



**PROCESOS DE INTERÉS BIOMÉDICO Y AMBIENTAL
FOTOSENSIBILIZADOS POR COMPUESTOS
HETEROCÍCLICOS NATURALES**

Carolina Castaño, M. Laura Dántola, Andrés H. Thomas[♥] y Carolina Lorente.

División Cinética y fotoquímica

*Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Departamento de Química,
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, CCT La Plata CONICET. Casilla de
Correo 16, Sucursal 4, (1900), La Plata, Argentina*

Recibido el 4 de Marzo de 2013. Aceptado el 4 de Junio de 2013.

Abstract

Pterins, heterocyclic compounds widespread in biological systems, accumulate in the skin of patients suffering from vitiligo, a chronic depigmentation disorder. Pterins have been previously identified as good photosensitizers under UV-A irradiation. In this work, we have investigated the

[♥] Corresponding author: E-mail: athomas@inifta.unlp.edu.ar

ability of pterin (Ptr), the parent compound of oxidized pterins, to photosensitize the oxidation of tyrosine (Tyr) in aqueous solutions. Tyr is an important target in the study of the photodynamic effects of UV-A radiation because it is oxidized by singlet oxygen (1O_2) and plays a key role in polymerization and crosslinking of proteins. Steady UV-A irradiation of solutions containing Ptr and Tyr led to the consumption of Tyr and dissolved O_2 , whereas the Ptr concentration remained unchanged. Concomitantly, hydrogen peroxide (H_2O_2) was produced. By combining different analytical techniques, we could establish that the mechanism of the photosensitized process involves an electron transfer from Tyr to the triplet excited state of Ptr.

Key words: tyrosine, oxidation, photosensitization

Resumen

Las pterinas son compuestos heterocíclicos encontrados ampliamente en sistemas biológicos, se acumulan en la piel de pacientes que sufren de vitíligo, un trastorno crónico de despigmentación. Algunas pterinas han sido previamente identificadas como buenos fotosensibilizadores bajo irradiación UV-A. En este trabajo se investigó la capacidad de la pterina (Ptr) de fotosensibilizar la oxidación de la tirosina (Tyr) en soluciones acuosas. Tyr es una molécula importante en el estudio de los efectos fotodinámicos de radiación UV-A, ya que se oxida por oxígeno singlete (1O_2) y desempeña un papel clave en la polimerización de proteínas. La irradiación UV-A en estado estacionario de soluciones que contienen Ptr y Tyr mostró un consumo de Tyr y O_2 disueltos, mientras que la concentración Ptr permaneció sin cambios en el mismo periodo de tiempo; También se observó la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el mismo tiempo de fotólisis. Mediante la combinación de diferentes técnicas analíticas, se pudo establecer que el mecanismo del proceso fotosensibilizado implica una transferencia de electrones de la Tyr al estado excitado triplete de la Ptr.

Palabras clave: tirosina, oxidación, fotosensibilización, pterinas.

INTRODUCCIÓN

La exposición de algunos organismos a la radiación electromagnética desencadena procesos físicos y químicos, que pueden resultar beneficiosos o perjudiciales para la vida. Dichos procesos son variados e incluyen la simple captación de radiación, procesos fototóxicos en los cuales ocurren modificaciones químicas que ocasionan daño a un organismo, la terapia fotodinámica como aplicación para el tratamiento de tumores, etc. Muchos heterociclos naturales son fotoquímicamente activos y participan en diversos procesos fotosensibilizados de gran interés biológico y médico. Dichos procesos incluyen, entre otros, la absorción de la radiación por fotosensores biológicos, la fototoxicidad a través del daño fotosensibilizado del ácido desoxirribonucleico (ADN) y de otras biomoléculas, reacciones de descomposición para dar compuestos tóxicos y aplicaciones médicas como la terapia fotodinámica.

Existen básicamente dos grupos de mecanismos mediante los cuales la radiación electromagnética modifica o daña al ADN, las proteínas y sus componentes. Los procesos directos se inician con la absorción de fotones por los cromóforos de las macromoléculas: las bases nitrogenadas en el ADN y ciertos aminoácidos en el caso de las proteínas. Los estados electrónicamente excitados de estos componentes reaccionan generando cambios químicos que alteran la estructura de la macromolécula (1). Estos procesos ocurren normalmente con una frecuencia muy baja porque el tipo de radiación que absorben el ADN y las proteínas es filtrada en su mayor parte por la atmósfera.

Otros procesos fotoquímicos que dañan al ADN y otras macromoléculas son indirectos. En los mismos, un segundo compuesto, denominado fotosensibilizador o simplemente sensibilizador, es el que absorbe la radiación y se vuelve reactivo (2). La radiación UV-A (320-400 nm) y visible no es filtrada por la atmósfera y puede, por consiguiente, ser absorbida por diversos fotosensibilizadores. El fotosensibilizador excitado puede "atacar" a la macromolécula a través de

una serie de mecanismos, siendo los más importantes para el caso del ADN la transferencia de energía del sensibilizador al sustrato (3) y las oxidaciones fotosensibilizadas (4). Estas últimas pueden, a su vez, ocurrir a partir de la transferencia de electrones entre sensibilizador y sustrato (tipo I) o mediante la oxidación del sustrato por $^1\text{O}_2$ generado fotoquímicamente por el sensibilizador (tipo II). En los tejidos, las consecuencias de las reacciones fotosensibilizadas son muy variadas. La formación de mutaciones puede conducir a la proliferación sin control de la célula con la consiguiente generación de un proceso neoplásico en el tejido que la contiene. Por otro lado, la producción fotoquímica es una de las fuentes más importantes de generación de EROs en sistemas biológicos y, por ende, de estrés oxidativo.

Estos procesos adquieren particular importancia en individuos con enfermedades cutáneas que tienen un déficit de pigmentación, el principal mecanismo de protección contra la radiación electromagnética.

En la actualidad se sabe que varios grupos de compuestos heterocíclicos se comportan como fotosensibilizadores. Entre ellos se encuentran las porfirinas, las ftalocianinas, las flavinas, las lumazinas y las pterinas. Estos últimos compuestos son tetra-azo-naftalenos derivados de 2-amino-4-pteridinona. Las pterinas existentes en los sistemas biológicos presentan generalmente un sustituyente en la posición 6, cuya naturaleza química es muy variable (Figura 1): puede contener sólo un átomo de carbono, cadenas cortas hidrocarbonadas o una molécula de ácido *p*-amino-benzoico (pterinas conjugadas). Por otra parte, pueden encontrarse derivados pterínicos con el doble anillo parcialmente reducido. Los 7,8-dihidro y 5,6,7,8-tetrahidro derivados son importantes porque generalmente son los que poseen actividad biológica. Por último, las pterinas presentan varios equilibrios ácido-base, siendo el mostrado en la Figura 1b el más importante desde el punto de vista biológico.

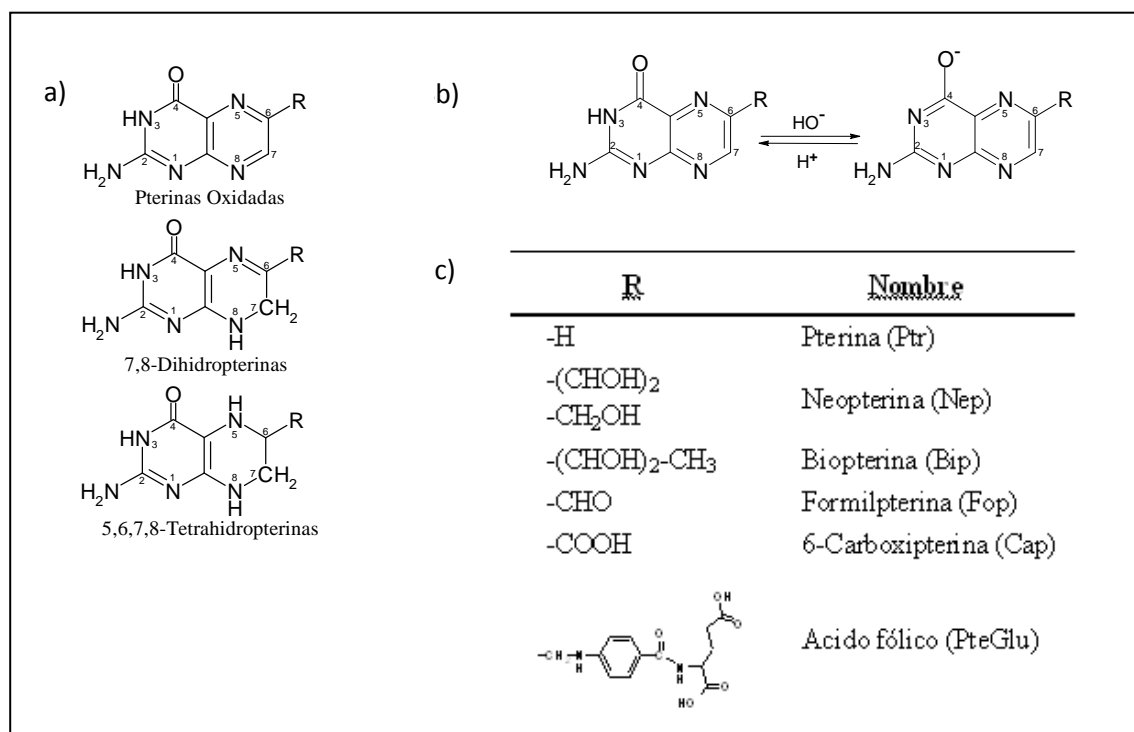


Figura 1. a) Estructura química general de pterinas oxidadas y reducidas. b) Equilibrio ácido-base en agua de pterinas oxidadas. c) Nombre de algunos derivados pterínicos de interés biológico,

En un trabajo reciente, se demostró que la Ptr es capaz de fotosensibilizar la oxidación del triptófano (Trp) en una solución acuosa (5). Actualmente, se acepta que la fotosensibilización de las proteínas se produce principalmente a través de las reacciones de $^1\text{O}_2$ (mecanismo tipo II) con triptófano, tirosina, histidina, metionina y cisteína (6). Sin embargo, la fotooxidación de Trp sugirió que el mecanismo principal implica un proceso de transferencia de electrones (mecanismo tipo I), en lugar de una oxidación a través de $^1\text{O}_2$. Estudios anteriores, llevados a cabo utilizando los nucleótidos de purina como molécula oxidable, indicaron que, aunque las pterinas son relativamente buenos fotosensibilizadores $^1\text{O}_2$, también pueden fotoinducir la oxidación de biomoléculas a través de procesos iniciados por transferencia de electrones (7).

Estos procesos fotosensibilizados pueden implicar la oxidación de sustratos tales como la tirosina por diferentes mecanismos. Los resultados obtenidos muestran la oxidación de la tirosina por fotosensibilización de pterina en medio ácido, ocurre a través de mecanismos de transferencia de electrones entre la tirosina y el estado triplete de la pterina.

MATERIALES Y MÉTODOS

La Pterina (pureza > 99%; Schircks Laboratorios, Suiza) y la tirosina (pureza > 99%, Sigma Chemical Co.) se usaron sin purificación después de la prueba de impurezas por HPLC. Metanol (MeOH) fue adquirido de J.T. Baker. Otros productos químicos fueron de Sigma Chemical Co. Las soluciones se preparan disolviendo Ptr y Tyr en agua. El valor final de pH de las soluciones se ajustó mediante la adición de gotas de soluciones de HCl o NaOH (0,1-0,2 M) con una micropipeta.

La irradiación continua de soluciones acuosas que contienen Ptr y Tyr (pH = 5,5-6,0) se realizó en celdas de cuarzo (1 cm de camino óptico) a temperatura ambiente. Lámpara Rayonet RPR emisión a 350 nm (ancho de banda 20 nm) (Sur N.E. Ultravioleta Co.) fue utilizado como fuente de radiación. Los experimentos se realizaron en presencia y en ausencia de O_2 disuelto.

Espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Las mediciones se realizaron utilizando celdas de cuarzo de 0,4 o 1 cm de longitud del camino óptico, en un rango de longitud de onda de 200-800nm. Los espectros de absorción de las soluciones eran registrada a intervalos de tiempo durante la irradiación.

Para la *cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)* se utilizó un equipo Shimadzu Prominente LC-20AT. Este equipo cuenta con un sistema de detección formado por un detector con arreglo de diodo UV/VIS (SPD-M20A, Shimadzu). Este sistema de detección permite hacer un monitoreo a todas las λ entre 200 y 800 nm. El equipo posee un software (LC solution) que permite registrar y analizar los espectros de absorción de cada uno de los productos. Una columna Synergy Polar-RP, Phenomenex se utilizó para la separación del fotosensibilizador, el sustrato y los productos. Como fase móvil se utilizó 100% Acetato de Amonio (ACNH_4) 10mM (pH = 6,5).

Para la *determinación de H_2O_2* , se utilizó un Kit Colesterol (Wiener Laboratorios SAIC). Se cuantificó después de la reacción con 4-aminofenazona y fenol (25,26). Brevemente se añadieron 500uL de la solución irradiada a 600uL de reactivo. La absorbancia a 505 nm de la mezcla resultante se midió después de 30 min a temperatura ambiente, utilizando el reactivo como un blanco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer objetivo de este trabajo era determinar si la pterina (Ptr) era capaz de fotoinducir la oxidación de Tirosina (Tyr) en soluciones acuosas, irradiando con luz UV-A. Por lo tanto soluciones que contiene Ptr y Tyr fueron expuestos a la radiación UV-A (350 nm) por diferentes períodos de tiempo. Los experimentos se realizaron en el rango de pH 5.5-6.0, donde Ptr está

presente en más del 99% en su forma ácida. Bajo estas condiciones experimentales sólo es excitada la Ptr, sin la posibilidad que le llegue luz al aminoácido.

Se observaron cambios en los espectros de absorción de las soluciones después de la irradiación, que muestra que los productos formados absorben a longitudes de onda mayores de 300nm. Los perfiles de concentración de Ptr y Tyr, se determinaron por HPLC, mostrando una disminución de la concentración de Tyr como una función del tiempo de irradiación, mientras que la concentración Ptr no cambió en el tiempo que duro el experimento. La concentración de agua oxigenada (H_2O_2) generada incrementó como una función del tiempo de irradiación. Sin embargo, su cambio inicial de producción era más pequeña que la que correspondea la velocidad inicial de consumo de Tyr.

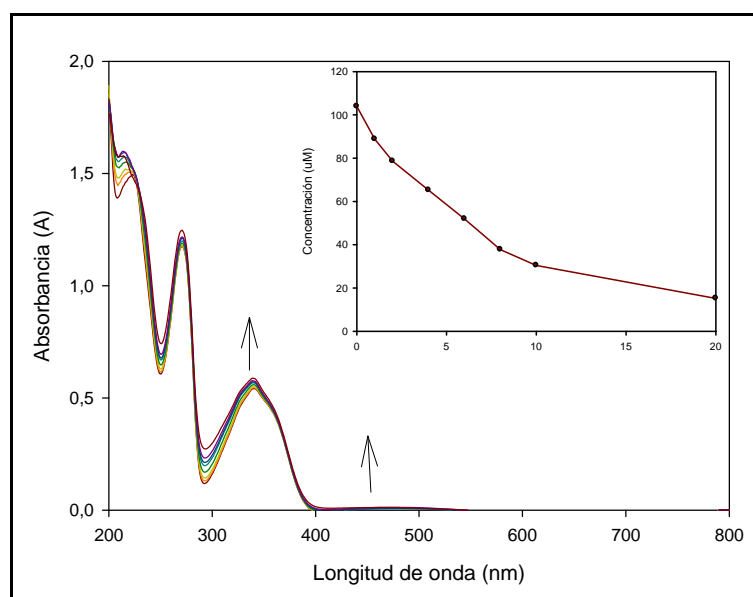


Figura 2. Cambios espectrales de una solución irradiada que contiene Tyr en presencia de Ptr. Las flechas indican los cambios observados en diferentes longitudes de onda. Recuadro: cambio en la concentración de Tyr, en solución acuosa bajo irradiación UV-A como función de tiempo.

Para confirmar que la reacción era una oxidación fotosensibilizada, se realizaron controles adicionales. No se observó degradación de la Tyr en soluciones que contienen Ptr y Tyr almacenadas en la oscuridad, excluyendo la posibilidad de reacciones térmicas. En otra serie de controles experimentales, Tyr (100 uM, pH = 5,5) se irradia con luz UV-A en ausencia de Ptr y no se detectó ningún consumo del aminoácido, Por lo tanto, los resultados presentados muestran claramente que la Ptr fotosensibiliza la oxidación de Tyr bajo irradiación UV-A en una solución acuosa.

Experimentos con un electrodo selectivo de O_2 , se usó para observar el consumo de la concentración de O_2 irradiando una solución que contenga Ptr (100uM) y Tyr (400uM) pH5,5. Se observó que el consumo de O_2 con una solución de Ptr sola es insignificante con respecto al observado cuando hay presencia de Ptr con Tyr. Este resultado da por entendido que el proceso observado en una solución irradiada en presencia de Ptr y Tyr es una oxidación foto inducida.

Con el fin de confirmar el mecanismo por el cual ocurre esta reacción, se realizaron experimentos de fotólisis comparativas en H₂O y D₂O. Teniendo en cuenta que el tiempo de vida ¹O₂ en D₂O es más largo que en H₂O (es decir, kd (H₂O) > kd (D₂O)) por un factor de aproximadamente 15 (8,9) la oxidación fotosensibilizada de Tyr debe ser más rápido en agua deuterada si el ¹O₂ contribuye significativamente al proceso.

Soluciones que contienen Ptr y Tyr en H₂O y D₂O a pH/pD 5.5 se irradiaron bajo las mismas condiciones. Los cambios de los espectros de absorción y de las concentraciones de Ptr y Tyr como una función del tiempo de irradiación muestran que el proceso de estudio no fue significativamente más rápido en D₂O que en H₂O. Por lo tanto la contribución de ¹O₂ se puede descartar,

Por lo tanto el mecanismo tipo I está presente en mayor proporción que el mecanismo tipo II en la reacción fotosensibilizada entre la Ptr y la Tyr. Debe ser considerado un mecanismo iniciado por una transferencia de electrones a partir del aminoácido al estado excitado triplete de la Ptr.

CONCLUSIONES

Se investigó la oxidación fotosensibilizada de Tyr por Ptr, en solución acuosa (pH = 5,5) bajo irradiación UV-A. Cuando las soluciones contiene Tyr y Ptr (pH = 5,5) fueron expuestas a la radiación UV-A, la concentración del aminoácido (Tyr) disminuyó, mientras que la concentración del fotosensibilizador (Ptr) no cambió. Durante este proceso, O₂ disuelto se consume y fue generada H₂O₂ en el tiempo de irradiación.

Los análisis de los mecanismos de reacción indican que la oxidación de Tyr no implica ¹O₂ como un producto intermedio, sino que procede a través de un proceso de iniciado por transferencia de electrones. En este mecanismo, la excitación de la Ptr es seguida por una transferencia de electrones desde el aminoácido al estado excitado triplete de la Ptr que conduce a la formación de los radicales de iones correspondientes (Ptr⁻ y Tyr⁺). En la siguiente paso, la Transferencia de electrones de Ptr⁻ al O₂ regenera la Ptr y se da la formación de anión superóxido (O₂⁻), que a su vez pueden llegar a generar su ácido conjugado (HO₂[·]) para formar H₂O₂ ó reaccionar con Tyr⁺ para regenerar Tyr.

REFERENCIAS

- [1] Ravanat J.-L.; Douki T.; Cadet J., *J. Photochem. Photobiol. B*, **2001**, *63*, 88
- [2] Cadet J.; Sage E.; Douki T., *Mutat., Res.*, **2005**, *571*, 3
- [3] Delatour T. *et al.*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1998**, *44*, 191
- [4] Foote C. S., *Photochem. Photobiol.*, **1991**, *54*, 659
- [5] Thomas, A. H.; M. P. Serrano; V. Rahal; P. Vicendo; C. Claparols; E. Oliveros and C. Lorente, Tryptophan oxidation photosensitized by pterin, in preparation. *J. Free Rad. Biomed.* DOI: 10.1016/2013.05.044
- [6] Pattison, D. I.; A. S. Rahmantoa and M. J. Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2012**, *11*, 38–53.
- [7] Lorente, C.; G. Petroselli; M. L. Dántola; E. Oliveros and A. H. Thomas *Pteridines.*, **2011**, *22*, 111–119.
- [8] Wilkinson F.; H. P. Helman and A. B. Ross, *Phys. Chem.*, **1995**, *24*, 663–677.
- [9] Ogilby P. R. and C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 3423–3430.
- [10] Neverov, K. V., E. A. Mironov, T. A. Lyudnikova, A. A. Krasnovsky Jr. and M. S. Kritsky *Biochemistry (Moscow)*, **1996**, *61*, 1149–1155.

-
- [11] Egorov, S. Y., A. A. Krasnovsky Jr., M. Y. Bashtanov, E. A. Mironov, T. A. Ludnikova and M. S. Kritsky *Biochemistry (Moscow)*, **1999**, *64*, 1117-1121.
- [12] Lorente, C. and A. H., *Acc. Chem. Res.*, **2006**, *39*, 395–402.
- [13] Oliveros, E., M. L. Dántola, M. Vignoni, A. H. Thomas and C. Lorente., *Pure Appl. Chem.*, **2011**, *83*, 801–811.
- [14] Serrano, M. P., C. Lorente, F. E. MoránVieyra, C. D. Borsarelli and A. H. Thomas, *Phys. Chem., Chem. Phys.*, **2012**, *14*, 11657–11665.
- [15] Ziegler, I. *Med. Res. Rev.*, **1990**, *10*, 95–114.
- [16] Schallreuter, K. U., J. M. Wood, M. R. Pittelkow, M. Gütlich, K. R. Lemke, W. Rödl, N. N. Zwanson, K. Hitzemann and I. Ziegler, *Science*, **1994**, *263*, 1444–1448.