

## OXIDACIÓN DE HISTIDINA FOTOSENSIBILIZADA POR PTERINA: MECANISMO DEPENDIENTE DEL pH

Carolina Castaño<sup>1</sup>; Andrés H. Thomas<sup>1</sup>; Carolina Lorente<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Físicoquímica Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Dpto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Calle 64 Diag. 113, CP (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

[dccastan1@gmail.com](mailto:dccastan1@gmail.com)

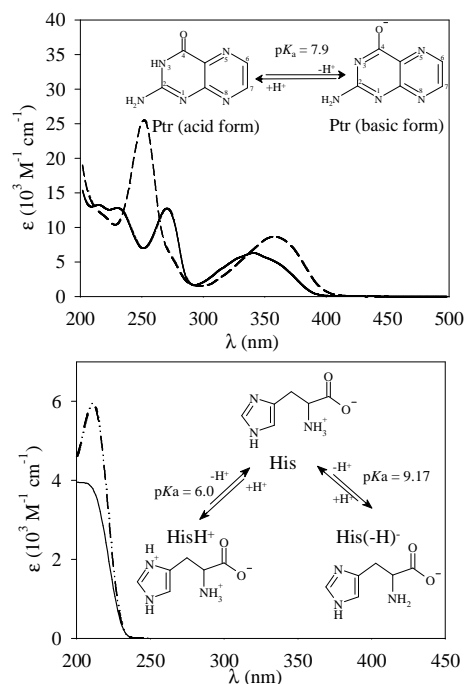
Las Pterinas son compuestos heterocíclicos que se encuentran en sistemas biológicos, se acumulan en la piel de pacientes que sufren vitiligo, un desorden de despigmentación crónica. En este trabajo, se investigó la habilidad de la Ptr, el compuesto principal de las pterinas oxidadas, de fotosensibilizar la oxidación de la histidina en solución acuosa bajo irradiación UV-A. La histidina es un aminoácido con un grupo imidazol, y está frecuentemente presente en los sitios activos de las enzimas. El resultado más importante en la dependencia de pH es la competencia ente los mecanismos de transferencia de electrones (Tipo I) y transferencia de energía (Tipo II). Por combinación de diferentes técnicas se estableció que el mecanismo Tipo I predomina a pH ácido, aunque el mecanismo Tipo II está presente pero es más predominante en medio alcalino.

**PALABRAS CLAVE:** Pterina, Fotosensibilización, Histidina

Las proteínas son moléculas sensibles al daño oxidativo y cada residuo de aminoácido es oxidado a diferentes velocidades dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas. La oxidación de aminoácidos mediante radiación ocurre a través de dos mecanismos: (i) absorción de radiación UV-B por el residuo del aminoácido y posteriormente la reacción de sus estados excitados, y (ii) absorción de radiación UV-A y/o visible por sensibilizadores endógenos (tales como flavinas, porfirinas, pterinas) ó exógenos, que posean un tiempo de vida largo de sus estados excitados [1]. En éste mecanismo, el estado excitado del sensibilizador puede reaccionar con moléculas biológicas por transferencia de electrones o procesos de abstracción de hidrógeno (mecanismo Tipo I) ó transferencia de energía al oxígeno generando oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$  ( $^1\Delta_g$ ) denotado como  $^1\text{O}_2$ ) (mecanismo Tipo II) [2].

Las pterinas son un amplio grupo de compuestos heterocíclicos, que pueden actuar como fotosensibilizadores y tienen una función fundamental en la síntesis de la melanina [3], el pigmento responsable de la protección de la piel contra la radiación UV. Estos compuestos pueden encontrarse en diferentes estados de oxidación, siendo las pterinas reducidas las biológicamente activas. Las pterinas más oxidadas no juegan una función biológica en la piel, pero se acumulan en estos tejidos bajo condiciones patológicas, como, por ejemplo, en el caso de la enfermedad del vitiligo [3]. Las pterinas oxidadas son conocidas como sensibilizadores bajo radiación UV-A [4], y pueden actuar a través de mecanismos tipo I [5] y/o tipo II [6].

La Histidina (His) es un aminoácido de origen natural, que contiene un heterociclo aromático, imidazol, en su cadena lateral. Este aminoácido en solución acuosa tiene tres formas ácido base, una forma protonada ( $\text{HisH}^+$ ), una forma neutra ( $\text{His}$ ) y una forma aniónica ( $\text{His}(-\text{H})^-$ ), con pKa de 6.0 y 9.17 (Figura 1) [7]. En la forma neutra de la His, el anillo imidazol no está protonado, la carga neta es cero pero se encuentra en la forma zwitterionica donde el carboxilo y el grupo amino de aminoácido se encuentran desprotonado ( $-\text{COO}^-$ ) y protonado ( $-\text{N}^+\text{H}_3$ ), respectivamente [7].



**Figura 1.** Estructura molecular de pterina e histidina, y el correspondiente espectro de absorción en solución acuosa; línea sólida: pH= 5.5; línea punteada: pH=10.5

En el presente trabajo se presenta la degradación de la His en presencia de pterina (Ptr) bajo irradiación UV-A (350nm) en solución acuosa y en diferentes condiciones de pH. Los experimentos se realizaron a pH 5.5 y 10.5, de modo que más del 99% de la Ptr esté presente en su forma acida y alcalina respectivamente [8]. En el caso de la His se presenta una mezcla de la formas His y  $\text{HisH}^+$  a pH 5.5, y a pH 10.5 como  $\text{His}(-\text{H})^-$ . Las soluciones fueron irradiadas en solución acuosa en celdas de cuarzo de 1cm de paso óptico a temperatura ambiente con una lámpara Rayonet RPR3500 con una emisión centrada a 350 nm a una distancia que varía entre 0 y 2 cm.

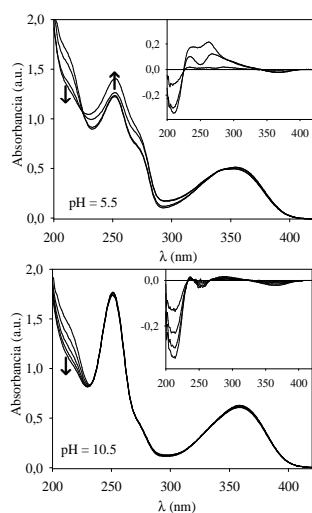
Las medidas se analizaron por:

**Espectrofotometría UV-Vis:** se midieron los espectros en un equipo Shimadzu UV-1800.

**Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Shimadzu LC20AT:** posee un detector de arreglo de diodos para la cuantificación de los reactivos y productos, se utilizó una columna Synergy Polar-RP (150 x 4.6mm, 5 $\mu$ m; phenomenex), y como fase móvil NH<sub>4</sub>NAc.

**Detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** se determinó por la reacción con 4-aminofenazona y fenol catalizada por la enzima peroxidasa en la cual se forma un producto que es detectado por absorbancia en el rango visible a 505nm.

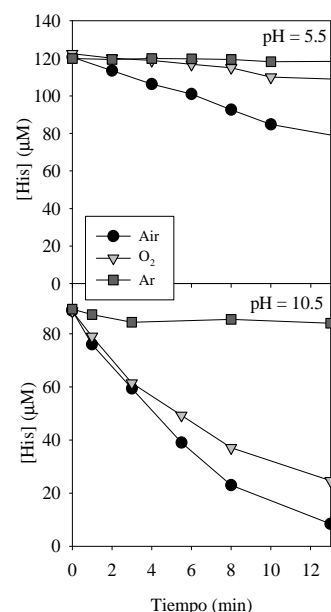
Soluciones que contienen Ptr (~100 $\mu$ M) e His (~100 $\mu$ M) se expusieron a radiación UV-A (350nm) por diferentes periodos de tiempo. La reacción fue monitoreada por espectrofotometría y la concentración de His y Ptr se determinó por HPLC. En ambos medios (ácido y alcalino), se observaron cambios en los espectros de absorción de las soluciones (Figura 2), indicando así que ocurren cambios químicos como consecuencia de la irradiación.



**Figura 2.** Evolución de los espectros de absorción de soluciones aireadas de His en presencia de Ptr, como función del tiempo de irradiación a pH 5.5 (0, 5, 20 y 35 min) y a pH 10.5 (0, 5, 10, 15 y 20 min). Las flechas indican los cambios observados a las diferentes longitudes de onda. Inset espectros diferencia

Para ambas condiciones de pH, un decrecimiento de la concentración de His fue observada durante la irradiación (Figura 3), mientras que la concentración de Ptr se mantuvo constante durante el tiempo del experimento. Cuando las soluciones fueron burbujeadas con Ar, no se observaron cambios significantes en el espectro de absorción de las soluciones después de 30min de irradiación en ambas condiciones de pH. La concentración de His, determinada por HPLC, se mantiene constante y no se observan productos (Figura 3). En soluciones saturadas de O<sub>2</sub>, la velocidad de consumo de la His fue casi insignificante en medio ácido, comparado con el consumo en las soluciones aireadas al mismo pH (Figura 3). Dado que el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> es formado por transferencia de energía del estado excitado triplete de sensibilizador (<sup>3</sup>Ptr\*) al oxígeno disuelto O<sub>2</sub>, un aumento en la concentración de O<sub>2</sub> en la solución, no debería ocasionar un aumento en la velocidad de consumo de His si la degradación es consecuencia de una reacción con <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, dado que el rendimiento cuántico de producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> es el mismo en soluciones

aireadas y saturadas en O<sub>2</sub>. Sin embargo, la disminución en la velocidad de consumo de His en soluciones saturadas de O<sub>2</sub>, indica que la reacción entre el aminoácido y <sup>1</sup>O<sub>2</sub> no es el mecanismo que predomina a pH 5.5. En medio alcalino, sin embargo, las velocidades son comparables en aire y O<sub>2</sub>, lo que sugiere que el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> podría tener un papel predominante en la degradación de His.



**Figura 3.** Evolución de la concentración de His en soluciones acuosas aireadas, Ar y saturadas en O<sub>2</sub> bajo irradiación UV-A (350nm) como una función del tiempo de irradiación a pH 5.5 y 10.5, determinada por HPLC. [Ptr]<sub>0</sub> ~ 100 $\mu$ M y [His]<sub>0</sub> ~ 100 $\mu$ M

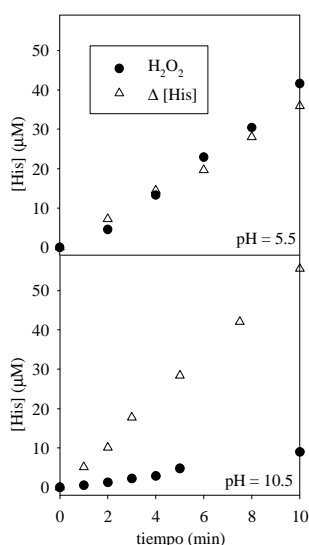
Se realizaron controles en los cuales se descartó la existencia de reacciones térmicas entre Ptr y His, para lo cual se controló la evolución de las concentraciones en soluciones que se mantuvieron en la oscuridad. Por otra parte, no se detectaron modificaciones químicas del aminoácido cuando fue irradiado a 350nm en ausencia de Ptr, excluyendo algún efecto de la radiación UV-A.

Con estos resultados se puede concluir que bajo estas condiciones experimentales, la Ptr es capaz de generar cambios químicos fotosensibilizados en la His bajo irradiación UV-A. Considerando resultados previamente reportados en literatura, es la primera vez que se demuestra una fotodegradación dependiente del pH para una reacción fotosensibilizada entre His y Ptr.

Adicionalmente, se detectó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como producto de reacción en las soluciones irradiadas, y que su concentración se incrementa con el tiempo de irradiación. Sin embargo, a pH 5.5 la velocidad inicial de producción fue igual dentro del error experimental a la velocidad inicial de consumo de His, mientras a pH 10.5 la velocidad de producción es muy inferior al consumo de His (Figura 4).

Para elucidar el rol que cumple el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en el mecanismo de oxidación de His se realizaron experimentos en D<sub>2</sub>O, solvente en el cual el tiempo de vida ( $\tau_{1}$ ) del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> es mucho mayor en H<sub>2</sub>O (60 $\mu$ s y 4 $\mu$ s, respectivamente). El experimento muestra que la velocidad correspondiente al consumo de His en ambos medios es más alta en D<sub>2</sub>O, siendo significativamente mayor en medio alcalino. Considerando los valores previamente reportados de las constantes de quenching total ( $k_T$ ) de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> por His, y asumiendo que el quenching observado es debido exclusivamente a la reacción química

entre el  $^1O_2$  y His ( $k_r \sim k_{tr}$ ), se calculó la velocidad de reacción y se comparó con la velocidad experimental. En la Tabla 1 se presentan las velocidades experimentales y calculadas. Se puede observar que a pH 5.5 el principal mecanismo de degradación de His fotosensibilizada por Ptr no es  $^1O_2$ , sin embargo, en solución alcalina juega un rol fundamental en la oxidación de His.

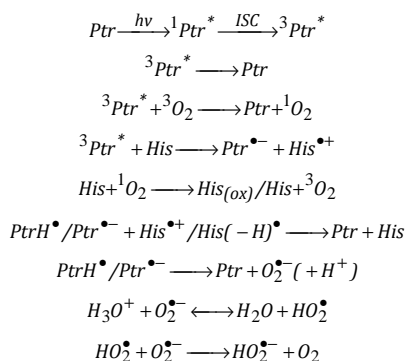


**Figura 4.** Evolución de la concentración de  $H_2O_2$  y consumo de His ( $\Delta[His] = [His]_0 - [His]_t$ ) en soluciones acuosas bajo irradiación UV-A (350nm) como una función del tiempo de irradiación a pH 5.5 y 10.5,  $[Ptr]_0 \sim 100\mu M$  y  $[His]_0 \sim 100\mu M$

Tabla 1. Velocidades de consumo experimentales y calculadas de histidina durante la irradiación de Ptr (100  $\mu M$ ) en soluciones acuosas aireadas (velocidades iniciales calculadas teniendo en cuenta la reacción entre el  $^1O_2$  y His)

Solvente	$P_0$	Velocidad Experimental $-(d[His]/dt)_0$	Velocidad Calculada $-(d[His]/dt)_0$ (reacción con $^1O_2$ )
$H_2O$ , pH 5.5	$1.40 \cdot 10^{-5}$ einstein $L^{-1} s^{-1}$	$-0.10 \mu M s^{-1}$	$-0.0031 \mu M s^{-1}$
$D_2O$ , pD 5.5		$-0.21 \mu M s^{-1}$	$-0.051 \mu M s^{-1}$
$H_2O$ , pH 10.5		$-0.20 \mu M s^{-1}$	$-0.11 \mu M s^{-1}$
$D_2O$ , pD 10.5		$-1.57 \mu M s^{-1}$	$-1.13 \mu M s^{-1}$
$H_2O$ , pH 10.5	$9.8 \cdot 10^{-6}$ einstein $L^{-1} s^{-1}$	$-0.038 \mu M s^{-1}$	$-0.082 \mu M s^{-1}$
$D_2O$ , pD 10.5		$-0.67 \mu M s^{-1}$	$-0.57 \mu M s^{-1}$

Con todos los resultados obtenidos se puede plantear el siguiente mecanismo de reacción, en donde se muestran los principales pasos de la degradación de His fotosensibilizada por Ptr :



**Esquema 1.** Mecanismo para reacción que ocurre por la reacción fotosensibilizada entre la Ptr e His

Basado en los resultados y en el análisis del mecanismo propuesto, se puede concluir que ocurre una transferencia de electrones de histidina a pterina (mecanismo Tipo I) bajo irradiación UV-A. En solución ácida (pH

5,5), el mecanismo predominante es una oxidación Tipo I, y la participación del  $^1O_2$  es despreciable. En solución alcalina (pH 10.5), ambos tipos de mecanismos, Tipo I y Tipo II, compiten en la degradación de His.

#### Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnica (CONICET-proyecto PIP 0425) y la Universidad Nacional de La Plata (UNLP-proyecto X586). Los autores agradecen al *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS) y CONICET por la colaboración a través de Programa de Cooperación Científica (CONICET-CNRS/PICS 05920).

#### Referencias

- [1] D.I. Pattison, A. S. Rahmanto, M. J., Davies, "Photo-oxidation of proteins". *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, **2012**, 38-53
- [2] C. S. Foote, "Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation". *Photochem. Photobiol.* 54, **1991**, 659.
- [3] K.U. Schallreuter, J.M. Wood, M.R. Pittelkow, M. Gütlich, K.R. Lemke, "Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin". *Science* 263, **1994**, 1444-1446.
- [4] C. Lorente, A. H., Thomas "Photophysics and Photochemistry of Pterins in Aqueous Solution", *Acc. Chem. Res.* 39, **2006**, 395-402.
- [5] C. Lorente, G. Petroselli, M.L. Dántola, E. Oliveros, A.H. Thomas "Electron Transfer Initiated Reactions Photoinduced by Pterins", *Pteridines.* 22, **2011**, 111-119.
- [6] 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.
- [7] M.S. Panov, N.N. Saprygina, O.B. Morozova, A.S. Kiryutin, Y.A. Grishin A.V. Yurkovskaya "Photooxidation of Histidine by 3,3',4,4'-Benzophenone Tetracarboxylic Acid in Aqueous Solution: Time-Resolved and Field-Dependent CIDNP Study", *Appl Magn Reson* 45, **2014**, 1019-1033.
- [8] V.D. Monópoli, A.H. Thomas and A.L. Capparelli, "Kinetics and equilibrium study of nickel(II) complexation by pterin and 6-carboxypterin", *Int. J. Chem. Kinet.* 32, **2000**, 231-237.