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m; Restek) y como eluyente una solución de 4,2% de acetonitrilo y 95,8% de una solución acuosa 20 mM de fosfato de potasio (pH= 5,5).

Resultados y Discusión

En estudios anteriores⁷ se demostró que durante la reacción de fotosensibilización de dGMP por PT se produce H₂O₂. Para verificar si la formación de H₂O₂ proviene de la dismutación espontánea del anión superóxido (O₂⁻)⁹, se realizaron experimentos en presencia de SOD.

En medio ácido (donde el mecanismo predominante es Tipo I) se encontró que la velocidad de producción de H₂O₂ fue mayor en presencia de SOD (figura 2a, Inset). Por lo tanto, puede inferirse que el O₂⁻ se genera durante la reacción de fotosensibilización y participa en alguna etapa del mecanismo. Adicionalmente, se observó un aumento del consumo de dGMP cuando se adicionó SOD a la mezcla de reacción (figura 2a). El incremento en la velocidad de consumo de dGMP es pequeño, pero reproducible aún al variar la concentración inicial de dGMP.

Por otro lado, en medio alcalino la reacción de fotosensibilización ocurre principalmente por reacción del $^1\text{O}_2$ con dGMP (Tipo II).⁷ Sin embargo, no se ha descartado que existan en simultáneo otras reacciones competitivas, por ejemplo de transferencia de electrones. De hecho, las velocidades calculadas asumiendo que la reacción ocurre solamente por reacción del $^1\text{O}_2$ con dGMP, si bien tienen el mismo orden de magnitud, en todos los casos son menores que las experimentales. Por lo tanto se estudió el efecto del agregado de SOD a la muestra a irradiar.

Al igual que en medio ácido, se observó que la velocidad de producción de H_2O_2 fue mayor en presencia de SOD (figura 2b, Inset). El hecho de que la presencia de SOD afecte la distribución de productos, pone en evidencia que el anión superóxido está presente en el medio de reacción. Por el contrario, no se observaron cambios significativos en la velocidad de consumo de dGMP al adicionar SOD a la mezcla de reacción (figura 2b).

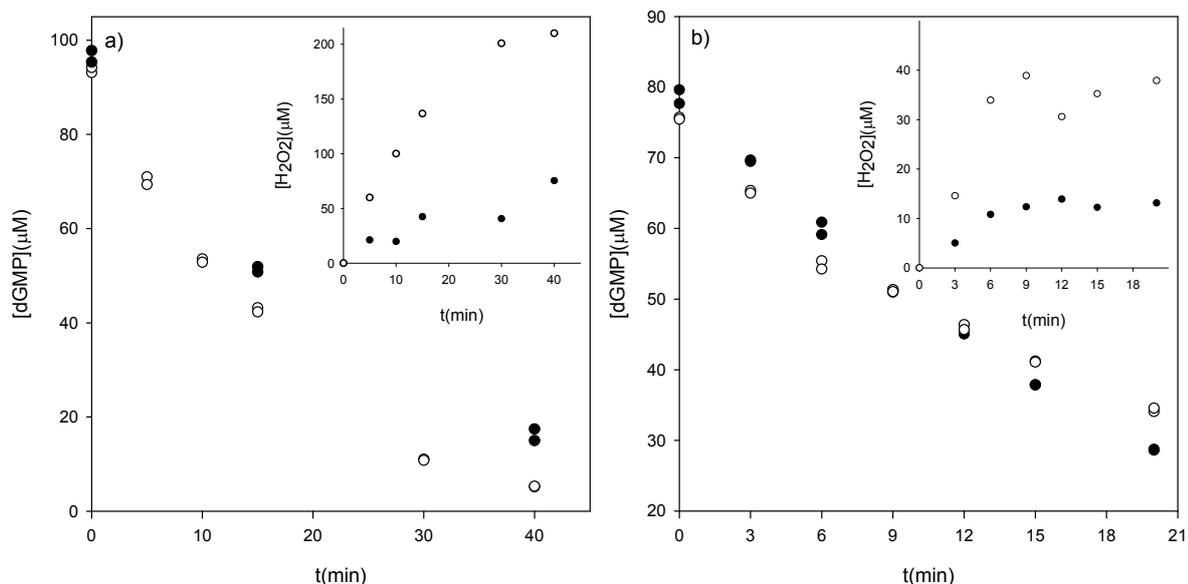
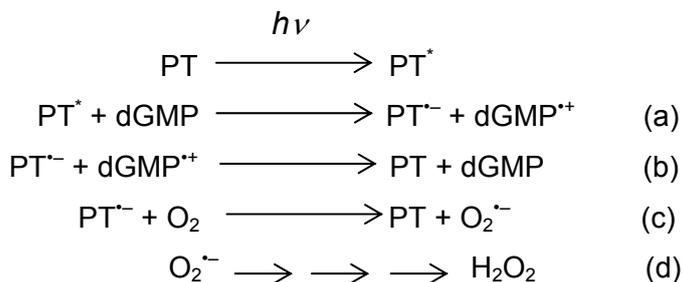


Figura 2: Evolución de la concentración de H_2O_2 y dGMP para soluciones de $[\text{PT}]=50 \mu\text{M}$ y $[\text{dGMP}]=80\text{-}100 \mu\text{M}$ irradiada a 350 nm en presencia (círculos llenos) o ausencia de SOD (círculos vacíos) a) a $\text{pH}=5,5$ b) a $\text{pH}=10,5$. Inset: Evolución de H_2O_2

Conclusiones

En base a los resultados expuestos anteriormente se plantea el siguiente mecanismo de transferencia de electrones (TIPO I): en primer lugar se produce una transferencia de electrones de la dGMP hacia la PT excitada generando el anión radical PT y el catión radical dGMP (reacción a). Estos radicales se recombinan (reacción b) o participan de una serie de reacciones. El anión radical PT puede transferirle un electrón al oxígeno molecular regenerando al estado fundamental de la PT y produciendo anión superóxido (reacción c).

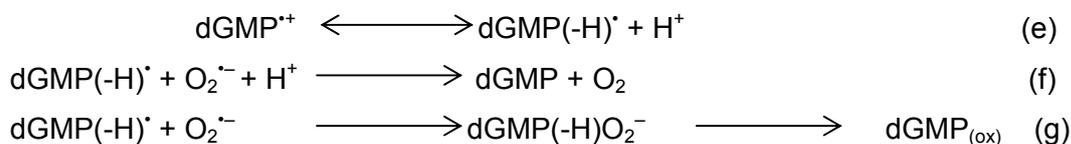
Este último junto con su ácido conjugado (HO_2^-) generan por desproporción H_2O_2 (reacción d), este proceso compite con la reacción f (*vide infra*).



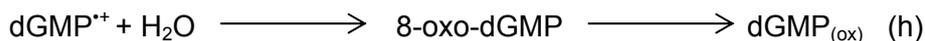
El radical catión dGMP por desprotonación genera el radical neutro correspondiente¹⁰ (reacción e). Este último radical y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ reaccionan rápidamente¹¹ a través de dos reacciones competitivas.¹²

- transferencia de electrones con la regeneración de dGMP y O_2 (reacción f)
- recombinación de radicales con la producción de productos de oxidación de dGMP (reacción g)

La oxidación de $\text{dGMP}(-\text{H})^{\cdot}$ por O_2 es muy lenta¹¹ y no contribuye significativamente a la formación de productos.



En presencia de SOD, que cataliza la reacción de desproporción del anión superóxido (reacción d), el único camino posible para regenerar dGMP se ve inhibido (reacción f). En consecuencia, se favorece la reacción de fotosensibilización de dGMP. Este razonamiento coincide con lo que se ha observado experimentalmente. Otros procesos más lentos también pueden estar involucrados en el mecanismo, por ejemplo, el radical $\text{dGMP}^{\cdot+}$ puede hidratarse dando 8-oxo-dGMP y otros productos de oxidación¹³ (reacción h). En menor medida, las dimerizaciones o las reacciones de radicales con H_2O_2 pueden contribuir también al consumo observado para dGMP.



Referencias

- (1) J. C. van der Leun, F. R. Gruijl de, *Photochem. Photobiol. Sci.* **1** (2002) 324
- (2) Y. Matsumura, H. N. Ananthaswamy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195** (2004) 298
- (3) J.-L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* **63** (2001) 88
- (4) J. Cadet, E. Sage, T. Douki, *Mutat. Res.* **571** (2005) 3
- (5) C. S. Foote, *Photochem. Photobiol.* **54** (1991) 659.
- (6) G. Petroselli, R. Erra-Balsells, F. M. Cabrerizo, C. Lorente, A. L. Capparelli, A. M. Braun, E. Oliveros, A. H. Thomas, *Org. Biomol. Chem.* **5** (2007) 2792