

## PROPIEDADES FOTOSENSIBILIZADORAS DE $\beta$ -CARBOLINAS: DAÑO AL ADN EN CONDICIONES INTRA- Y EXTRA-CELULARES

Franco M. Cabrerizo <sup>a,\*</sup>, M. Micaela Gonzalez <sup>a</sup>, Mariana Vignoni <sup>b</sup>,  
M. Paula Denofrio <sup>a</sup> y Rosa Erra-Balsells <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Intendente Marino Km 8.2, CC 164, (B7130IWA) Chascomús, Argentina.

Email: [fcabrerizo@intech.gov.ar](mailto:fcabrerizo@intech.gov.ar)

<sup>b</sup> INIFTA –CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, calle 47 y 115 (1900) La Plata, Argentina.

<sup>c</sup> CIHIDECAR - CONICET, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pabellón 2, 3p, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina.

### Resumen

En este trabajo se presenta un análisis comparativo de la capacidad que muestran ciertas  $\beta$ -carbolinas ( $\beta$ Cs) de inducir daño fotosensibilizado en el ADN. Para ello se realizó un análisis cinético y se caracterizaron los fotoproductos formados. Se compararon los perfiles de daño observados en condiciones extra- e intracelulares y se evaluó el potencial genotóxico de estos alcaloides sobre células eucariotas. Los datos aquí recopilados muestran que las  $\beta$ Cs actúan como fotosensibilizadores en células mamíferas.

*Palabras clave:* alcaloides; pirido-indoles; foto-oxidación; dímeros de pirimidina; fotosensibilización; especies reactivas del oxígeno.

### Abstract

Photosensitizing properties of  $\beta$ -carboline: DNA damage in intra- and extra-cellular conditions. In this work, a comparative analysis of the capability of some  $\beta$ -carboline ( $\beta$ Cs) to induce damage on DNA upon UVA excitation is shown. A kinetic analysis was performed and the photoproducts generated were characterized. Damage profiles observed under extra- and intracellular conditions were compared and the genotoxic potential of these alkaloids on eukaryotic cells is also evaluated. Data indicate that  $\beta$ -carboline act as photosensitizers in mammalian cells.

*Keywords:* alkaloids; pyrido-indols; photo-oxidation; pyrimidine dimmers; photosensitization; reactive oxygen species.

## 1. Introducción

Las  $\beta$ -carbolinas ( $\beta$ Cs) son un grupo de alcaloides cuya presencia ha sido confirmada en una gran diversidad de grupos de organismos filogenéticamente distantes entre sí, tales como: *Rhizaria*, *Alveolata* y *Amoebozoa*, grupos compuestos por organismos protistas, y *Stramenopiles* [1], que incluye organismos como diatomeas unicelulares y algas pardas

pluricelulares. Otros de los grupos de organismos donde se ha confirmado su presencia son *Opisthokonta* (clado de organismos que incluye a coanozoos, hongos y animales) [2-9], *Archaeplastida* (incluye a las algas verdes, rojas y plantas terrestres) [10-14], *Urochordata* (ascidias) [15,16] y *Arthropoda* (incluye insectos, arácnidos, etc.) [17,18].

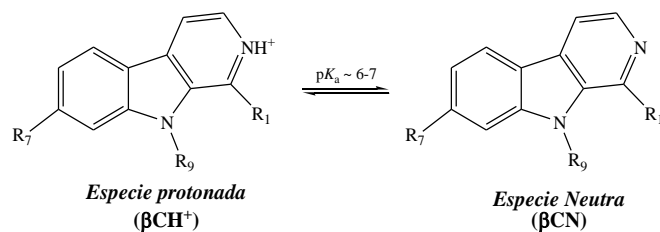
En humanos, la formación de  $\beta$ Cs endógenas está asociada con la condensación de Pictet-Spengler entre indolaminas (por ejemplo, serotonina) y acetaldehído derivado de la ingestión del alcohol [7,19]. La presencia de las  $\beta$ Cs aromáticas en mamíferos se debería a la oxidación de las 1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ Cs (t-h $\beta$ Cs) por hemo-peroxidasa [20]. Consecuentemente, estos compuestos forman parte constitutiva de órganos, tejidos y fluidos corporales [2-6,8]. Por ejemplo, se describió en orina y leche materna humana la presencia de cantidades de t-h $\beta$ Cs entre 10 y 700 ng/ml. Además, experimentos realizados con lactantes, sugieren que una fracción de las t-h $\beta$ Cs halladas en orina es sintetizada posiblemente por bacterias intestinales [3]. Los niveles basales hallados en los distintos fluidos biológicos varían, considerablemente, dependiendo del tipo de dieta, características medioambientales y hábitos de consumo [4,8]. Así, las  $\beta$ Cs son, también, incorporadas de manera exógena a través de los alimentos y bebidas. Estos alcaloides también están presentes en el humo del cigarrillo y en comidas cocidas ricas en proteínas, lo que refleja su formación por pirólisis a partir del triptófano [21,22].

Dependiendo de su estructura química, las  $\beta$ Cs presentan diferentes funciones biológicas y/o acción bioquímica: antiespasmódicos, sedativos [23], inhibidores enzimáticos (monoamino oxidasa), anticonvulsivantes, ansiolíticos [24,25], antimicrobianos y, en particular, antiparasitarios [26].

Bajo irradiación con luz UVA o visible, algunas  $\beta$ Cs han demostrado ser fotoactivas. En plantas, las  $\beta$ Cs tendrían cierta participación en los mecanismos de defensa, mediados por acción fototóxica contra insectos, gusanos, bacterias, virus y otros agentes invasores [14,27]. Además, se demostró que la capacidad antimicrobiana de estas drogas se incrementa por acción de la radiación UVA (320-400 nm) [28,29]. Por otra parte, ciertos derivados inician procesos fotosensibilizados que causan daños al ADN y sus componentes [30,31]. Por ejemplo, bajo irradiación UVA, *nor*harmano (nHo) y harmano (Ho) pueden causar daño en los cromosomas de células eucariotas [32-34].

En los últimos años se han desarrollado numerosas investigaciones que documentan el envejecimiento y/o muerte celular junto con el desarrollo de tumores y otras patologías asociadas, inducido por la radiación UVA/visible (componente mayoritario de la radiación solar que alcanza la superficie terrestre). En este tipo de procesos, algunos compuestos intracelulares juegan un rol central actuando como fotosensibilizadores endógenos. La absorción de la radiación por parte del fotosensibilizador da lugar a la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), radicales libres u otros fotoproductos tóxicos originando, consecuentemente, daño celular oxidativo. Sin embargo, probablemente debido a la complejidad de los fotosensibilizadores endógenos (en relación a la estructura molecular, vías de formación, mecanismos de acción, etc.), se ha subestimado su importancia en el daño en el tejido vivo.

En este contexto, las  $\beta$ Cs y sus derivados deben ser consideradas como potenciales agentes endógenos y/o exógenos de generación de daño fotosensibilizado. En este trabajo se presentan los principales resultados obtenidos en relación al estudio y evaluación, *in vitro*, de la capacidad fotosensibilizadora de un pequeño grupo de derivados de  $\beta$ Cs (Esquema 1).



Nombre (abreviatura)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>9</sub>
<i>nor</i> Harmano (nHo)	-H	-H	-H	-H
9-Metil- <i>nor</i> Harmano (9-Me-nHo)	-H	-H	-H	0
Harmano (Ho)	0	-H	-H	-H
9-Metil-Harmano (9-Me-Ho)	0	-H	-H	0
Harmina (Ha)	0	-H	0	-H
9-Metil-Harmina (9-Me-Ha)	0	-H	0	0

Esquema 1. Estructura química de las  $\beta$ Cs investigadas en este trabajo. Se representa, además, el único equilibrio ácido-base que tiene lugar en solución acuosa, en el intervalo de pH comprendido entre 3 y 11.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. General

2.1.1.  $\beta$ -Carbolinas. nHo, Ho y Ha (*Sigma-Aldrich*), con una pureza superior al 98 %, por lo cual se utilizaron sin posterior purificación. 9-Me-nHo y 9-Me-Ho sintetizados y purificados siguiendo los protocolos previamente publicados en la literatura [35].

2.1.2. ADN. Los estudios cinéticos de fotosensibilización se realizaron usando el plásmido *pGEM-3z*, de 2743 pares de bases (pb) (Lab. Promega). El plásmido se propagó en *Escherichia coli* JM109 y se purificó luego de 12 horas de crecimiento utilizando el *kit* comercial *Plasmid Maxi kit* (*Qiagen*). Luego de eliminar los lisados bacterianos por centrifugación, se colocó el sobrenadante en una columna de intercambio aniónico en la que el ADN plasmídico se une selectivamente en condiciones de bajo pH y baja salinidad. Se removió el ARN, proteínas, metabolitos y otras impurezas de bajo peso molecular por elución con un *buffer* de salinidad intermedia y, finalmente, se obtuvo el plásmido ultrapuro eluyendo con un *buffer* de alta salinidad. La remoción de sales y la concentración del ADN se realizaron por precipitación con isopropanol y posterior centrifugación. El grado de pureza del extracto de ADN se estimó a partir del cociente  $A_{260}/A_{280}$ . Para el ADN doble hebra en soluciones de alta pureza se espera una relación  $\geq 1,8$ . Todos los extractos obtenidos en este trabajo arrojaron valores comprendidos entre 1,90 y 1,99, indicando la presencia de escaso contenido residual de proteínas.

En el caso del análisis de los fotoproductos, se utilizó el bacteriófago PM2, de 10000 pb, provisto por el Dr. Epe (Universidad de Mainz, Alemania).

2.1.3. Enzimas. Endonucleasa de restricción *EcoRI* (*Invitrogen*), SOD (*Sigma*), catalasa (*Sigma*). La formamidopirimidina ADN glicosilasa (proteína *Fpg*) [36] se aisló de *E. coli* (cepa

JM105) conteniendo el plásmido pFPG230. Las enzimas *Endonucleasa IV* y *T4 endonucleasa V* fueron parcialmente purificadas desde un superproductor inducible (cepa de *E. coli* 32480, que contiene el plásmido ptac-denV) provisto por L. Mullenders, Leiden. Todas las endonucleasas de reparación fueron testeadas sobre modificaciones de referencia (timina glicoles inducidos por OsO<sub>4</sub>, sitios apurínicos formados en condiciones de bajo pH y dímeros de pirimidina obtenidos por irradiación con luz UV de 254 nm) utilizando las mismas condiciones aplicadas en los ensayos, para asegurar que las modificaciones correctas sean reconocidas y que no tengan lugar incisiones en lugares sin modificaciones [37].

**2.1.4. Otros reactivos utilizados. Reactivos para buffers:** Tris, Tris-HCl, ácido bórico, EDTA, glicerol, azul de bromofenol, fosfato monobásico de potasio (*Sigma*), acetato de sodio, ácido acético, hidróxido de potasio (*Sigma-Aldrich*). Para el revelado de las electroforesis se utilizó bromuro de etidio (*Sigma*). En los estudios con secuestradores de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) se utilizaron alcohol furfurílico (*Riedel-de Haën*) e isoporpanol (*Merk*).

**2.1.5. Ajuste de pH.** Se ajustó el pH de las soluciones acuosas de βCs mediante el agregado de microgotas de soluciones acuosas de NaOH o HCl, (de concentraciones entre 0,1 y 2,0 M). En los experimentos en los que se utilizó D<sub>2</sub>O, los reactivos empleados fueron D<sub>2</sub>O (> 99,9 %; *Sigma*), DCl (99,5 %; *Aldrich*) y NaOD (*Aldrich*) en D<sub>2</sub>O. Las medidas de pH se realizaron con un pH-metro PHM220 (*Radiometer Copenhagen*) en combinación con un electrodo de pH *Accumet*. El cálculo de pD se realizó utilizando la ecuación  $pD = pH + 0,4$  [38]. En todos los casos, la fuerza iónica fue  $\sim 10^{-3}$  M.

## 2.2. Fotosensibilización de ADN extracelular: análisis cinético

**2.2.1. Irradiación.** Se utilizó una lámpara *Rayonet RPR 3500 A* ( $\lambda^{\max}_{\text{emisión}} 350 \pm 15$  nm, *Southern N.E. Ultraviolet Co.*) (Sistema de irradiación I) [39]. Se irradiaron soluciones acuosas del fotosensibilizador y la molécula blanco (ADN plasmídico, de concentración 15,5 µg/ml) en presencia de aire y con agitación, en celdas de cuarzo de 0,4 cm de camino óptico a temperatura ambiente. Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando soluciones de fotosensibilizador de igual absorbancia a 350 nm ( $A = 0,3$ ).

**2.2.2. Análisis electroforético del clivaje fotosensibilizado del plásmido pGEM-3z.** Luego de su exposición a la luz durante diferentes intervalos de tiempo, se tomaron 10 µl de muestra a los cuales se le agregaron 2 µl de *buffer* de carga (Tris 0,04 M, acetato 0,02 M, EDTA 1 mM, 0,25 % azul de bromofenol, 30 % glicerol, pH 7,2). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, en *buffer* TBE (Tris 0,05 M; ácido bórico 0,05 M; EDTA 1 mM). Las bandas de ADN se observaron a través de transiluminación UV (*Hoefler MacroVue UV-20*) con previa tinción de los geles con solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Los geles se fotografiaron con una cámara de fotos digital KD120 (*Kodak*) y la intensidad de las bandas se integró usando el software *Kodak Dig. Sci. 1D* (*Kodak*). Con el objeto de comparar diferentes calles del mismo o diferentes geles, se llevó a cabo un proceso de normalización. Brevemente, la intensidad de cada banda se dividió por la suma de las intensidades de todas las bandas presentes en la misma columna [40]. También se tuvo en cuenta la menor intercalación del bromuro de etidio en el ADN superenrollado, dividiendo la correspondiente intensidad por el factor 0,8 [41].

**2.2.3. Análisis de la contribución de EROs en el fotoclivaje del ADN plasmídico.**

*Secuestro del HO<sup>•</sup>*: se irradiaron soluciones mezclas de  $\beta$ C y ADN plasmídico en presencia de isopropanol 50 mM, sustancia que presenta una alta reactividad con radicales hidroxilo, disminuyendo así su concentración durante el experimento. Los resultados del análisis electroforético se compararon con aquellos obtenidos en ausencia de este secuestrador.

*Secuestro del O<sub>2</sub><sup>•-</sup>*: en este caso, las irradiaciones se realizaron en presencia de 100 U/ml de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD). Estos experimentos se realizaron en dos diferentes condiciones de pH: 4,8 y 10,0. Al igual que en el caso anterior, los resultados del análisis electroforético se compararon con aquellos obtenidos en ausencia de SOD.

*Investigación de la presencia del <sup>1</sup>O<sub>2</sub>*: para el estudio de la producción fotoinducida de (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) se llevaron a cabo dos estrategias: (i) Comparación de la fotólisis continua en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O: Las soluciones de  $\beta$ C y ADN plasmídico se prepararon en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O. Pares de ambos tipos de soluciones se irradiaron en las mismas condiciones experimentales. Se evaluó el efecto de la presencia de D<sub>2</sub>O comparando los resultados del análisis electroforético de las irradiaciones efectuadas en los dos medios. (ii) Irradiaciones en presencia de secuestradores de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>: se utilizó como secuestrador el alcohol furfurílico (1 mM) el cual posee una alta reactividad con el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> [42]. Se compararon los resultados del análisis electroforético con aquellos obtenidos en ausencia de dicho secuestrador.

### 2.3. Fotosensibilización de ADN extracelular: caracterización de los fotoproductos

2.3.1. Irradiación. Se colocaron soluciones acuosas de pH controlado (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl 50 mM, pH 7,4) de las diferentes  $\beta$ Cs y de ADN del bacteriófago PM2 (10  $\mu$ g/ml) tanto en placas de 96 pocillos como en botellas de cultivo. Luego se irradiaron las muestras utilizando una lámpara Philips HPW 125W ( $\lambda^{\text{max}}_{\text{emisión}}$  365  $\pm$  20 nm) durante 20 min (dosis de 30 kJ/m<sup>2</sup>). Para evitar su calentamiento durante la irradiación, se colocaron las placas sobre un baño de agua-hielo. (Sistema de irradiación II).

2.3.2. Cuantificación de las modificaciones sensibles a endonucleasas fotoinducidas en PM2. Para este fin se usó el método de relajación de ADN descrito en la literatura [43]. Brevemente, la preparación de las muestras de ADN para la electroforesis se precedió de los siguientes pasos: (i) precipitación con una mezcla etanol/acetato de sodio, (ii) 30 min de incubación a -20 °C, (iii) 30 min de centrifugación a 14000 rpm a 4 °C, (iv) lavado con etanol, (v) 10 min de centrifugación a 14000 rpm y 4 °C y (vi) redisolución en *buffer* BE1 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA).

Se incubó una alícuota de 0,2  $\mu$ g del ADN modificado en 20  $\mu$ l de *buffer* BE1, durante 30 min a 37 °C con 10  $\mu$ l de *buffer* BE1 (para la determinación de cortes en una cadena, CSC) o con una de las siguientes endonucleasas de reparación: proteína *Fpg* y *endo. IV* (ambas 3  $\mu$ g/ml en *buffer* BE1) y *T4 endo. V* (3  $\mu$ g/ml en *buffer* BE15 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 15 mM EDTA).

Las reacciones se detuvieron con 10  $\mu$ l de *buffer* de frenado con 2 % de dodecil sulfato de sodio y las muestras se transfirieron a un gel de agarosa 0,8 % para realizar la electroforesis. El revelado de los geles y detección de las bandas de ADN se realizó usando un transiluminador UV (*BioRad Gel Doc 1000*) previa tinción de los geles con bromuro de etidio durante 20 min. Los geles se fotografiaron con una cámara digital KD120 (*Kodak*).

La fluorescencia correspondiente a las formas relajada (*Rel*) o superenrollada (*Se*) del ADN permitió calcular (*i*) el número de CSC, o bien, (*ii*) si la incubación con una endonucleasa de reparación precedió a la electroforesis, el número de CSC y modificaciones sensibles a endonucleasa (MSE). Dicho número se calculó mediante la ecuación:

$$\text{CSC} = -\ln [(1,43 \text{ Se}) / (1,43 \text{ Se} + \text{Rel})] \quad (1)$$

donde CSC son los cortes en una simple cadena por molécula de bacteriofago ( $10^4$  pb), *Se* y *Rel* son las intensidades de las formas superenrollada y relajada, respectivamente y 1,43 es el factor de corrección por la diferente intercalación del bromuro de etidio en la forma *Se* del PM2 con respecto a la forma *Rel*. Se asume una distribución de Poisson para los CSC. Para la obtención del perfil de daño, se corrigieron los datos teniendo en cuenta el número de modificaciones en ADN no tratado.

2.3.3. Rol de las EROs en el perfil de daño. En estos experimentos, las irradiaciones se llevaron a cabo en presencia de SOD (2 mg/ml) y catalasa (315 U/ml), en forma individual y conjunta, con el fin de investigar el rol de las especies  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , y en  $\text{D}_2\text{O}$  para estudiar el rol del  $^1\text{O}_2$  en el perfil de daño fotoinducido en el ADN. Luego de las irradiaciones, se llevó a cabo la determinación de CSC y modificaciones sensibles a *Fpg*, como se explicó en párrafos precedentes.

#### 2.4. Fotosensibilización de ADN intracelular: ensayo de elución alcalina

Se irradiaron (sistema II) cultivos de células V79, en crecimiento exponencial, en medio *buffer* PBSCMF (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) en presencia de diferentes concentraciones de  $\beta\text{C}$ . Luego de la irradiación se lavaron las células y se adicionó medio de cultivo. Para la cuantificación de las modificaciones en el ADN intracelular, se usó el método de elución alcalina modificado para el tratamiento combinado con endonucleasas descrito en la literatura [43,44]. Brevemente, se determinaron las modificaciones oxidativas a cada enzima de reparación (Tabla I) a partir de la incubación del ADN celular con cada endonucleasa inmediatamente después de la lisis celular. La cuantificación de CSC se realizó a partir de las muestras sin tratamiento enzimático. El número de modificaciones sensibles a las glicosilasas se obtuvo sustrayendo la cantidad total de CSC determinada en cada caso. Para la calibración del método se usó la pendiente de la curva de elución obtenida a partir de material genético proveniente de células irradiadas con rayos  $\gamma$  ( $6 \text{ Gy} = 1 \text{ CSC}/10^6 \text{ bp}$ ) [45]. El nivel basal de daño se descontó restando la pendiente de los controles (células no tratadas).

**Tabla I. Reconocimiento de modificaciones en el ADN por enzimas de reparación.**

Enzima de reparación	Modificaciones reconocidas en el ADN
Formamidopirimidina glicosilasa de <i>E. coli</i> ( <i>Fpg</i> )	8-OxoG, FapyG, FapyA, sitios AP, 2,2,4-triaminoxazolona
T4 endonucleasa V (bacteriofágica) ( <i>T4 endo. V</i> )	Dímeros de pirimidina, ciertos tipos de sitios AP
Endonucleasa IV de <i>E. coli</i> ( <i>Endo. IV</i> )	Sitios AP

## 2.5. Ensayos de fototoxicidad

Se irradiaron (sistema II), durante 20 min, células V79 en presencia de diferentes concentraciones de  $\beta$ C. Para cada concentración se prepararon dos botellas de cultivos independientes. Luego del tratamiento de irradiación, se lavaron las células y una de las botellas se trató, inmediatamente, con tripsina y se contaron (Beckman Coulter Counter Z2) las células, mientras que el conteo de células en la otra botella se realizó luego de 48 h de incubación (con medio fresco, libre de  $\beta$ C). El factor de proliferación se calculó a partir del cociente entre el número de células contadas a las 48 h y el número de células contadas a tiempo 0.

## 2.6. Ensayo de micronúcleos

Se irradiaron (sistema II) células V79 en presencia y en ausencia de  $\beta$ C en PBSCMF *buffer*. Las células se lavaron y se incubaron inmediatamente en medio de cultivo durante 24 h. Se fijaron  $\approx 1 \times 10^5$  células en una porta objetos y se trataron con metanol durante 1 h a  $-20^\circ\text{C}$ . Los preparados se tiñeron con bisbenzimidida (Hoechst 33258; 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBSCMF, 60 s). Luego se examinó, por microscopía de fluorescencia, la presencia de micronúcleos sobre un total de 1000 células por cada experimento.

## 3. Resultados y discusión

En solución acuosa, en el intervalo de pH comprendido entre 4 y 11, las  $\beta$ Cs poseen un único equilibrio ácido-base con valores de  $pK_a$  comprendidos entre 7 y 8 (Esquema 1) [46-49]. Por lo tanto, en condiciones fisiológicas de pH (7,4) ambas especies ácido-base coexisten en solución. Recientemente, se demostró que cada especie ácido-base de las  $\beta$ Cs presenta, individualmente, un comportamiento fotofísico y fotoquímico diferente [50-53]. Consecuentemente, es lógico esperar que la capacidad fotosensibilizadora de estos alcaloides también presente una dependencia con el pH.

En este contexto, para evaluar esta propiedad fotoquímica de cada especie ácido-base de cada  $\beta$ C se realizaron todos los experimentos en dos condiciones específicas de pH: 4,8 y 10,0, en las cuales predomina en más de un 99 % la especie protonada ( $\beta\text{CH}^+$ ) y la especie neutra ( $\beta\text{CN}$ ) del alcaloide, respectivamente. De manera complementaria, para evaluar el comportamiento fotodinámico de estos alcaloides en condiciones de pH fisiológico, se realizaron experimentos a pH 7,4.

### 3.1. Análisis cinético del clivaje fotosensibilizado del ADN

Para conocer el rol de cada una de estas formas en el clivaje fotosensibilizado del ADN, se irradiaron soluciones acuosas, equilibradas en aire, de las cinco  $\beta$ Cs estudiadas (nHo, Ho, Ha, 9-Me-nHo y 9-Me-Ho) en presencia del plásmido *pGEM-3z* en su forma superenrollada. Con fines comparativos, en todas las soluciones se igualaron las absorbancias ( $A = 0,3$ ) en la longitud de onda de irradiación. Cada  $\beta$ C estudiada presenta una marcada absorción de la radiación incidente (Fig. 1).

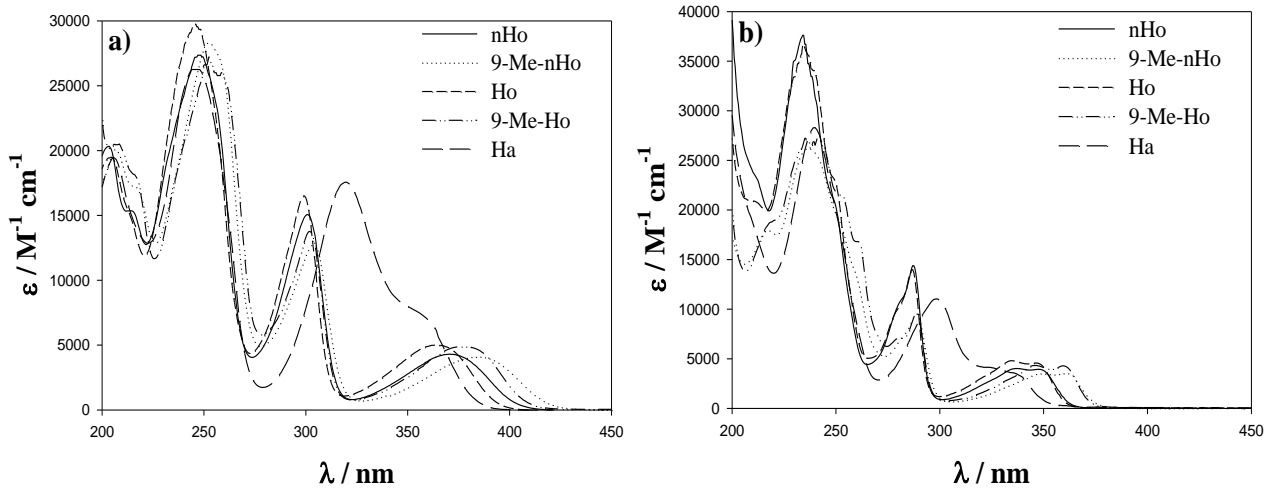


Figura 1. Espectro de absorción UV-visible de las  $\beta$ CDs estudiadas registrados en solución acuosa de pH: (a) 4,8 y (b) 10,0.

El procedimiento seguido para monitorear la cinética del fotoclivaje del ADN plasmídico se basa en que los diferentes topoisómeros del plásmido, es decir, las formas relajada (*Rel*), superenrollada (*Se*) y lineal (*Lin*), poseen diferente movilidad electroforética. La transformación de la forma *Se* en la forma *Rel* del ADN plasmídico ocurre cuando una de las cadenas del topoisómero superenrollado se corta dando lugar, luego, a la conversión espontánea en la forma relajada. Además, si la molécula de ADN circular sufriera un corte en cada una de sus hebras, en posiciones cercanas entre sí, podría transformarse en un plásmido lineal (modelo de Kishikawa [54]).

Experimentalmente, luego de exponer las soluciones mezclas de  $\beta$ CDs y ADN plasmídico durante diferentes intervalos de tiempo a la radiación UVA, se determinó la distribución de los diferentes topoisómeros mediante electroforesis en geles de agarosa (sección 2.2.2). Las reacciones térmicas entre las  $\beta$ CDs y el ADN se descartaron luego de realizar experimentos de control manteniendo los sistemas en la oscuridad. Estos ensayos se llevaron a cabo en diferentes condiciones de concentración, pH y tiempo. En otro conjunto de experimentos de control, se irradiaron soluciones de ADN, a un dado pH, en ausencia de  $\beta$ CDs. En ningún caso se observaron cambios por monitoreo electroforético luego de la irradiación, hecho que descarta los efectos directos de la radiación UVA sobre la molécula de ADN.

Como ejemplo, en la Fig. 2 se presenta la evolución de los diferentes topoisómeros del plásmido en función del tiempo de irradiación, monitoreada electroforéticamente, utilizando  $nHoH^+$  como fotosensibilizador. En la última calle de esta corrida, puede observarse la banda correspondiente a la forma lineal del plásmido, obtenida por el tratamiento del mismo con la enzima de restricción *EcoRI*, a modo de control. La imagen correspondiente al gel de agarosa claramente muestra un sustancial decrecimiento en la concentración de la forma superenrollada del plásmido en función del tiempo de irradiación, así como también el incremento en la intensidad correspondiente al topoisómero relajado. Claramente, la forma *Se* del plásmido se convierte, exclusivamente, en la forma *Rel*. Es decir, en estas condiciones de irradiación, no se generan cortes próximos entre sí en cada hélice de la doble cadena, aún luego de tiempos de irradiación relativamente largos. Este comportamiento se observó en los casos de *nHo*, *Ho* y los 9-metil derivados, en ambas condiciones de pH. En estos casos,  $-d[Se]/dt \approx d[Rel]/dt$ , siguiendo el modelo de corte en una simple cadena (CSC) sugerido por



Kishikawa *et al.*[54]. Este modelo supone que el fotoclivaje ocurre esencialmente por ruptura en hebras sencillas distribuidas al azar.

Por su parte,  $\text{HaH}^+$  mostró un comportamiento particular. En este caso, además de la presencia de la forma *Rel* del plásmido *pGEM-3z*, se observa la formación del topoisómero *Lin*, a tiempos de irradiación largos (Fig. 2(c)). Este hecho indica que  $\text{HaH}^+$  también presenta un perfil de daño correspondiente al modelo de Kishikawa debido a que la aparición de los dos topoisómeros, *Rel* y *Lin*, es consecutiva. Asimismo, pone de manifiesto que la capacidad de daño de este alcaloide es claramente mayor a la de  $\text{nHoH}^+$  (Figuras 2(a) y (b)). En términos cuantitativos, para un tiempo de irradiación determinado, por ejemplo 50 min, en el caso de  $\text{nHoH}^+$  se observa un consumo de la forma *Se* de  $\sim 50\%$ , mientras que  $\text{HaH}^+$  induce una relajación de  $\sim 95\%$ . Este hecho se analiza con mayor detalle a lo largo de las siguientes secciones.

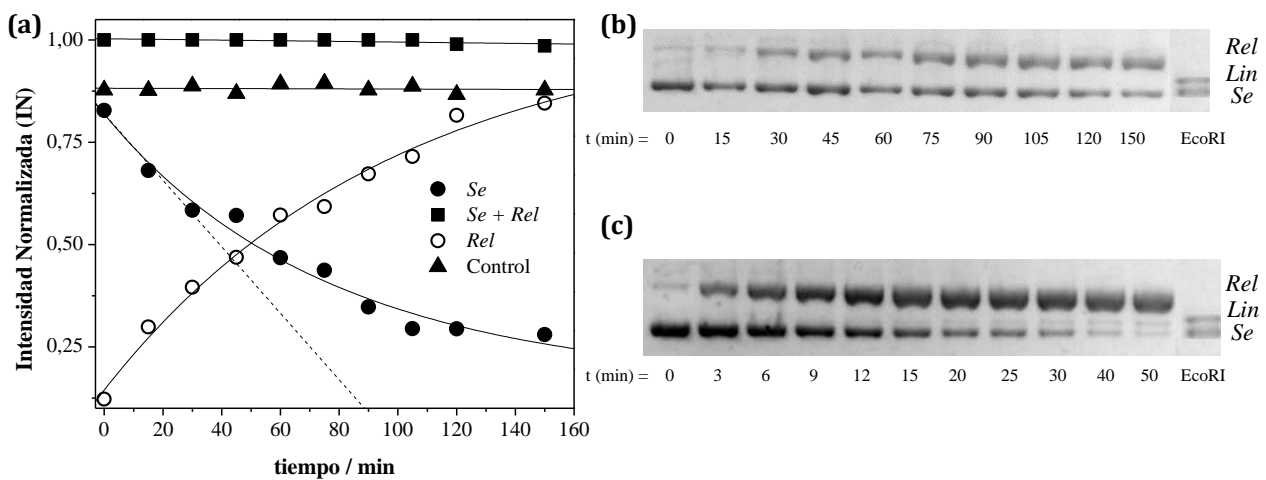


Figura 2. (a) Evolución de la Intensidad de fluorescencia Normalizada (IN) de las formas relajada (*Rel*) y superenrollada (*Se*) del plásmido *pGEM-3z* en función del tiempo de irradiación ( $\lambda_{\text{exc}}$  350 nm), en presencia de  $\text{nHoH}^+$  (pH 4,8). El control corresponde a la irradiación del plásmido en ausencia de fotosensibilizador. Recta punteada: Ajuste lineal que permite obtener la velocidad inicial de relajación del ADN superenrollado ( $d[\text{Se}]/dt$ ). (b) y (c) Soluciones de *pGEM-3z* irradiadas en presencia de  $\text{nHoH}^+$  y  $\text{HaH}^+$ , respectivamente.

### 3.2. Dependencia del foto-clivaje del ADN plasmídico con el pH

Para analizar en forma comparativa la capacidad fotosensibilizadora de las cinco  $\beta\text{Cs}$  en estudio, se utilizó como parámetro la velocidad inicial de relajación del ADN superenrollado ( $d[\text{Se}]/dt$ ). La misma se calcula a partir de la pendiente del gráfico de la intensidad de fluorescencia normalizada (IN) de la banda correspondiente al topoisómero *Se* en función del tiempo de irradiación (línea punteada en la Fig. 2(a)). En la Fig. 3 se muestra la evolución de la IN de la forma *Se* en presencia de las diferentes  $\beta\text{Cs}$ , en ambas condiciones de pH, en función del tiempo de irradiación. Los correspondientes valores del parámetro  $d[\text{Se}]/dt$  se resumen en la Tabla II.

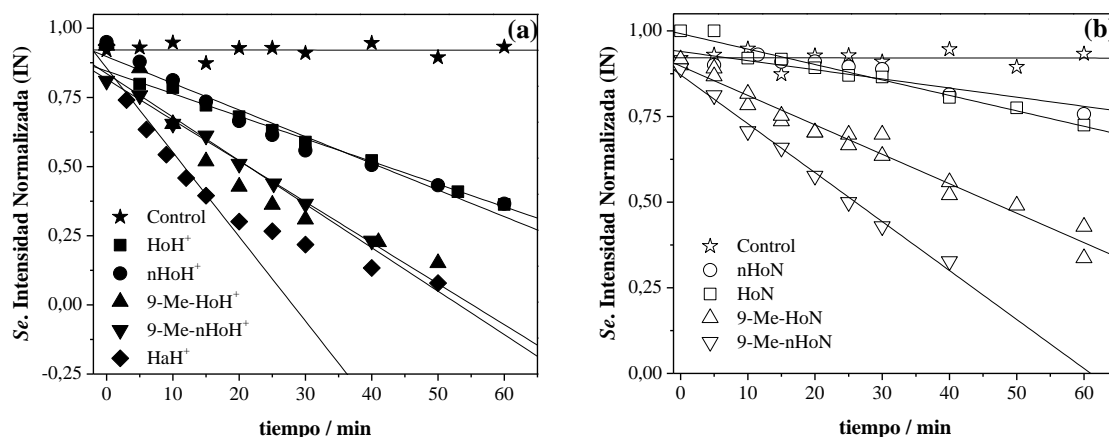


Figura 3. Evolución de la Intensidad de fluorescencia Normalizada (IN) correspondiente a la forma *Se* del plásmido *pGEM-3z* en función del tiempo de irradiación ( $\lambda_{exc}$  350 nm), utilizando diferentes  $\beta$ Cs como fotosensibilizadores. Los experimentos fueron realizados a pH: (a) 4,8 ( $\beta$ CH<sup>+</sup>) y (b) 10,0 ( $\beta$ CN).

**Tabla II. Velocidad de relajación del ADN en soluciones acuosas de pH controlado y equilibradas en aire, irradiadas en presencia de diferentes fotosensibilizadores.**

Entrada	Fotosensibilizador <sup>a</sup>	$d[Se]/dt$ <sup>b</sup>	
		/ IN min <sup>-1</sup> pH 4,8	/ IN min <sup>-1</sup> pH 10,0
1	nHo	$-8,2 \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$	$-2,3 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$
2	Ho	$-8,1 \pm 0,8 \cdot 10^{-3}$	$-2,4 \pm 0,8 \cdot 10^{-3}$
3	9-Me-Ho	$-14 \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$-8,6 \pm 0,7 \cdot 10^{-3}$
4	9-Me-nHo	$-15 \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$-14 \pm 1 \cdot 10^{-3}$
5	Ha	$-35 \pm 4 \cdot 10^{-3}$	--c

<sup>a</sup> Irradiación con UVA.

<sup>b</sup> Valor promedio de  $d[Se]/dt$  obtenido a partir de un conjunto de tres experimentos independientes.

<sup>c</sup> Este experimento no se pudo realizar, en condiciones comparativas, debido a la baja solubilidad de Ha en agua a pH 10,0 (HaN).

Los resultados listados en la Tabla II muestran que la magnitud del daño producido en el ADN plasmídico, luego de la irradiación fotosensibilizada, es mayor cuando las irradiaciones se realizan en condiciones ácidas. Es decir, las formas protonadas,  $\beta$ CH<sup>+</sup>, son mejores fotosensibilizadores del ADN que las correspondientes formas neutras ( $\beta$ CN). Esta tendencia puede ser explicada teniendo en cuenta el comportamiento del estado electrónico excitado de las  $\beta$ Cs en solución acuosa [50,51]. En este tipo de solventes, independientemente de la condición de pH, los principales procesos fotofísicos y fotoquímicos ocurren desde el primer estado electrónico excitado singlete de las formas protonadas ( $[^1\beta$ CH<sup>+</sup>]\*). Por lo tanto, es lógico pensar que los procesos fotosensibilizados también tienen lugar a partir de la especie  $[^1\beta$ CH<sup>+</sup>]\*.

El hecho de que la magnitud del daño fotoinducido sea menor en medio alcalino, concuerda con que en esta condición de pH sólo la fracción de la especie  $[^1\beta$ CN]\* que se protona es capaz de dar lugar al proceso fotosensibilizado [55,56].

### 3.3. Dependencia del foto-clivaje del ADN plasmídico con la estructura química del fotosensibilizador $\beta$ Cs

Los valores de  $d[Se]/dt$  listados en la Tabla II (entradas 1 a 5) indican que: (i) nHo y Ho son las  $\beta$ Cs que muestran la menor capacidad de inducir daño fotosensibilizado, (ii) los derivados 9-metilados producen un efecto intermedio y (iii) Ha es la  $\beta$ C que presenta la mayor capacidad fotosensibilizadora. Estos resultados se pueden resumir indicando el orden creciente de reactividad observada como:  $nHo \sim Ho < 9\text{-Me-nHo} \sim 9\text{-Me-Ho} < Ha$ .

Las diferencias observadas podrían ser consecuencia de muchos factores, tales como: (i) la diferencia en la afinidad de unión entre cada  $\beta$ C y la molécula de ADN previamente descrita, (ii) una diferencia en la capacidad de producción de EROs bajo irradiación UVA por parte de cada  $\beta$ C, y/o (iii) la presencia de vías de reacción adicionales, tales como la formación de dímeros de pirimidina. Cada uno de estos factores se analizará en las secciones siguientes.

#### 3.3.1. Relación entre interacción y daño

Los resultados obtenidos a partir de los estudios de interacción entre  $\beta$ Cs y ADN, previamente publicados en la literatura [56], muestran que el patrón (definido en términos de la magnitud de las correspondientes constantes de afinidad,  $K_G$ ) observado para estos cinco derivados es:  $K_G^{nHo} \sim K_G^{Ho} < K_G^{Ha} < K_G^{9\text{-Me-nHo}} \sim K_G^{9\text{-Me-Ho}}$ . La afinidad relativa de cada  $\beta$ C con la molécula de ADN permite explicar, de manera parcial, la capacidad fotosensibilizadora relativa de estos alcaloides. Concretamente, nHo y Ho son los que presentan menor afinidad al ADN y, consecuentemente, menor capacidad de daño. Sin embargo, este hecho no puede explicar por completo el orden de daño ni la magnitud relativa observados para Ha y los 9-metil derivados (*vide infra*).

#### 3.3.2. Rol de las especies reactivas de oxígeno

Se ha demostrado que, aunque con una muy baja eficiencia, bajo irradiación UVA las  $\beta$ Cs son capaces de producir diferentes EROs. En particular, las  $\beta$ Cs estudiadas en este trabajo muestran valores de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete ( $\Phi_{\Delta}^{\text{aire}}$ ) y producción de peróxido de hidrógeno ( $\Phi_{H_2O_2}$ ) de  $\sim 0,1\text{-}0,2$  y  $\sim 10^{-3}$ , respectivamente [50,51,53]. No obstante, estas pequeñas cantidades de EROs podrían ser suficientes para producir el clivaje fotoinducido del ADN. Más aún, pensando en su posible confinamiento en un pequeño espacio delimitado, por ejemplo, por una membrana biológica. Por ello, se decidió investigar la posible participación de las EROs en el clivaje fotoinducido del plásmido, recurriendo para tal fin a la estrategia del uso de secuestradores selectivos. Teniendo en cuenta que los valores de rendimientos cuánticos de producción de EROs son similares para todas las  $\beta$ Cs, se utilizó el nHo como  $\beta$ C modelo para realizar dichos estudios.

##### 3.3.2.1. Rol del oxígeno singlete ( $^1O_2$ )

Para determinar qué rol cumple el  $^1O_2$  en estas reacciones fotosensibilizadas, se llevaron a cabo dos conjuntos de experimentos: (i) comparación de la fotólisis en  $H_2O$  y  $D_2O$  y (ii) irradiaciones en presencia de alcohol furfurílico, un agente capaz de reaccionar selectivamente con esta ERO.

*(i) Comparación de la fotólisis en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O*

Este estudio se realizó irradiando bajo idénticas condiciones soluciones de ADN y nHo ácidas y alcalinas, equilibradas en aire, tanto en H<sub>2</sub>O como en D<sub>2</sub>O. Los resultados del análisis electroforético, presentados en la Fig. 4, muestran que los valores de  $d[Se]/dt$  obtenidos para ambos sistemas fueron similares, dentro del error experimental. Los valores de  $d[Se]/dt$  obtenidos en la irradiación en D<sub>2</sub>O fueron  $-1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-2}$  IN min<sup>-1</sup> y  $-2,3 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$  IN min<sup>-1</sup>, para medio ácido y alcalino, respectivamente.

Puede notarse que, en el caso de los experimentos desarrollados a pH 4,8, se observa un pequeño aumento en la velocidad de relajación del ADN con respecto al experimento realizado en H<sub>2</sub>O. En este caso, el valor  $d[Se]/dt$  es 1,7 veces mayor (Tabla III, entradas 1 y 3). Teniendo en cuenta que este pequeño aumento está muy lejos del aumento de 16 veces esperado para los casos en los que el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> juega el papel principal en las fotorreacciones, estos resultados indican que esta especie reactiva, en ambas condiciones de pH, no está involucrada en la vía principal del fotoclivaje del ADN. Quizás esta ERO participe en una vía secundaria que se ve aumentada al usar D<sub>2</sub>O como solvente.

*(ii) Irradiaciones en presencia de secuestradores de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>*

Se llevaron a cabo irradiaciones del sistema ADN / nHo en presencia de alcohol furfurílico 1 mM. En ninguna de las dos condiciones de pH, la velocidad de relajación de ADN se modificó, tal como lo muestra la Fig. 4. Los valores de  $d[Se]/dt$  obtenidos para las irradiaciones en medio ácido y alcalino fueron, respectivamente,  $-7,2 \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$  IN min<sup>-1</sup> y  $-2,0 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$  IN min<sup>-1</sup>. Estos resultados apoyan fuertemente aquéllos descritos en los párrafos precedentes, confirmando que el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> presente en la mezcla de reacción no contribuye significativamente en el proceso de relajación del ADN.

Además, es importante resaltar dos puntos adicionales que soportan la hipótesis de que el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> no participa en el foto-clivaje del ADN. Por un lado, la eficiencia de producción de cada forma ácido-base de las βCs es similar. Entonces, si el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> dominara la reacción el valor obtenido de  $d[Se]/dt$  a pH 10,0 debería ser similar al obtenido a pH 4,8. Contrariamente, la velocidad experimental de relajación observada a pH 10,0 es mucho menor que la encontrada a pH 4,8. Por otro lado, García-Zubiri *et al.* han comprobado para otro derivado de βC su complejación con el ADN y, además, que ésta hace que el cruce intersistemas (CIS) sea menos eficiente y, por lo tanto, decrece la cantidad de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generada por fotosensibilización [57]. Teniendo en cuenta estos hechos, las propiedades fotosensibilizadoras de las βCs podrían involucrar otras rutas, además del ataque del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> al ADN.

**3.3.2.2. Rol del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)**

Con el fin de averiguar cuál es el papel cumplido por el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en la fotosensibilización del ADN plasmídico, se llevaron a cabo experimentos en presencia de SOD, que elimina el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> del medio transformándolo en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>. Entonces en su presencia, el fotoclivaje del ADN debería ser menor si el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> contribuyera significativamente al proceso. Los resultados obtenidos muestran que bajo ambas condiciones de pH, las velocidades de relajación observadas son similares con y sin SOD en el medio de reacción (Fig. 4). Los valores de  $d[Se]/dt$  obtenidos fueron  $-7,7 \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$  IN min<sup>-1</sup> y  $-1,8 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$  IN min<sup>-1</sup> para las irradiaciones en medio ácido y alcalino, respectivamente. Este hecho sugiere que O<sub>2</sub><sup>•-</sup> no participa en las principales vías de fotosensibilización estudiadas.

### 3.3.2.3. Rol del radical hidroxilo (HO•)

La participación de esta especie en los procesos fotosensibilizados estudiados también fue descartada. Los experimentos llevados a cabo en presencia de isopropanol no presentan diferencias significativas con aquellos llevados a cabo en ausencia de este secuestrador específico, como lo muestra la Fig. 4. Los valores de  $d[Se]/dt$  obtenidos en este caso fueron  $-7,8 \pm 0,8 \cdot 10^{-3} \text{ IN min}^{-1}$  para las irradiaciones en medio ácido y  $-1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ IN min}^{-1}$  para las realizadas en medio alcalino.

Los resultados presentados en los párrafos precedentes, indican que las EROs no participan en el clivaje fotosensibilizado del plásmido. La Tabla III resume todos los valores de  $d[Se]/dt$  obtenidos en las diferentes condiciones experimentales discutidas. Por otra parte, estos resultados tampoco permiten explicar aún la diferencia observada en el daño al ADN que inducen los diferentes alcaloides seleccionados como posibles fotosensibilizadores.

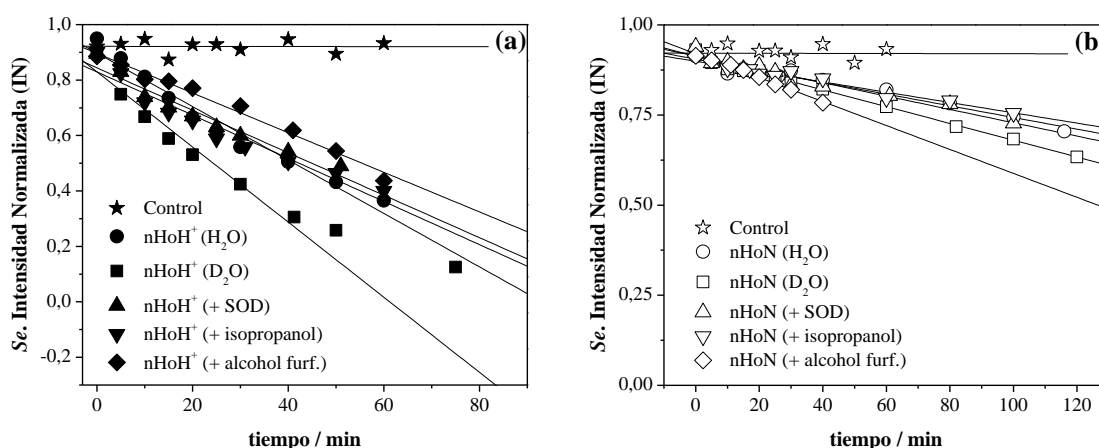


Figura 4. Evolución de la Intensidad de fluorescencia Normalizada (IN) correspondiente a la forma *Se* del plásmido *pGEM-3z* en función del tiempo de irradiación ( $\lambda_{exc}$  350 nm). Los experimentos fueron realizados en soluciones acuosas del sistema nHo/ADN, equilibradas en aire, en presencia y ausencia de diferentes secuestradores de ERO. (a) pH 4,8 y (b) pH 10,0.

**Tabla III. Velocidad de relajación del ADN superenrollado ( $d[Se]/dt$ ) en presencia de nHo como fotosensibilizador, luego de la irradiación con luz UVA.**

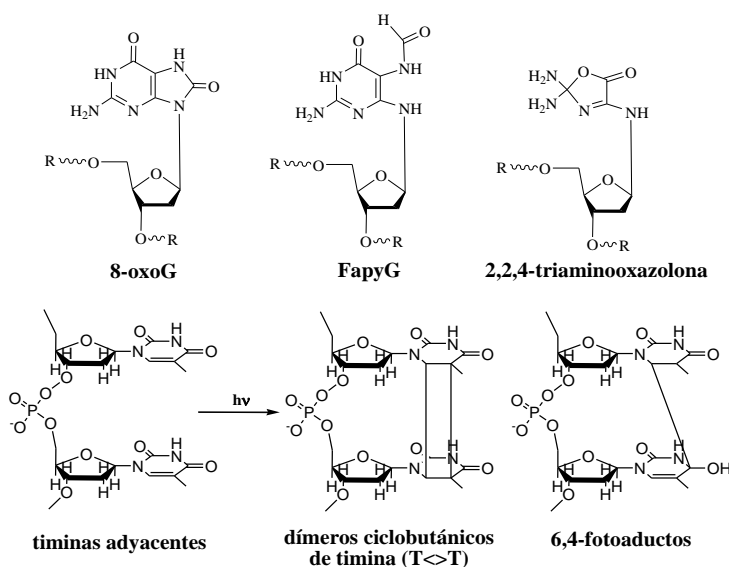
Entrada	Condiciones de reacción	$d[Se]/dt$	
		/IN min <sup>-1</sup> <sup>a</sup> pH 4,8	/IN min <sup>-1</sup> <sup>a</sup> pH 10,0
1	nHo (H <sub>2</sub> O)	$-8,2 \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$	$-2,3 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$
2	nHo + isopropanol (H <sub>2</sub> O)	$-7,8 \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$	$-1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$
3	nHo (D <sub>2</sub> O)	$-1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-2}$	$-2,3 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$
4	nHo + alcohol furfurílico (H <sub>2</sub> O)	$-7,2 \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$	$-2,0 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$
5	nHo + SOD (H <sub>2</sub> O)	$-7,7 \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$	$-1,8 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$

<sup>a</sup> Valores de  $d[Se]/dt$  promedio, obtenidos a partir de tres experimentos independientes.

### 3.4. Fotosensibilización de ADN extracelular: caracterización de los fotoproductos

En la sección anterior se demostró que las EROs no participan activamente en el fotoclivaje del plásmido sensibilizado por las  $\beta$ Cs y que tampoco la diferencia observada en la interacción de estos alcaloides con el ADN puede explicar totalmente el perfil o la tendencia de daño observada ( $nHo \sim Ho < 9-Me-nHo \sim 9-Me-Ho < Ha$ ). En este contexto, la caracterización de los fotoproductos permite determinar si alguno de estos alcaloides en particular presenta vías de reacción química adicionales (formación de dímeros de pirimidina) que permitan explicar la diferencia en la capacidad fotosensibilizadora observada.

El daño en el ADN producido por fotosensibilizadores puede ser mediado por diferentes mecanismos, a partir de los cuales resultan diferentes tipos de fotoproductos. Se ha demostrado que la transferencia de energía desde el estado triplete de un fotosensibilizador hacia las bases pirimidínicas, llevan a la formación de dímeros de pirimidina [58,59]. Más frecuentemente se observan las oxidaciones fotosensibilizadas. Éstas pueden iniciarse directamente por estados excitados del fotosensibilizador (mecanismo Tipo I, es decir, vía transferencia de electrones o abstracción de hidrógeno fotoinducidas) o mediadas por las EROs, tales como el  $^1O_2$  (mecanismo Tipo II) [60]. Ambos tipos de reacciones pueden conducir a la formación de varios fotoproductos del ADN, tales como 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG), formamidopirimidinas (debidas a la apertura del anillo purínico) y sitios apurínicos o apirimidínicos (sitios AP), entre otros (Esquema 2).



Esquema 2. Estructuras de los fotoproductos más representativos, producidos por el daño al ADN.

En esta sección, se presentarán evidencias de la naturaleza química (estructura) de los fotoproductos del ADN formados luego de su fotosensibilización por diferentes  $\beta$ Cs. Los espectros de absorción UV-visible y emisión fluorescente de las cinco  $\beta$ Cs estudiadas permiten estimar la energía relativa de los estados electrónicos excitados de las mismas. De acuerdo con este último hecho, estas cinco  $\beta$ Cs pueden ser divididas en dos grupos principales: (i) grupo I, compuesto por las  $\beta$ Cs con estados electrónicos excitados de baja energía ( $nHo$ ,  $Ho$  y los correspondientes 9-metil derivados); (ii) grupo II, representado en nuestro estudio por  $Ha$ , la cual posee un estado excitado de mayor energía que las anteriores. Con esta diferenciación in mente,  $nHo$  y  $Ho$ , por un lado, y  $Ha$ , por el otro, estas tres  $\beta$ Cs fueron elegidas como moléculas

representativas de los grupos I y II respectivamente, para llevar a cabo los experimentos que se describen a continuación.

Estos experimentos se realizaron con ADN procedente del bacteriofago PM2 de *Pseudomonas*, el cual posee las mismas características que el ADN plasmídico utilizado en los experimentos cinéticos. Se trata de ADN circular de doble cadena, que puede existir en las formas topológicas lineal, relajada y superenrollada. En este caso se utilizó el sistema de irradiación II ( $\lambda_{exc}$  365 nm). Los experimentos fueron realizados para las tres diferentes  $\beta$ Cs, en dos condiciones de pH: 5,0 y 7,4.

El monitoreo de la reacción de formación de los fotoproductos del ADN, se realizó también por electroforesis en geles de agarosa, pero con algunas modificaciones con respecto a los experimentos cinéticos antes descriptos. Luego de las irradiaciones, (i) las muestras se analizaron inmediatamente por electroforesis para determinar así CSC, o bien, (ii) las muestras se pre-incubaron con una serie de enzimas de reparación que reconocen diferentes tipos de daño en el ADN [61,62], para determinar las modificaciones sensibles a endonucleasas, MSE. Dichas enzimas, junto con las modificaciones reconocidas por ellas, se listan en la Tabla I.

### 3.4.1. Perfil del daño al ADN

El número de CSC y varios tipos de modificaciones estructurales sensibles a endonucleasas de reparación inducidas por las  $\beta$ Cs fotoexcitadas se presentan en la Fig. 5, en la forma de un perfil de daño. Este perfil puede servir como una especie de “huella digital” de las especies o mecanismos directamente responsables del daño [63].

Los resultados muestran que  $nHoH^+$  y  $HoH^+$  inducen un perfil de daño caracterizado por un número alto de modificaciones de bases sensibles a *Fpg*. En la Fig. 5(a), sólo se presentan, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para el  $nHoH^+$ . Los sitios de pérdidas de bases, los cuales son específicamente reconocidos por la endonucleasa IV y los CSC, son generados en una proporción mucho menor. Es importante destacar que en el caso de estas dos  $\beta$ Cs ( $nHo$  y  $Ho$ ), no se produjeron fotodímeros de pirimidina, modificación que es reconocida, junto con ciertos tipos de pérdidas de bases, por la T4 endonucleasa V.

Por su parte,  $HaH^+$  no solamente presenta un rendimiento relativo alto para la generación de CSC y sitios de pérdidas de bases (detectados por la endonucleasa IV), sino que también genera dímeros de pirimidina. La detección de estos dímeros no se hace de manera directa, sino que se hace a partir de la diferencia observada entre el tratamiento donde se agregan conjuntamente las enzimas T4 endonucleasa V y endonucleasa IV, con respecto al tratamiento realizado con la endonucleasa IV sola. Esto se debe a la falta de especificidad de estas enzimas. Tal como se mencionó, la enzima T4 endonucleasa V permite reconocer los sitios donde se forman los dímeros de pirimidina conjuntamente con aquéllos donde hubo ciertos tipos de pérdidas de bases (sitios AP), mientras que la enzima endonucleasa IV sólo permite reconocer sitios AP. Consecuentemente, si el tratamiento combinado con las dos enzimas produce un porcentaje de daño superior al observado en el tratamiento con endonucleasa IV, esto da cuenta entonces de la formación de dímeros de pirimidina, tal como se demuestra claramente en las Fig. 5(c) y (d).

El análisis cinético (Fig. 4) ya sugiere que la magnitud de daño en el ADN producido por  $\text{HaH}^+$  es mucho mayor que aquella observada en el caso de  $\text{HoH}^+$  o de  $\text{nHoH}^+$ . Este hecho también se evidencia cuando se comparan los perfiles de daño producidos por  $\text{HaH}^+$  y  $\text{nHoH}^+$ , cuando dichos fotosensibilizadores se encuentran en la misma condición de pH y presentan la misma absorbancia a la longitud de onda de excitación (Fig. 5(c) y (e)).

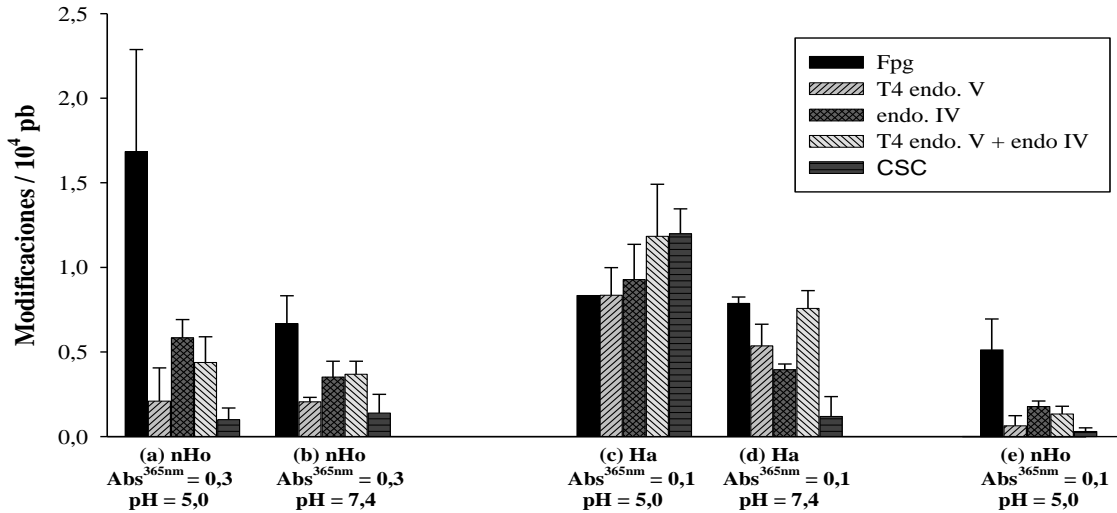


Figura 5. Perfiles de daño al ADN libre de células, producidos por fotosensibilización con nHo y Ha ( $\lambda_{\text{exc}}$  365 nm). Las columnas indican el número de CSC y modificaciones sensibles a distintas endonucleasas. Los datos expuestos representan el promedio de 3-4 experimentos independientes ( $\pm$  D.S.).

### 3.4.2. Rol de las EROs en el perfil de daño

A partir del análisis cinético descrito en los párrafos precedentes, resultaba evidente que las EROs no cumplen un rol significativo en el mecanismo de daño al ADN. Sin embargo, esta conclusión está basada sólo en los resultados obtenidos de aquellos experimentos en los que se monitoreó la producción de CSC como marcador de daño al ADN. Con el objeto de complementar estos resultados, también fue evaluada la contribución de las diferentes EROs en el perfil de daño al ADN. En este sentido, se desarrollaron experimentos en presencia de superóxido dismutasa y en presencia de catalasa (enzima que cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ) en forma individual y conjunta a pH 7,4. También se realizaron medidas utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente. En este caso, el pD del *buffer* fue ajustado a 7,4, siguiendo el procedimiento descrito en la literatura [64] y la pureza final de este isótopo fue mayor que 96 %. Estos experimentos permitieron investigar el efecto de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $^1\text{O}_2$  en el perfil de daño del ADN. Luego de las irradiaciones, se detectaron electroforéticamente los CSC y las modificaciones sensibles a *Fpg*.

Los valores presentados en la Tabla IV demuestran que la participación de estas EROs en el caso de nHo, está excluida debido a la ausencia de influencia de la catalasa, la SOD y el  $\text{D}_2\text{O}$ . Sin embargo, en el caso de Ha, se observó una pequeña variación en los experimentos realizados en  $\text{D}_2\text{O}$ . La magnitud de las modificaciones sensibles a *Fpg* en  $\text{D}_2\text{O}$  fue dos veces mayor que en los experimentos control realizados en  $\text{H}_2\text{O}$ . El hallazgo de que el  $\text{D}_2\text{O}$  afecta principalmente la generación de los sitios sensibles a *Fpg*, pero no a los CSC, está de acuerdo con los resultados previos, indicando que el oxígeno singlete genera mayormente 8-



oxoG y relativamente pocos CSC. Este hecho también indicaría que los CSC y la 8-oxoG son generados, al menos en el caso de Ha, por diferentes mecanismos.

**Tabla IV. Efectos de SOD, catalasa y D<sub>2</sub>O como solvente en la generación fotosensibilizada de sitios sensibles a *Fpg* en el ADN por βCs a pH 7,4 y λ<sub>exc</sub> 365 nm.**

βC	Número relativo de modificaciones sensible a <i>Fpg</i> (%) en presencia de: <sup>a,b</sup>			
	SOD <sup>c</sup>	Catalasa <sup>d</sup>	SOD + Catalasa	D <sub>2</sub> O
nHo	(1,1 ± 0,2) x 10 <sup>2</sup>	(1,1 ± 0,4) x 10 <sup>2</sup>	(1,2 ± 0,4) x 10 <sup>2</sup>	(0,8 ± 0,3) x 10 <sup>2</sup>
Ha	(1,3 ± 0,6) x 10 <sup>2</sup>	(1,2 ± 0,5) x 10 <sup>2</sup>	(1,2 ± 0,3) x 10 <sup>2</sup>	(2,1 ± 0,4) x 10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> Se define el 100 % como el número de sitios sensibles a *Fpg* observados en ausencia de un aditivo. <sup>b</sup> Los valores corresponden al promedio calculado a partir de tres experimentos independientes (± D.S.). <sup>c</sup> 2 mg/ml. <sup>d</sup> 315 U/ml.

### 3.4.3. Formación de dímeros de timina

Los dímeros de timina (T<>T) son los productos formados, con mayor frecuencia, luego de la absorción directa de radiación UV por parte del ADN. Estas lesiones son iniciadoras de procesos mutagénicos y carcinogénicos [62]. Este tipo de daño, además de ser generado por la absorción directa de radiación [65], también puede ser generado por ciertos fotosensibilizadores vía transferencia de energía triplete-triplete [66,67]. Claramente, la viabilidad de este proceso no está solamente vinculada a las energías relativas de los estados excitados triplete de los cromóforos donador y aceptor [68], sino que también depende de la eficiencia de formación del estado triplete ( $\Phi_T$ ) por parte del fotosensibilizador.

La energía del estado triplete ( $E_T$ ) requerida para que un compuesto dado se convierta en un potencial fotosensibilizador del ADN vía formación de dímeros T<>T (es decir, el valor de  $E_T$  “funcional”) debe ser mayor que 267 kJ/mol [67,68]. En este contexto, se puede evaluar si desde un punto de vista termodinámico, nHo, Ho y Ha son capaces de inducir la formación de T<>T en el ADN, por transferencia de energía de sus respectivos estados tripletes ( $T_1$ ). Para cada caso, existe información en la literatura acerca de los valores de  $E_T$  de cada forma ácido-base de las βCs (Tabla V) [46,49]. La Tabla V muestra que las formas neutras de estos tres alcaloides y la forma protonada de Ha (HaH<sup>+</sup>) poseen la energía de triplete requerida para la formación de T<>T. En este aspecto, se esperaría que la formación fotosensibilizada de T<>T ocurriera no sólo en el caso de Ha, sino también para los tres alcaloides en los experimentos llevados a cabo a pH 7,4, situación en la cual, aproximadamente el 50 % de las formas neutras de cada alcaloide está presente en la solución.

Sin embargo, los resultados presentados en la Fig. 5, claramente indican que Ha es la única βC que produce dímeros T<>T. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que en medio acuoso, la protonación de las βCs ocurre en ambos estados excitados (singlete y triplete), aún a pH neutro. Por lo tanto, la especie [βCH<sup>+</sup>]<sup>\*</sup> es predominante luego de la excitación, en todo el rango de pH estudiado en este trabajo. En esas condiciones experimentales si la especie predominante en el medio es la forma protonada queda claro que HaH<sup>+</sup> es la única especie del tipo βCH<sup>+</sup> cuyo estado triplete supera el umbral de energía de 267 kJ/mol (Tabla V, 274 kJ/mol).

**Tabla V. Datos sobre el estado triplete de las formas neutra y protonada de nHo, Ho y Ha.  $\lambda_P$  es la longitud de onda correspondiente al máximo de fosforescencia (77 K) y  $E_T$  es la energía del triplete.**

$\beta C$	$\beta CH^+$		$\beta CN$	
	$\lambda_P / \text{nm}^a$	$E_T / \text{kJ mol}^{-1}$	$\lambda_P / \text{nm}^a$	$E_T / \text{kJ mol}^{-1}$
nHo	458	261	410	292
Ho	460	260	404	296
Ha	437	274	396	302

<sup>a</sup> Datos extraídos de la referencia [69].

### 3.5. Fotosensibilización de ADN intracelular: ensayos de elución alcalina

Para evaluar la capacidad de daño de estos alcaloides sobre el material genético intracelular, se irradiaron células V79 con luz UVA en presencia de Ha. El daño fue caracterizado mediante el ensayo de elución alcalina combinado con el tratamiento enzimático por endonucleasas (Fig. 6). Con fines comparativos, la Fig. 6 muestra también el daño al ADN extracelular obtenido en el ensayo con PM2.

Claramente, en condiciones intracelulares, Ha induce un perfil de daño marcadamente diferente en comparación con el observado en los ensayos con ADN extracelular. Brevemente, Ha genera daño oxidativo en el ADN extracelular con rendimientos relativamente elevados, mientras que la formación de CSC y de dímeros de pirimidina es despreciable o nula. Cabe recordar que el espectro de daño al ADN extracelular inducido por Ha no sólo consiste en la formación de CSC y daño de tipo oxidativo, sino también da lugar a la formación de dímeros de pirimidina (sección 3.4). La ausencia de CSC observada en el ADN intracelular podría ser una consecuencia de la rápida reparación de este tipo de lesiones por parte de las células ( $t_{1/2} < 5 \text{ min}$ ) que tendría lugar durante el período de tratamiento de las muestras previo al análisis del daño. Se puede apreciar, además, que el daño observado en condiciones intracelulares es  $\sim 5$  veces menor al observado en el ADN extracelular. Muy probablemente, esto se deba a procesos de desactivación eficientes de los estados excitados de las  $\beta C$ s inducidos por los múltiples componentes intracelulares.

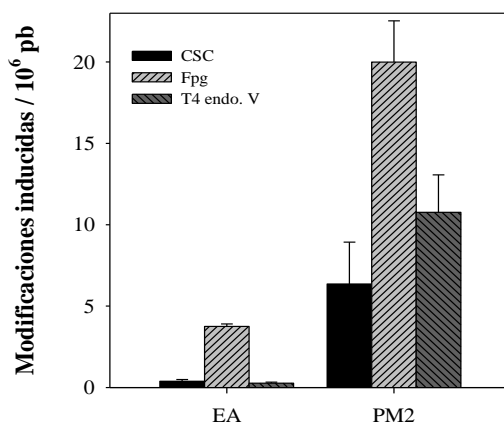


Figura 6. Comparación del daño al ADN intra- (E. A.) y extracelular (PM2), fotosensibilizado por Ha (10  $\mu\text{M}$ ) bajo irradiación UVA (365 nm; 30  $\text{kJ/m}^2$ ).

### 3.6. Toxicidad sobre células V79 y generación de micronúcleos fotoinducidos por $\beta$ Cs (UVA)

Basados en las observaciones presentadas en las secciones anteriores donde se evidencia la capacidad de producir daño fotosensibilizado de las  $\beta$ Cs, se torna relevante evaluar todos los efectos que puedan tener estos compuestos sobre la estructura celular. En este contexto, se evaluó la capacidad fototóxica de las  $\beta$ Cs sobre cultivos celulares V79, mediante ensayos de proliferación. Para tal fin, se expusieron a la radiación (UVA, durante 20 min) células V79 en presencia de cantidades crecientes de Ha. Los resultados presentados en la Fig. 7 muestran una clara relación dosis-respuesta: inhibición en la proliferación celular cuanto mayor es la concentración en estado estacionario del fotosensibilizador en su estado excitado. Por el contrario, no se observa inhibición alguna en la proliferación celular tanto en el tratamiento en ausencia de radiación UVA (símbolo vacío en la Fig. 7(a)) como en las células irradiadas en ausencia de  $\beta$ C (punto registrado a 0  $\mu$ M de Ha).

De manera complementaria se evaluó la capacidad genotóxica de las  $\beta$ Cs a través del ensayo de micronúcleos. Este tipo particular de modificaciones se originan como consecuencia de diferentes tipos de daño al ADN ocurridos durante el proceso de división celular (mitosis) y son indicadores muy sensibles de genotoxicidad [70]. En nuestro caso particular, se seleccionó Ha como ejemplo representativo de las  $\beta$ Cs. Para cuantificar la generación de micronúcleos fotosensibilizada por Ha, se irradiaron células V79 en presencia de este alcaloide, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.6. En los resultados mostrados en la Fig. 7, se observa una relación dosis-respuesta del número de micronúcleos generados luego del tratamiento. Estos resultados confirman el potencial genotóxico de las modificaciones al ADN fotoinducidas por  $\beta$ Cs.

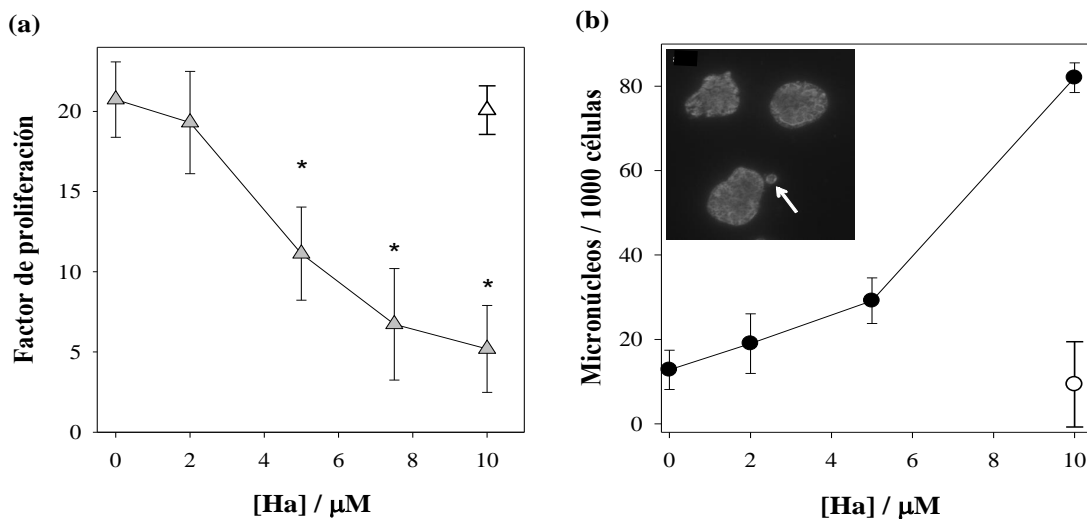


Figura 7. (a) Factor de proliferación de células V79 irradiadas en presencia de diferentes concentraciones de Ha. Sistema de irradiación II. Para cada compuesto se realizó el test ANOVA de un factor y, posteriormente, se aplicó el test de Dunnett para comparar cada tratamiento con su respectivo control. Los casos que muestran una diferencia significativa desde el punto de vista estadístico ( $p < 0,05$ ) se indican con (\*). (b) Número de micronúcleos generados por fotosensibilización de células V79 irradiadas con UVA en presencia de Ha.

*Inserto:* Sección de una imagen de microscopía fluorescente obtenida de una muestra de células V79 irradiadas en presencia de Ha. La flecha blanca señala un micronúcleo. En ambos casos, el símbolo vacío representa el resultado obtenido con células V79 expuestas a la máxima

concentración de Ha ensayada (10  $\mu$ M), en ausencia de irradiación. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes ( $\pm$  D.S.).

#### 4. Conclusiones

Se demostró que las  $\beta$ Cs son capaces de inducir diversas modificaciones en el ADN extracelular: CSC, oxidaciones en las bases purínicas y pirimidínicas y, en ciertos casos, formación de dímeros de pirimidina. La especie mayormente responsable del daño observado es la forma protonada de cada alcaloide en su estado electrónico excitado ( $^1[\beta\text{CH}^+]$ ), dando lugar a reacciones de tipo I (mediadas por reacciones de transferencia electrónica).

Se observó una fuerte dependencia de las velocidades de fotosensibilización del ADN y la distribución de fotoproductos tanto con el pH como con la naturaleza química de las  $\beta$ Cs. Hay tres factores que están directamente implicados en la magnitud del daño producido al ADN: (i) las diferentes propiedades fotofísicas de las  $\beta$ Cs, (ii) las diferencias en la capacidad de interacción/unión de cada  $\beta$ C al ADN y (iii) la presencia de vías fotoquímicas adicionales, tales como foto-oxidaciones de bases y/o formación de dímeros de timina inducidas selectivamente por el fotosensibilizador.

Por otra parte, estos alcaloides también son capaces de inducir daño en el ADN intracelular, dando lugar a perfiles de daño diferenciales cuando se los compara con el daño observado en condiciones extracelulares. Más aún, muestran sobre cultivo celular eucariota una clara acción genotóxica y fototóxica. Consecuentemente, y dado que las  $\beta$ Cs forman parte constitutiva de numerosos organismos, incluido el ser humano, estos alcaloides deben ser considerados como potenciales agentes fotosensibilizadores endógenos.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen a ANPCyT (PICT 2012-0423 y PICT 2012-00888), CONICET (PIP 00400), UBA (X0055BA) y MinCyT-DAAD (Programa de Coop. DA/11/15). FMC, MMG, MV, MPD y REB son miembros de la Carrera del Investigador Científico del CONICET.

#### Referencias

- [1] L. K. Larsen, R. E. Moore & G. M. L. Patterson, *J. Nat. Prod.* 57, 419 (1994).
- [2] J. Torreilles, M. C. Guerin & A. Previero, *Biochimie*, 67, 929 (1985).
- [3] J. Adachi, Y. Mizoi, T. Naito, Y. Ogawa, Y. Uetani & I. Ninomiya, *J. Nutr.* 121, 646 (1991).
- [4] U. Breyer-Pfaff, G. Wiatr, I. Stevens, H. J. Gaertner, G. Mundle & K. Mann, *Life Sci.* 58, 1425 (1996).
- [5] S. Manabe, J. Yuan, T. Takahashi & R. C. Urban, Jr., *Exp. Eye Res.* 63, 179 (1996).
- [6] K. Pari, C. S. Sundari, S. Chandani & D. Balasubramanian, *J. Biol. Chem.* 275, 2455 (2000).
- [7] D. Fekkes, A. Tuiten, I. Bom & L. Pepplinkhuizen, *Neurosci. Lett.* 303, 145 (2001).
- [8] R. Spijkerman, R. van den Eijnden, D. van de Mheen, I. Bongers & D. Fekkes, *Eur. Neuropsychopharm.* 12, 61 (2002).
- [9] W. Pfau & K. Skog, *J. Chromatogr. B* 802, 115 (2004).

- [10] B. Hemmateenejad, A. Abbaspour, H. Maghami, R. Miri & M. R. Panjehshahin, *Anal. Chim. Acta* 575, 290 (2006).
- [11] T.-S. Kam, K.-M. Sim, T. Koyano & K. Komiyama, *Phytochemistry* 50, 75 (1999).
- [12] M. Caprasse, C. Coune & L. Angenot, *J. Pharm. Belg.* 1983, 38.
- [13] T.-S. Kam & K.-M. Sim, *Phytochemistry* 47, 145 (1998).
- [14] K. R. Downum, *New Phytol.* 122, 401 (1992).
- [15] M. A. Rashid, K. R. Gustafson & M. R. Boyd, *J. Nat. Prod.* 64, 1454 (2001).
- [16] P. S. Kearns, J. C. Coll & J. A. Rideout, *J. Nat. Prod.* 58, 1075 (1995).
- [17] S. J. Stachel, S. A. Stockwell & D. L. Van Vranken, *Chem. Biol.* 6, 531 (1999).
- [18] M. S. Siderhurst, D. M. James, C. D. Rithner, D. L. Dick & L. B. Bjostad, *J. Econ. Entomol.* 98, 1669 (2005).
- [19] E. D. Cox & J. M. Cook, *Chem. Rev.* 95, 1797 (1995).
- [20] T. Herraiz & J. Galisteo, *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 451, 42 (2014).
- [21] G. A. Gross, R. J. Turesky, L. B. Fay, W. G. Stillwell, P. L. Skipper & S. R. Tannenbaum, *Carcinogenesis* 14, 2313 (1993).
- [22] Y. Totsuka, H. Ushiyama, J. Ishihara, R. Sinha, S. Goto, T. Sugimura & K. Wakabayashi, *Cancer Lett.* 143, 139 (1999).
- [23] B. Holmstedt & J. Lindgren, *Psychopharmacol. Bull.* 14, 16 (1967).
- [24] F. Aricioglu & H. Altunbas, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1009, 196 (2003).
- [25] T. Herraiz, D. Gonzalez, C. Ancin-Azpilicueta, V. J. Aran & H. Guillen, *Food Chem. Toxicol.* 48, 839 (2010).
- [26] M. L. Alomar, F. A. Rasse-Suriani, A. Ganuza, V. M. Coceres, F. M. Cabrerizo & S. O. Angel, *BMC Res. Notes* 6, 193 (2013).
- [27] C. de Meester, *Mutat. Res.* 339, 139 (1995).
- [28] J. B. Hudson, E. A. Graham & G. H. Towers, *Photochem. Photobiol.* 43, 21 (1986).
- [29] J. B. Hudson, E. A. Graham, R. Fong, L. L. Hudson & G. H. Towers, *Photochem. Photobiol.* 44, 483 (1986).
- [30] M. M. Gonzalez, F. A. O. Rasse-Suriani, C. A. Franca, R. Pis Diez, Y. Gholipour, H. Nonami, R. Erra-Balsells & F. M. Cabrerizo, *Org. Biomol. Chem.* 10, 9359 (2012).
- [31] M. M. Gonzalez, M. P. Denofrio, F. S. Garcia Einschlag, C. A. Franca, R. Pis Diez, R. Erra-Balsells & F. M. Cabrerizo, *PhysChem. ChemPhys.* 16, 16547 (2014).
- [32] C. C. Chang, M. Castellazzi, T. W. Glover & J. E. Trosko, *Cancer Res.* 38, 4527 (1978).
- [33] T. Mori, A. Nakagawa, N. Kobayashi, M. W. Hashimoto, K. Wakabayashi, K. Shimoi & N. Kinae, *J. Radiat. Res.* 39, 21 (1998).
- [34] M. Vignoni, R. Erra-Balsells, B. Epe & F. M. Cabrerizo, *J. Photochem. Photobiol. B* 132, 66 (2014).
- [35] H. Nonami, M. Orcoyen, Y. Fukuyama, M. C. Biondic & R. Erra-Balsells, *An. Asoc. Quim. Argent.* 86, 81 (1998).
- [36] S. Boiteux, T. R. O'Connor, F. Lederer, A. Gouyette & J. Laval, *J. Biol. Chem.* 265, 3916 (1990).
- [37] E. Muller, S. Boiteux, R. P. Cunningham & B. Epe, *Nucleic Acids Res.* 18, 5969 (1990).
- [38] P. Salomaa, L. L. Schaleger & F. A. Long, *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1 (1964).
- [39] S. E. Braslavsky, *Pure Appl. Chem.* 79, 293 (2007).
- [40] G. Colmenarejo, M. Bárcena, M. Carmen Gutiérrez-Alonso, F. Montero & G. Orellana, *FEBS Lett.* 374, 426 (1995).
- [41] W. Bauer & J. Vinograd, *J. Mol. Biol.* 33, 141 (1968).
- [42] R. Atkinson, En: *Active Oxygen in Chemistry* (C.S. Foote, J.S. Valentine, A. Greenberg & J.F. Liebman, Editores), Vol.2, p. 289, Chapman & Hall, London, 1995.

- [43] B. Epe, J. Hegler & P. Lester, *Methods Enzymol.* 234, 122 (1994).
- [44] M. Pflaum, O. Will & B. Epe, *Carcinogenesis* 18, 2225 (1997).
- [45] K. W. Kohn, L. C. Erickson, R. A. G. Ewig & C. A. Friedman, *Biochemistry-US* 15, 4629 (1976).
- [46] A. P. Varela, H. D. Burrows, P. Douglas & M. Da Graça Miguel, *J. Photochem. Photobiol. A* 146, 29 (2001).
- [47] R. Sakurovs & K. P. Ghiggino, *J. Photochem.* 18, 1 (1982).
- [48] O. S. Wolfbeis, E. Furlinger & R. Wintersteiger, *Monatsh. Chem.* 113, 509 (1982).
- [49] F. T. Vert, I. Z. Sanchez & A. O. Torrent, *J. Photochem.* 23, 355 (1983).
- [50] M. M. Gonzalez, M. L. Salum, Y. Gholipour, F. M. Cabrerizo & R. Erra-Balsells, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8, 1139 (2009).
- [51] M. M. Gonzalez, J. Arnbjerg, M. P. Denofrio, R. Erra-Balsells, P. R. Ogilby & F. M. Cabrerizo, *J. Phys. Chem. A* 113, 6648 (2009).
- [52] F. M. Cabrerizo, J. Arnbjerg, M. P. Denofrio, R. Erra-Balsells & P. R. Ogilby, *ChemPhysChem.* 11, 796 (2010).
- [53] F. A. O. Rasse-Suriani, M. Paula Denofrio, J. G. Yañuk, M. M. Gonzalez, E. Wolcan, M. Seifermann, R. Erra-Balsells & F. M. Cabrerizo, *PhysChem. Chem Phys.* 18, 886 (2016).
- [54] H. Kishikawa, Y. P. Jiang, J. Goodisman & J. C. Dabrowiak, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 5434 (1991).
- [55] M. M. Gonzalez, M. Pellon-Maison, M. A. Ales-Gandolfo, M. R. Gonzalez-Baró, R. Erra-Balsells & F. M. Cabrerizo, *Org. Biomol. Chem.* 8, 2543 (2010).
- [56] M. M. Gonzalez, M. Vignoni, M. Pellon-Maison, M. A. Ales-Gandolfo, M. R. Gonzalez-Baro, R. Erra-Balsells, B. Epe & F. M. Cabrerizo, *Org. Biomol. Chem.* 10, 1807 (2012).
- [57] I. X. García-Zubiri, H. D. Burrows, J. Sérgio Seixas De Melo, J. Pina, M. Monteserín & M. J. Tapia, *Photochem. Photobiol.* 83, 1455 (2007).
- [58] J. Cadet, E. Sage & T. Douki, *Mutat. Res.* 571, 3 (2005).
- [59] P. D. Wood & R. W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 4256 (1996).
- [60] C. S. Foote, *Photochem. Photobiol.* 54, 659 (1991).
- [61] S. Boiteux & M. Guillet, *DNA Repair* 3, 1 (2004).
- [62] V. Duarte, D. Gasparutto, M. Jaquinod & J. Cadet, *Nucleic Acids Res.* 28, 1555 (2000).
- [63] B. Epe, *Rev. Physiol. Bioch.* 127, 223 (1995).
- [64] P. A. Srere, G. W. Kosicki & R. Lumry, *Biochim. Biophys. Acta* 50, 184 (1961).
- [65] J. L. Ravanat, T. Douki & J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* 63, 88 (2001).
- [66] T. Delatour, T. Douki, C. D'Ham & J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* 44, 191 (1998).
- [67] V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Cuquerella, J. V. Castell, F. Bosca & M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B* 111, 7409 (2007).
- [68] F. Bosca, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Cuquerella, J. V. Castell & M. A. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6318 (2006).
- [69] O. I. Tarzi, A. Ponce, F. M. Cabrerizo, S. M. Bonesi & R. Erra-Balsells, *ARKIVOC* 12, 295 (2005).
- [70] M. Fenech, *Mutat Res-Fund. Mol.* 455, 81 (2000).

*Manuscrito recibido el 28 de marzo de 2016*  
*Aceptado el 29 de abril de 2016*