

# Fotoproductos de la irradiación de soluciones acuosas de timidina con luz ultravioleta

ROGELIO MALDONADO-RODRIGUEZ,\* JUANA MERCEDES ESPINOSA-LARA \*  
Y RAUL ALCANTARA-GARCIA

Departamento de Bioquímica  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN  
Prol. de Carpio y Plan de Ayala  
Apartado Postal 42-186  
11340 México, D.F.

MALDONADO-RODRÍGUEZ, R., J. M. ESPINOSA-LARA Y R. ALCÁNTARA-GARCÍA, 1991. Fotoproductos de la irradiación de soluciones acuosas de timidina con luz ultravioleta. *An. Esc. nac. Cienc. biol, Méx.* **34**: 15-22.

**RESUMEN:** En este trabajo se investigó la transformación de la timidina en solución acuosa por irradiación con una dosis de luz ultravioleta que destruye aproximadamente 50% de la absorbencia original de la timidina. Los fotoproductos fueron separados por cromatografía en papel e identificados adicionalmente por métodos químicos y espectrofotométricos. La 5-hidroximetil-desoxiuridina y la desoxiuridina fueron identificados como productos de la reacción, adicionalmente se obtuvieron evidencias que sugirieron la producción de 5-formil-desoxiuridina y de 5-carboxi-desoxiuridina. Estos resultados permiten sugerir que la luz ultravioleta produjo la oxidación del metilo de la timidina en forma similar a la reportada en la timina es decir metil-hidroximetil-formil-carboxil-descarboxilación. Se propone que alguno de estos compuestos puede tener participación en el efecto biológico de la luz ultravioleta o del formaldehído.

## INTRODUCCIÓN

La irradiación de los seres vivos con luz ultravioleta (UV) produce efectos letales y mutagénicos (13, 15, 17). Las pirimidinas de los ácidos nucleicos son las sustancias a las que se ha atribuido la sensibilidad de los organismos a la radiación ultravioleta (22). Entre los fotoproductos numerosos aislados como consecuencia de la modificación de las pirimidinas por la luz de 220 a 300 nm, los dímeros de pirimidinas y el fotoproducto espora (también conocido como fotoproducto 6-4 ó 5-timinil-5,6-dihidrotimina) se han podido correlacionar con los efectos biológicos de la luz UV (4, 21, 24, 25). Por su reversibilidad los hidratos de pirimidinas no parecen tener ninguna relación con los efectos biológicos de la luz UV (22). No se ha estudiado el papel de los fotoproductos, que resultan de la oxidación del metilo de la timina por acción de la luz UV (1) o por la radiación ionizante (6). El objeto del presente trabajo, consistió en investigar el comportamiento

---

\* Becario de la DEDICT-COFAA del IPN.

fotofísico de la timidina para comparar si se producen los compuestos correspondientes a los aislados a partir de la irradiación de la timina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Una solución acuosa de timidina 1 milimolar fue irradiada con una dosis de luz UV suficiente para reducir la absorción del compuesto a la mitad (Fig. 1). Para obtener este efecto se iluminó durante 20 horas con un juego de siete lámparas germicidas General Electric de 15 watts, colocando la solución en tubos de cuarzo a 1 cm de distancia de las lámparas 500 ml de solución irradiada se concentraron hasta 0.5 ml en un evaporador rotatorio. Una pequeña alícuota se analizó espectrofotométricamente (Fig. 1) y el remanente se dejó reposar una noche en el cuarto frío para precipitar el exceso de timidina, posteriormente se sometió el sobrenadante a cromatografía en papel en el solvente 1 (propanol: hidróxido de amonio: agua 35:15:5) incluyendo los testigos de hidroximetil (5-HMdU) y formil desoxiuridina (5-FdU) y revelando las bandas por su absorción de la luz ultravioleta, todas las bandas obtenidas fueron identificadas por análisis espectrofotométrico, la banda intermedia, que pareció ser una mezcla de varios compuestos, fue separada en dos nuevas bandas por cromatografía en un segundo solvente (butanol: ácido acético: agua, 50:25:25). La primera de estas dos bandas fue recromatografiada en el solvente 1 y sus componentes identificados espectrofotométricamente.

La identificación de desoxiuridina como producto de la eliminación del grupo metilo, se hizo por el análisis cromatográfico y espectrofotométrico de esta sustancia antes y después de someter a hidrólisis ácida (una hora a 100°C de la solución problema o testigo en HCl 4 N en una ampolla sellada al vacío).

En algunos casos se identificó la desoxirribosa de los productos por la reacción de la difenilamina (3).

## RESULTADOS

El sobrenadante del concentrado produjo en la primera cromatografía, en el solvente 1, tres bandas denominadas A, B y C cuyos espectros a pH ácido se muestran en la figura 2A; en la figura 2B se presenta el espectro de la banda A a pHs ácido y alcalino. La banda B recromatografiada en el segundo solvente se resolvió en dos bandas, Ba y Bb. La banda Bb cuando se sometió a los estudios cromatográficos y espectrofotométricos, antes y después de hidrólisis ácida, junto con uracilo y desoxiuridina testigos, produjo los espectros de absorción que se muestran en la figura 3 y sus Rf fueron idénticos a los de desoxiuridina y uracilo antes y después de hidrolizar respectivamente. La banda Ba fue recromatografiada nuevamente en el solvente 1, separándose en dos nuevas bandas designadas Baa y Bab, estas bandas mostraron los espectros de absorción de la figura 4 respectivamente. El compuesto de la banda Baa dio reacción positiva con la fenilhidracina por el método de Lappin y Clark (18), en cambio todos los demás compuestos fueron negativos a esta misma reacción.

En la tabla 1 se conjuntan las movilidades cromatográficas y los datos espectrofotométricos de todas las bandas separadas a partir de la solución de timidina irradiada incluyendo los datos de las sustancias control disponibles.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La irradiación con la dosis de luz ultravioleta utilizada produjo la transformación del 50% de la solución 1 milimolar de timidina a compuestos que no absorben luz ultravioleta. De los compuestos que absorben luz UV, aproximadamente el 5% se transformó a nuevos productos ya que ninguno de ellos correspondió a alguno de los siguientes fotoproductos previamente reportados. El dímero, sólo se produjo iluminando soluciones congeladas de timina (1) o soluciones de DNA (5), el fotoproducto espóra se generó al irradiar soluciones deshidratadas, de DNA o esporas de *Bacillus subtilis* (10), el hidrato es muy inestable regenerando rápidamente el compuesto original (22).

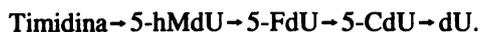
La primera sustancia identificada con certidumbre como producto del tratamiento de la timidina con la luz ultravioleta fue la desoxiuridina, los Rf y los datos espectrofotométricos coincidieron, tanto con los del testigo como con los datos teóricos; además, cuando se le hidrolizó se transformó como era de esperarse a la base correspondiente, es decir a uracilo, lo cual se verificó similarmente con el control adecuado.

Otro producto identificado con bastante certidumbre fue la 5-hidroximetildesoxiuridina (5-HMdU) ya que su base y su nucleósido, sintetizados en nuestro laboratorio, tienen similar espectro de absorción a pH ácido pero difieren porque la presencia del azúcar en el nucleósido impide el corrimiento del pico máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores. El compuesto de la banda Bab presentó las características espectrofotométricas correspondientes al nucleósido del 5 hidroximetil uracilo.

El compuesto aislado de la banda Baa presentó dos picos a pH ácido. Este comportamiento es similar al mostrado por el 5-formiluracilo, la presencia del grupo formaldehído en esta banda fue confirmada por su reactividad con fenilhidracina. Se encontraron dos diferencias entre el 5-formiluracilo y su desoxinucleósido, el 5-FdU presentó mayor movilidad cromatográfica la cual coincidió con la reportada por Cline (19), además dio reacción positiva a la presencia de la desoxirribosa por el método de la difenilamina. Por estas razones se piensa que esta sustancia correspondió al 5-formil-desoxinucleósido del uracilo.

Aunque no se tienen testigos de 5-carboxidesoxiuridina (5-CdU), se piensa que el compuesto de la banda A puede corresponder a este desoxinucleósido, primero porque su máximo de absorción está arriba de los 270 nm lo cual ocurrió con el carboxiuracilo y segundo porque este máximo se conservó al alcalinizar su solución.

Con estos resultados se puede sugerir la siguiente serie de oxidaciones sucesivas del metilo de la timidina hasta su transformación a desoxiuridina.



La sensibilidad del metilo de la timina a la radiación ionizante se incrementa a pH alcalino (20), por esta razón es poco posible que las timinas de los ácidos nucleicos puedan "in vivo" sufrir también estas transformaciones como consecuencia de la radiación con luz ultravioleta; sin embargo, considerando que cualquier fotoproducto aun en bajo rendimiento puede ser letal o mutagénico para la célula (26), se puede sugerir que los derivados 5-formil y 5-carboxil pueden originar cambios tautoméricos similares a los inducidos por el 5-bromouracilo (23).

De todos los fotoproductos obtenidos, el más estudiado es la 5-hidroximetildesoxiuridina; a esta sustancia se le ha encontrado substituyendo a la timidina en el DNA de algunos

fagos de *Bacillus subtilis* (16). Su adición a cultivos de tejidos produce efectos citopáticos (9). Por otra parte, se ha reportado que el formaldehído es una sustancia mutagénica (14) que transforma el uracilo a su 5-hidroximetil derivado (7, 12). La desaminación espontánea de citosina a uracilo (11), en el DNA, es corregida por la acción de la uracil-glicosilasa (19); en la eventualidad de que este uracilo, proveniente de la citosina, sea transformado por el formaldehído a su derivado 5-hidroximetilado se evitará su eliminación quedando así accesible para producir mutación por la substitución de base correspondiente. El resultado de esta doble transformación sería equivalente al que se produce por la desaminación de la 5-metilcitosina (4).

### SUMMARY

In this work was searched the effect of UV light on thymidine in aqueous solution, for this purpose chromatographic, chemical and spectrophotometric techniques were used. As products of the irradiation 5-hydroxymethyldeoxyuridine (5-HMdU) and deoxyuridine (dU) were identified. Additionally two more compounds were obtained, one with aldehyde properties proposed as 5-formyldeoxyridine (5-FdU), the other one with some properties expected from 5-carboxydeoxyridine (5-CdU). Therefore was concluded that the methyl group was oxidized as happened in the thymine. It is possible that some of this substances have importance in the biological effects of formaldehyde or UV light.

### REFERENCIAS

1. ALCÁNTARA, G.R. and S.Y. WANG, 1965. Photochemistry of thymine in aqueous solution. *Photochem. Photobiol.* **4**: 471-479.
2. BEUKERS, R. and W. BERENDS, 1960. Isolation and identification of the irradiation products of thymine. *Biochim. Biophys. Acta.* **41**: 550-551.
3. BRADY, T.G. and E. McEVoy-BOWE, 1951. Application of the Dische diphenylamine reaction to pyrimidine deoxynucleosides. *Nature.* **168**: 299-300.
4. BRASH, D.E. and W.A. HASLTINE, 1982. UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots. *Nature.* **298**: 189-192.
5. BRIDGES, B.A. and F. SHERIL, 1988. Mutagenic DNA repair in excision proficient umu C and lex A bacteria as revealed by delayed photoreversal. *Mutagenesis* **1**: 111-117.
6. CADET, J. and R. TEOULE, 1974. Radiation chemistry of nucleic acids. Characterization of thymine hydroxi-hydroperoxides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**: 1047-1052.
7. CLINE, R.E. and R.M. FINK, 1959. Synthesis of 5-substituted pyrimidines via formaldehyde addition. *J. Am. Chem. Soc.* **81**: 2524-2530.
8. CLINE, R.E., K. FINK and R.M. FINK, 1963. Paper chromatography of several classes of compounds: correlated Rf values in a variety of solvent systems. *Anal. Chem.* **35**: 384-394.
9. COSMA, G.M., R. JAMASBI and A.C. MARCHOCK, 1988. Growth inhibition and DNA damage induced by benzo (a) pyrene and formaldehyde in primary cultures of rat tracheal epithelial cells. *Mutation Res.* **201**: 161-168.
10. DONNELLAN J.E. and R.B. SETLOW, 1965. Thymine photoproducts but not thymine dimers found in ultraviolet-irradiated bacterial spores. *Science.* **149**: 308-310.

11. DUNCAN, B.K. and J. MILLER. 1984. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature*. **287**: 560-561.
12. GUPTA, V.S. and G.L. BUBBAR. 1971. Synthesis and properties of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine and its alfa anomer. *Can. Journal of Chemistry*. **47**: 719-723.
13. HOLLAENDER. A., M.F. JONES and L. JACOBS. 1940. The effects of monochromatic ultraviolet radiation on eggs of the nematode, *Enterobius vermicularis* 1. Quantitative response. *Jour. Parasitol.* **26**: 421-432.
14. JOHNSEN, R.C. and D.L. BAILLIE, 1988. Formaldehyde mutagenesis of the eT1 balanced region in *Caenorhabditis elegans*. Dose response curve and the analysis of mutational events. *Mutation Res.* **201**: 137-142.
15. JONES, M.J., L. JACOBS and A. HOLLAENDER. 1940. The effects of monochromatic ultraviolet radiation on eggs of the nematode, *Enterobius vermicularis* 11. Sublethal effects. *Jour. Parasitol.* **26**: 435-445.
16. KALLEN, R.G., M. SIMON and J. MARMUR. 1962. The occurrence of a new pyrimidine base replacing thymine in a bacteriophage DNA: 5-Hydroxymethyluracil. *J. Mol. Biol.* **5**: 248-250.
17. KENDRICK, C.S. and G.H. PHILIP, 1969. "Molecular photobiology. Inactivation and recovery". *Academic Press*. N.Y. and London. pág. V-VI.
18. LAPPIN, G.R. and L.C. CLARK. 1951. Quantification of aldehydes. *Anal. Chem.* **23**: 541-542
19. LINDAHL, T., 1974. An N-glycosylase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc. Natl. Acad. of Sci. U.S.A.* **71**: 3649-3653.
20. MYERS, L.S. Jr., J.F. WARD; W.T. TSUKAMOTO; D.E. HOLMES and J.R. JULCA. 1965. Radiolysis of thymine in aqueous solutions: Change in site of attack with change in pH. *Science*, **148**: 1234-1235
21. SETLOW, R.B., 1968. The photochemistry, photobiology and repair of polynucleotides. *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.* **8**: 257-296.
22. SINSHEIMER, R.L. and R. HASTINGS, 1949. A reversible photochemical alteration of uracil and uridine. *Science*. **110**: 525-526.
23. SKOPEK, T.R. and F. HUTCHINSON. 1982. DNA base sequence changes induced by bromouracil mutagenesis of lambda phage. *J. Mol. Biol.* **159**: 19-33.
24. VARGHESE, A.J., 1970. 5 thymine-5, 6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**: 484-490.
25. VARGHESE, A.J. and S.Y. WANG, 1967. Ultraviolet irradiation of DNA "in vitro" and "in vivo" produces a third thymine derived product. *Science*: **156**: 955-957.
26. WARD, J.F., 1975. Molecular mechanisms of radiation induced damage to nucleic acids. *Adv. Rad. Biol.* **5**: 181-239.

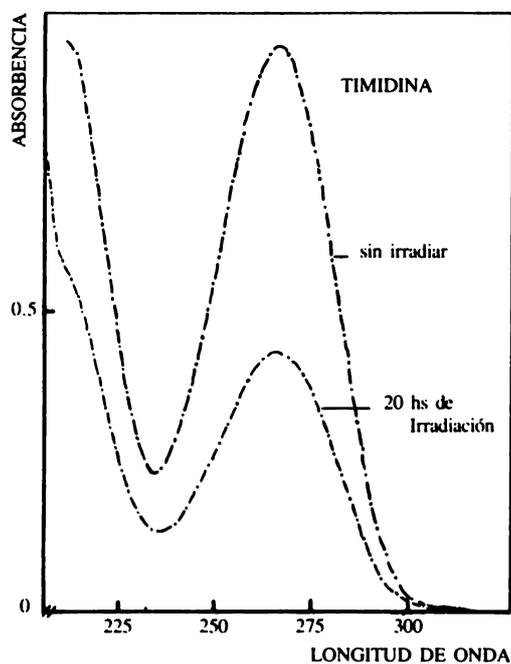


FIG. 1. Espectros de absorción de la timidina antes y después de la irradiación con luz ultravioleta.

TABLA 1. Rf y valores espectrofotométricos de las sustancias eluidas desde las bandas cromatográficas.

Solvente 1 = propanol: hidróxido de amonio: agua, 35:15:5. Solvente 2 = butanol: acético: agua, 50:25:25. La banda Baa tiene a pH ácido dos picos de absorbencia.

Banda	Rf		longitud de onda (nm)				Identificación probable
	Solvente 1	Solvente 2	pH 2		pH 12		
			máx.	mín.	máx.	mín.	
A	0.39	—	271	246	274	252	5-CdU
B	0.53	—	262.5	238	263	250	
C	0.69	—	266.5	234	266.5	239	dT
Ba	—	0.59	No presentó picos de absorción				
Bb	—	0.63	262	232	262	244	dU
Bb hidrolizada	—	0.61	259	227	282	242	
Baa	0.50	—	275	253			
			243	230	282	252	5-FdU
Bab	0.55	—	264	234	264	248	5-HMdU
TdR	0.69	—	267	234	266.5	239	
UdR	0.53	—	262	235	262	242	
U	—	—	259	227	282	242	
hMUdR	—	—	264	234	264	244	

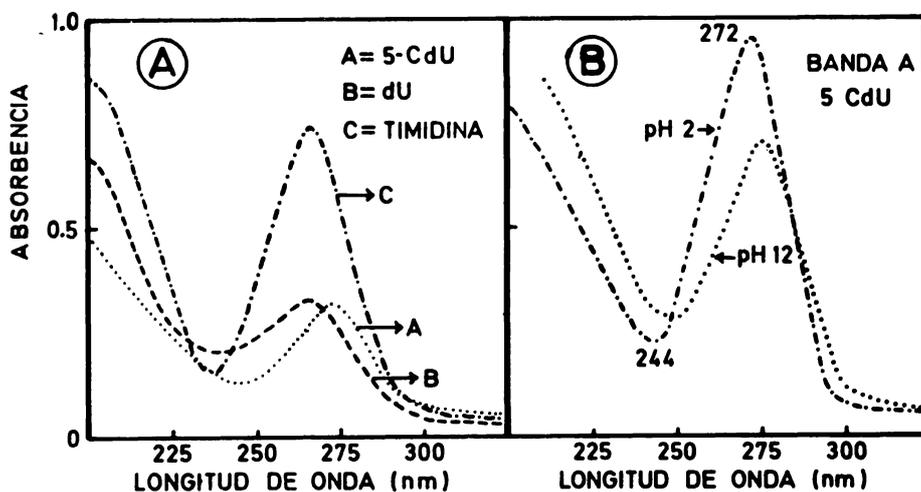


FIG. 2. Espectros de absorción de las bandas A, B, y C. Panel 2A espectros a pH ácido. Panel 2B espectro de la banda A en la acidez y en la alcalinidad.

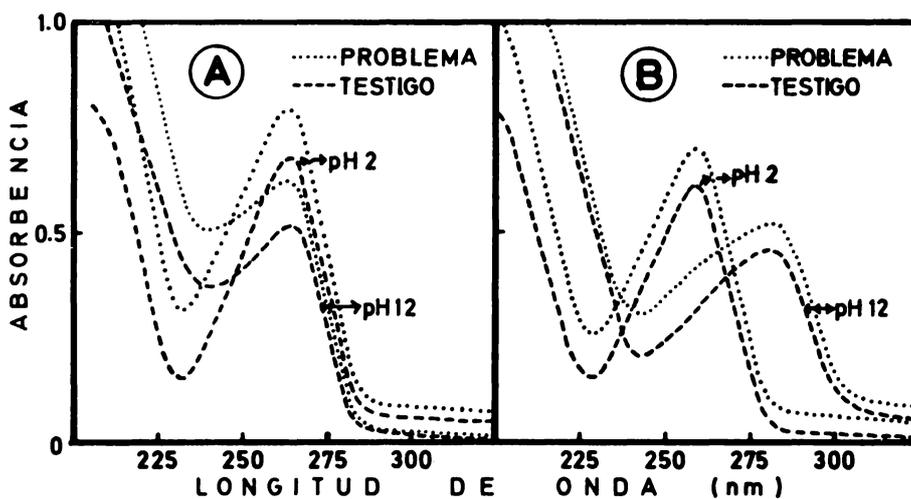


FIG. 3. Espectros de absorción de la banda Bb y de la desoxiuridina antes (panel 3A) y después (panel 3B) de hidrólisis ácida.

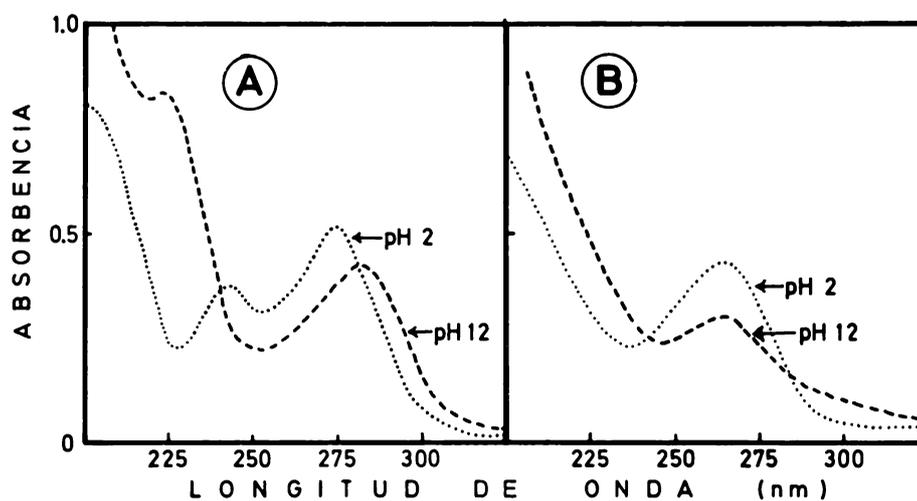


FIG. 4. Espectros de absorción de las bandas; Baa (panel A), identificada como 5-FdU y Bab (panel B) identificada como 5-HMdU.

Abreviaciones: 5-CdU 5-carboxidesoxiuridina.  
 dU 2-desoxiuridina.  
 5-FdU 5-formildesoxiuridina.  
 5-HMdU 5-hidroximetildesoxiuridina.  
 TdR 2-desoxitimidina.