



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
UNIDAD QUERÉTARO**

Tesis

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA AVANZADA

**Estudio de la degradación de las bases heterocíclicas
del ADN en soluciones acuosas de aminas**

ALUMNO

Julio César González Olvera

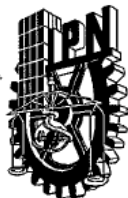
Directores de tesis:

Dr. Reynaldo Carlos Pless Elling

Dra. Eva González Jasso

Querétaro, Qro. Junio de 2011





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Querétaro, Qro., siendo las 12:00 horas del día 26 del mes de mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-QRO para examinar la tesis titulada:

Estudio de la degradación de las bases heterocíclicas del ADN en soluciones acuosas de aminas

Presentada por el alumno:

González
Apellido paterno

Olvera
Apellido materno

Julio César
Nombre(s)

Con registro:

A	0	9	0	0	7	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Reynaldo Carlos Pless Elling

Dra. Eva González Jasso

Dra. María Alejandra Rojas Molina

Dr. Pedro Alberto Vázquez Landaverde

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Jorge Adalberto Huerta Ruelas



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
CIENCIA APLICADA
TECNOLOGÍA AVANZADA
UNIDAD QUERÉTARO



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Santiago de Querétaro, el día 30 del mes mayo del año 2011, el que suscribe Julio César González Olvera alumno del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada con número de registro A090078, adscrito a CICATA-IPN Unidad Querétaro, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dres. Reynaldo Carlos Pless Elling y Eva González Jasso y cede los derechos del trabajo intitulado Estudio de la degradación de las bases heterocíclicas del ADN en soluciones acuosas de aminas, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: gonzalezolvera@yahoo.com.mx, rpless@ipn.mx o eglezjasso@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Julio César González Olvera

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida y salud. A mi esposa Ma. Isabel Olvera Ramos, mi hija Valeria González Olvera y mis padres por su apoyo incondicional y confianza en todo momento.

A los directores del proyecto, Dr. Reynaldo Pless Elling y Dra. Eva González Jasso por darme la oportunidad de participar en este proyecto, y por su extraordinario apoyo, su paciencia y sus enseñanzas que fueron parte fundamental para hacer posible este proyecto. A mi comité tutorial por todas sus sugerencias y comentarios. A mis compañeros por todo el apoyo que me brindaron durante todo el proyecto.

Al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del I.P.N., Unidad Querétaro, por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por las becas y apoyos otorgados. El HPLC fue adquirido de fondos del proyecto de Ciencia Básica CONACYT No. 61322. Esta investigación forma parte del proyecto de Ciencia Básica CONACYT No. 61322.

Índice general

Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	VII
1. Introducción	5
2. Marco teórico	8
2.1. Importancia biológica de los ácidos nucleicos	8
2.2. Estructura de los ácidos nucleicos	10
3. Antecedentes	20
3.1. Las bases heterocíclicas en ambientes alcalinos	20
3.2. Secuenciación química del ADN	22
3.3. Variantes de la secuenciación química del ADN	30
4. Justificación	36
5. Objetivos	38
6. Materiales y métodos	40
6.1. Ensayos de composición del eluente	43
6.2. Análisis cinético	44
6.3. Identificación de productos de la reacción	47
7. Resultados y discusión	48
7.1. Ensayos de composición del eluente	48

7.2. Reacciones de pirrolidinólisis de desoxinucleósidos	57
7.3. Pirrolidinólisis de adenosina	72
7.4. Efecto de la temperatura en la reacción de 2'-dAdo	74
7.5. Amonólisis de 2'-dAdo y 2'-dGuo	76
7.6. Efecto de la concentración de la pirrolidina	79
7.7. Efecto isotópico del solvente en la reacción	81
7.8. Ensayos de solventes acuoso-etanólicos en la reacción de 2'-dAdo	82
7.9. Cinética de la pirrolidinólisis de d-TAT y d-TGT	85
7.10. Pirrolidinólisis de bases libres y 2-desoxirribosa	91
7.11. Identificación de productos de la reacción	100
7.11.1. Identificación de los productos de la reacción de la 2'-dAdo con pirrolidina	100
7.11.2. Identificación de los productos de la reacción de la 2'-dCyd con pirrolidina	105
8. Conclusiones	108
9. Recomendaciones	110
Bibliografía	111

Índice de Figuras

2.1. Estructura primaria de un tramo de ADN	12
2.2. Apareamiento de bases que tiene lugar en el ADN	15
2.3. Ejemplo de la estructura de horquilla formada en el ARN	16
2.4. Ejemplo de una estructura conocida como nudo falso formada en el ARN	17
2.5. Diferentes conformaciones que adopta el ADN de doble cadena	18
3.1. Mecanismo del cercenamiento químico específico para posiciones A y G en el ADN	25
3.2. Mecanismo del cercenamiento químico específico para posiciones G en el ADN	26
3.3. Mecanismo del cercenamiento químico para posiciones T en el ADN	27
3.4. Ejemplo de secuenciación por fragmentación química del ADN	29
3.5. Ejemplo de un autorradiograma de secuenciación obtenido a partir de la aminólisis de oligómeros comerciales radiomarcados en su terminal 5' . . .	31
3.6. Mecanismo de reacción de la 2'-dAdo con formamida	32
3.7. Mecanismo de reacción de la 2'-dCyd con formamida	33
6.1. Espectro de masas del oligonucleótido d-TAT	41
6.2. Espectro de masas del oligonucleótido d-TGT	42
7.1. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de la elución isocrática de 2'-desoxinucleósi- dos, utilizando CH ₃ CN/MeOH (77:23, v/v) como eluyente	49
7.2. Espectros de absorción de la doble banda formada por la 2'-dCyd, tras su análisis por HPLC con CH ₃ CN/MeOH (77:23, v/v) como eluyente	50

7.3. Cromatograma de 20 μ L de 5 % agua-95 % CH ₃ CN/MeOH (77:23, v/v), utilizando CH ₃ CN/MeOH (77:23, v/v) como eluente	51
7.4. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de la elución isocrática de 2'-desoxinucleósidos, utilizando CH ₃ CN/MeOH (90:10, v/v) como eluente	53
7.5. Cromatograma de 20 μ L de 5 % agua-95 % CH ₃ CN/MeOH (90:10, v/v), utilizando CH ₃ CN/MeOH (90:10, v/v) como eluente	54
7.6. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de la elución isocrática de 2'-desoxinucleósidos, utilizando CH ₃ CN/MeOH (85:15, v/v) como eluente	55
7.7. Cromatograma de 20 μ L de 5 % agua-95 % CH ₃ CN/MeOH (85:15, v/v), utilizando CH ₃ CN/MeOH (85:15, v/v) como eluente	56
7.8. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dAdo tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	58
7.9. Espectros de absorción de los productos de la pirrolidinólisis de 2'-dAdo .	59
7.10. Cinética de la descomposición de la 2'-dAdo con pirrolidina a 500 mM, a 110°C	60
7.11. Cinética de la aparición de los productos de la pirrolidinólisis de 2'-dAdo a 110°C	62
7.12. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dGuo tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	63
7.13. Perfil cromatográfico de la 2'-dGuo, a 280 nm, tras pirrolidinólisis a 110°C por 96 h	64
7.14. Espectros de absorción de los productos de la pirrolidinólisis de 2'-dGuo .	65
7.15. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dThd, tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	66
7.16. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dCyd tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	68
7.17. Espectros de absorción de los productos de la pirrolidinólisis de 2'-dCyd .	69
7.18. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dUrd tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	70
7.19. Espectro de absorción del producto principal de la pirrolidinólisis de 2'-dUrd	71

7.20. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la adenosina, tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	72
7.21. Cinética de la pirrolidinólisis de la adenosina a 110°C	73
7.22. Gráfica de Arrhenius de la reacción de 2'-dAdo en solución acuosa de pirrolidina a 500 mM.	75
7.23. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dAdo, tras amonólisis por diferentes tiempos de reacción	77
7.24. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dGuo, tras amonólisis por diferentes tiempos de reacción	78
7.25. Constantes de velocidad para la pirrolidinólisis de 2'-dAdo a 110°C, a diferentes concentraciones de amina	79
7.26. Cinética de la descomposición de la 2'-dAdo con pirrolidina a 110°C, utilizando óxido de deuterio como solvente	81
7.27. Cinética de la descomposición de la 2'-dAdo en solventes acuoso-etanólicos a 50 %, 75 % y 95 % de etanol, a 110°C	83
7.28. Cinética de la pirrolidinólisis de 2'-dAdo en etanol-agua (30:70, v/v), a 110°C	83
7.29. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para d-TAT tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	85
7.30. Espectro de absorción de los productos de la pirrolidinólisis de d-TAT	86
7.31. Cinética de la pirrolidinólisis de d-TAT, en solución acuosa, a 110°C	88
7.32. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para d-TGT tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	89
7.33. Cinética de la pirrolidinólisis de d-TGT, en solución acuosa, a 110°C	90
7.34. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de adenina tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	92
7.35. Cinética de la adenina en pirrolidinólisis a 110°C	93
7.36. Espectro de absorción del producto de la pirrolidinólisis de adenina	94
7.37. Perfiles cromatográficos, a 260 nm, de guanina tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	95
7.38. Espectros de absorción de los productos de la pirrolidinólisis de guanina	96

7.39. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de citosina tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	97
7.40. Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de 2-desoxirribosa tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción	98
7.41. Espectros de absorción de los productos de la pirrolidinólisis de 2-desoxirribosa	99
7.42. Comparación de tiempos de retención en la columna de la supuesta adenina con su estándar	101
7.43. Espectros de absorción de la supuesta adenina en solución acuosa, a distintos valores de pH	102
7.44. Mecanismo de reacción de la pirrolidinólisis de 2'-dAdo a 110°C	104
7.45. Espectros de absorción del supuesto uracilo en solución acuosa, a distintos valores de pH	106
7.46. Espectros de absorción reportados para uracilo en solución acuosa	107

Índice de Tablas

7.1. Comparación de tiempos de retención de los nucleósidos utilizando como eluente CH ₃ CN/MeOH (77:23, v/v)	52
7.2. Comparación de tiempos de retención de los nucleósidos utilizando como eluente CH ₃ CN/MeOH (90:10, v/v)	54
7.3. Comparación de tiempos de retención de los nucleósidos utilizando como eluente CH ₃ CN/MeOH (85:15, v/v)	56
7.4. Resultados cinéticos de las reacciones de pirrolidinólisis de los 2'-desoxinucleósidos, a 110°C	61
7.5. Valores de <i>k</i> para la pirrolidinólisis de la 2'-dAdo a diferentes temperaturas	74
7.6. Valores de <i>k</i> para la pirrolidinólisis de la 2'-dAdo a diferentes concentraciones de esta amina	80
7.7. Resultados cinéticos de pirrolidinólisis de 2'-dAdo y 2'-dGuo en solventes acuoso-etanólicos	84
7.8. Comparación de los datos espectrales de la supuesta adenina con datos reportados en la literatura	103
7.9. Comparación de los datos espectrales del supuesto uracilo con datos reportados en la literatura	106

Lista de Símbolos y Abreviaturas

Abreviación	Descripción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
A	Unidad de 2'-desoxiadenilato en el ADN
2'-dAdo	2'-desoxiadenosina
Ade	Adenina
C	Unidad de 2'-desoxicitidilato en el ADN
2'-dCyd	2'-desoxicitidina
Cyt	Citosina
G	Unidad de 2'-desoxiguanilato en el ADN
2'-dGuo	2'-desoxiguanosina
Gua	Guanina
T	Unidad de 2'-desoxitimidilato en el ADN
2'-dThd	2'-desoxitimidina
Thy	Timina
U	Unidad de 2'-desoxiuridilato en el ADN
2'-dUrd	2'-desoxiuridina
Ura	Uracilo
CH ₃ CN	Acetonitrilo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
MeOH	Metanol
UV	Ultravioleta

Símbolo	Descripción
cm	Centímetro
°C	Grado centígrado
ϵ	Constante dieléctrica
ϵ	Coefficiente molar de extinción
h	Hora
K	Kelvin
kcal	Kilocaloría
kJ	Kilojoule
ln	Logaritmo de base e
μL	Microlitro
M	Molar
min	Minuto
mol	Mol
nm	Nanómetro
pH	Potencial del ión hidronio
K_a	Constante de ionización
$\text{p}K_a$	Logaritmo de base 10 del valor numérico de $1/K_a$

Resumen

El presente trabajo es un estudio de las reacciones de las bases heterocíclicas del ADN en solución acuosa de aminas a temperaturas elevadas, utilizando como modelo simples 2'-desoxinucleósidos o, en algunos casos, oligonucleótidos cortos.

Se ha supuesto que la respuesta diferencial de los diferentes tipos de sitio en el ADN se debe a diferencias en la reactividad de las diversas bases heterocíclicas con las aminas, ya que la etapa inicial en el proceso que lleva al corte de la cadena de ADN es la labilización química de las nucleobases, seguida de dos eliminaciones β en rápida sucesión que conducen al rompimiento de la cadena en la posición atacada. En las reacciones modelo se monitoreó la desaparición de los nucleósidos modelo y se determinaron las correspondientes tasas de degradación. Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa con las tasas de reacción que en trabajos anteriores habían sido estimadas para las correspondientes bases en el entorno oligonucleotídico en las mismas condiciones, con excepción de la adenina, cuyos datos coinciden aproximadamente en ambos casos. Para el caso de la reactividad del grupo guanina en el nucleósido, se encontró una diferencia considerable entre ambos resultados. Probablemente esta diferencia se deba al efecto del campo eléctrico de los grupos fosfato presente en los oligonucleótidos y ausente en el caso de los nucleósidos. La diferencia más importante se encontró en la reactividad de la 2'-dThd, cuya tasa de aminólisis es más lenta por un orden de magnitud en comparación con el estimado reportado para las bases timina en oligonucleótidos. Esta amplia diferencia puede deberse al efecto de radiólisis promovida por el ^{32}P que se había utilizado en los estudios con oligonucleótidos. Los residuos de citosina en el desoxinucleósido, de manera inesperada, mostraron una mayor velocidad de reacción que la tasa de cercenamiento estimada para posiciones C en polinucleótidos en condiciones comparables.

Con base en estos resultados, se examinaron diferentes condiciones para estas reacciones. Se utilizó el amoníaco como una amina de menor basicidad, logrando que el grupo guanina tuviera una mayor reactividad, coincidiendo con las observaciones hechas para oligonucleótidos. Para las reacciones con la 2'-dAdo, el aumento en la concentración de la amina, usando pirrolidina, redundó en un incremento monótono de la velocidad de la reacción. El empleo de solventes acuoso-etanólicos, a diferentes composiciones, también fue examinado. Los resultados mostraron, para el caso de la 2'-dAdo, un retardamiento de la reacción en estos solventes, interpretado como un efecto de la disminución de la constante dieléctrica, que dificultaría la formación del zwitterión, paso importante de la reacción. Para la aminólisis de la 2'-dGuo se observaron efectos encontrados de cambio de la tasa de reacción para diversas composiciones del solvente, probablemente reflejando efectos opuestos de la disminución de la constante dieléctrica del solvente: desestabilización del zwitterión inicial, que ralentiza la reacción, y represión de la ionización del grupo guanina, efecto que aumenta la tasa de reacción observada.

En los aminolisatos resultantes de la degradación de la 2'-dAdo por varias horas fue identificada la base libre adenina, mediante comparación de tiempos de retención en la columna con el estándar, y analizando el producto aislado por espectrofotometría UV en solución acuosa a diferentes valores de pH. Los resultados obtenidos sugieren el rompimiento del enlace N-glicosídico de la molécula, formándose los productos primarios adenina y 2-desoxirribosa.

En los perfiles cromatográficos resultantes del análisis por HPLC de la mezcla de reacción, también se observó una banda que se puede interpretar como un producto de la termólisis de la 2-desoxirribosa. En los aminolisatos de los trinucleótidos, d-TAT y d-TGT, otro producto nuevo se interpreta como la 3-acetilacroleína, derivada del grupo desoxirribosa. En el caso de la 2'-dGuo no se identificaron productos de la reacción, posiblemente por problemas de solubilidad. Para la degradación de la 2'-dCyd, este nucleósido sufre desaminación hidrolítica en la posición C-4, formándose la 2'-dUrd, que a su vez, reacciona con la pirrolidina para rendir la base uracilo. Estos productos fueron identificados de forma similar a la adenina resultante de la degradación de 2'-dAdo.

Summary

The present work is a study of the reactions undergone by the heterocyclic bases of DNA in aqueous amine solutions at high temperature, using as simple models 2'-deoxynucleosides or, in some cases, short oligonucleotides.

It is thought that the differential response of the various types of site in the DNA is due to differences in the reactivity of the various heterocyclic bases with the amines, as the initial step in the cleavage of the DNA chain is the chemical labilization of the nucleobases, followed by two β eliminations in rapid succession, which lead to scission of the chain at the position initially attacked. In the model reactions which were studied, the degradation of the nucleosides was monitored as a function of time, and the corresponding pseudo-first-order rate constants for their disappearance were determined. The results obtained show a significant difference from the reaction rates which had been roughly estimated for the corresponding bases in the oligonucleotide setting, under the same conditions, with the exception of adenine, where the data approximately coincide. As to the reactivity of the guanine group, a considerable difference was found between the two situations. This difference is probably due to the effect of the electric field of the phosphate groups located in the oligonucleotides, which are absent in the nucleoside case. The largest difference was seen in the reactivity of 2'-deoxythymidine, whose rate of aminolysis was slower by about one order of magnitude compared to the estimate reported for thymine bases in oligonucleotides. Against expectation, the cytosine group in the deoxynucleoside showed an increased reaction rate compared to the rate of scission of C positions in polydeoxyribonucleotides, under comparable aminolysis conditions.

Based on these results, different reaction conditions were explored. Ammonia was used as an amine of lower basicity, obtaining in this case a greater reactivity for the guanine moiety, in line with the observations made with oligonucleotides. An increase in the concentration of the amine, pyrrolidine, resulted in a monotonous rise in reaction rate. The use of ethanol-water solvents of different compositions was also explored. The results showed, for 2'-deoxyadenosine, a slowing of the reaction with these solvents, which was interpreted as an effect of the reduced dielectric constant, which should complicate the formation of the zwitterion, the likely rate-determining step of the reaction. In the case of 2'-deoxyguanosine, different compositions of the water-alcohol solvent produced opposite effects on the rate of aminolysis, probably reflecting opposite effects of the reduction of the dielectric constant: destabilization of the initial zwitterions, which should slow down the reaction, and suppression of the ionization of the guanine group, which should lead to an increase in the observed reaction rate.

In the mixtures obtained by aminolysis of 2'-deoxyadenosine for several hours, the free base adenine was identified on the grounds of its chromatographic mobility, its UV absorbance spectrum in the elution solvent, and its UV spectrum taken in aqueous solutions at various pH values. The results are compatible with a cleavage of the N-glycosidic bond in the molecule, with formation of adenine and 2-deoxyribose as the primary products. The chromatographic trace of the reaction mixture also showed one band which, based on its UV spectrum, could be 3-acetylacrolein, a product of the reaction of 2-deoxyribose in the pyrrolidine solution. In the case of 2'-deoxyguanosine, some reaction products may have been lost due to insolubility. During aminolysis, 2'-deoxycytidine undergoes hydrolytic deamination at position C-4, producing 2'-deoxyuridine, which in turn reacts under these aminolysis conditions with formation of uracil. These products were identified in a manner similar to that used in the identification of adenine as a product in the aminolysis of 2'-deoxyguanosine.

Capítulo 1

Introducción

El ADN está compuesto por tres tipos diferentes de residuos, a saber, grupos fosfato, 2-desoxirribosas y bases heterocíclicas nitrogenadas, los cuales se encuentran unidos covalentemente para darle su característica forma esencialmente lineal. Esta macromolécula es de importancia central para los organismos biológicos, puesto que dirige la síntesis correcta de sus proteínas. Esto se da a través de la secuencia del ADN, entendida como la sucesión de los diferentes tipos de base heterocíclica a lo largo de la molécula. Las otras unidades constituyentes del ADN forman el tallo o esqueleto de la macromolécula, en una alternancia monótona de grupos fosfato y desoxirribosas, sin contenido informático. El orden en que se presentan las nucleobases en la cadena polimérica, partiendo de la terminal 5' hacia la 3', representa la información genética de todos los seres vivos.

Los métodos químicos de secuenciación del ADN explotan la propiedad de reactividad diferencial de ciertos reactivos con las diversas bases heterocíclicas, además de una química con el potencial de atacar en cada una de las posiciones de la cadena. El primer procedimiento de secuenciación química de cadenas polinucleotídicas fue propuesto hace ya varias décadas [Maxam y Gilbert, 1977], y a través de los años subsecuentes ha sido optimizado. Sin embargo, esta metodología luego cayó en desuso, debido: 1) al potencial mutagénico de algunos de los reactivos que empleaba, que causaba inquietud en los usuarios, 2) a la complejidad de las manipulaciones químicas que requería, y 3) el hecho de que, para la metodología alternativa de secuenciación por reacciones enzimáticas [Sanger

y col., 1977] se desarrollaron modalidades automatizadas que permitieron acelerar el flujo de trabajo en medida importante [Smith y col., 1985; Fung y col., 1989]. Por estas razones, la preferencia de los investigadores ya a mediados de los 1980s se inclinó claramente hacia el método enzimático de secuenciación. No obstante, la secuenciación química del ADN puede dar detalles que los métodos enzimáticos no pueden delinear. Un ejemplo es la determinación cuantitativa de grupos citosina metilados en ADN genómico [Church y Gilbert, 1984], que se distinguen por su mayor resistencia a la hidrazinólisis, en comparación con los grupos citosina no modificados. Esta posibilidad de analizar el grado de metilación en determinadas posiciones de citosina en el ADN es útil en estudios de la correlación entre metilación del ADN y expresión génica. Otro caso es el estudio de la sustitución de los grupos adenina del ADN por 2-aminopurinas, bases que se caracterizan por su mayor susceptibilidad a la aminólisis a temperaturas elevadas [Pless y Bessman, 1983]. Otro ejemplo es la secuenciación de oligonucleótidos, para la cual el método de Sanger no se presta.

El presente trabajo es un estudio de las reacciones de las bases nitrogenadas del ADN con aminas, empleando como moléculas modelo simples nucleósidos u oligodesoxirribonucleótidos muy cortos con el propósito de entender en el plano mecanístico el ataque inicial de la amina sobre las diversas bases nitrogenadas, para potencialmente optimizar las condiciones de experimentación de la metodología de secuenciación del ADN por cercenamiento aminolítico. El contenido del trabajo inicia con una sección que provee una breve visión de la importancia biológica de los ácidos nucleicos. Luego, se realiza una descripción general de los diferentes niveles estructurales que adoptan, tanto el ADN como el ARN. En el siguiente capítulo se describen los avances realizados en el estudio de las reacciones de las bases heterocíclicas en condiciones alcalinas, de tal forma que se pueda establecer el estado del arte en el que se realizó el presente trabajo. A seguir, se define la justificación del proyecto y los objetivos que dan fundamento a la realización del proyecto. Los materiales y equipos utilizados, así como las técnicas empleadas, se detallan en el capítulo de Materiales y Métodos. En la parte de Resultados y Discusión se presenta la información obtenida tras la realización de los ensayos programados, así como una discusión de ellos con el principal objetivo de confirmar o rechazar las hipótesis

formuladas sobre los fenómenos que se estudian. Por último, se enumeran una serie de conclusiones derivadas del análisis de los resultados, así como varias recomendaciones para estudios posteriores.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Importancia biológica de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son macromoléculas de suma importancia biológica, ya que todos los organismos vivos los contienen, en forma de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), con excepción de algunos virus que sólo contienen ARN, mientras que otros sólo poseen ADN. El ADN fue aislado inicialmente por Friedrich Miescher en 1869, a partir de núcleos de leucocitos humanos, llamándose inicialmente 'nucleína' [Dahm, 2005]. Una de las mejores fuentes animales de ácido nucleico resultó ser la glándula del timo, y lo que hoy se conoce por el nombre general de ácido desoxirribonucleico originalmente se llamaba ácido nucleico del timo, por ser rutinariamente obtenido de este órgano. De manera similar, se conoció originalmente el ARN como ácido nucleico de levadura [Levene, 1919], por ser este organismo la fuente principal para su producción. Mediante amonólisis, este material se reducía a unidades monoméricas que fueron identificadas como ribonucleótidos. El ácido nucleico de levadura difería del ácido nucleico del timo en que contenía uracilo en lugar de timina, y ribosa en lugar de desoxirribosa, lo que demostraba que se trataba de dos sustancias distintas.

En cuanto a su función biológica, los ácidos nucleicos son las moléculas centrales en la transmisión, expresión y conservación de la información genética. El ADN es el portador de la información genética en la mayoría de los seres vivos, por lo que su integridad

química es crítica para el mantenimiento de la identidad de cualquier organismo, sin descartar la importancia de una cierta tasa de mutaciones para la evolución molecular. Gracias a la elucidación de la estructura del ADN como una hélice doble [Watson y Crick, 1953], se pudo comprender la manera en que la información genética pasaba de una generación a otra mediante la síntesis de una cadena complementaria a cada una de las cadenas parentales, con correcto apareamiento de bases. La alteración de la estructura del ADN producida por agentes químicos o físicos produce mutaciones que pueden causar serias enfermedades en los seres vivos, y que pueden ser heredables (por ejemplo, mal de Parkinson, gen BRCA y la enfermedad de Vogelstein) [Jackson y Bartek, 2009].

La modificación del ADN produce algunos efectos tanto en su estructura como en su función. Las funciones biológicas de la metilación del ADN son aún desconocidas en su totalidad. En las bacterias, la metilación del ADN en ciertas secuencias específicas es utilizada para etiquetar el ADN propio, en distinción de ADNs de origen externo. Esta modificación sucede inmediatamente después del proceso de replicación, y el par metilasa-endonucleasa forma el fundamento del sistema microbiano de restricción del ADN foráneo. En organismos eucariotas la 5-metilación diferencial de bases citosina funge en el control de la expresión génica y en la represión e inmovilización de elementos transposables [Slotkin y Martienssen, 2007]. Modificaciones aleatorias del ADN, por lo general causadas por eventos químicos, pueden redundar en mutaciones. Como ejemplos de tales reacciones se pueden citar la formación de dímeros de timina por incidencia de fotones de luz ultravioleta, o el ataque del cancerígeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina [O'Connell y col., 1987], que produce residuos de 6-O-metilguanina. La pérdida de nucleobases provocada por ciertos agentes químicos da lugar a sitios abásicos altamente electrofílicos que pueden formar uniones cruzadas con posiciones en la hebra opuesta [Sczepanski y col., 2008].

Por otra parte, el ácido ribonucleico se puede dividir en varios tipos, los cuales cumplen distintas funciones celulares. El ARN mensajero (ARNm) es el producto de la transcripción del ADN, llevando consigo la información genética para el ensamblado correcto de las proteínas en los ribosomas. Estos orgánulos, a su vez, contienen otro tipo de ARN, el ARN ribosomal (ARNr) como componente esencial, en asociación con

diversas proteínas. El ARN de transferencia (ARNt) toma parte en la síntesis ribosomal de las proteínas, como una molécula adaptadora entre el código genético del ARNm y los aminoácidos. El ARN también puede ser el portador de la información genética en ciertos virus de ARN y en retrovirus cuyo ADN es copiado a ADN mediante la enzima transcriptasa reversa. Se ha descubierto que ciertas secuencias de ARN pueden formar complejos con pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs, por sus siglas en inglés, *small nuclear ribonucleoproteins*), los cuales pueden remover intrones a partir de transcritos de ADN genómico [Sczepanski y col., 2008]. Algunas propiedades sorprendentes del ARN comprenden actividades catalíticas [Cech, 1987], y se cree que fueron muy importantes en la evolución prebiótica, desempeñando funciones que permitieron el desarrollo de los primeros seres vivos.

Las unidades monoméricas que se encuentran en los ácidos nucleicos, es decir, los nucleótidos y los nucleósidos, también desempeñan funciones importantes en otros procesos bioquímicos. El trifosfato de adenosina (ATP) sirve de 'moneda' de energía en la mayoría de los procesos celulares endergónicos, y la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) participa como coenzima en reacciones de oxido-reducción. El 3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) y el 3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) fungen como segundos mensajeros en el control de una amplia variedad de procesos celulares [Rehmann y col., 2007]. Algunos análogos de nucleósidos inhiben la replicación del ADN o ARN en circunstancias definidas específicamente y, por lo tanto pueden ser usados como agentes quimioterapéuticos muy potentes. La azidotimidina, el aciclovir y la floxuridina se utilizan como agentes antivirales y/o anticancerígenos [Mansour y Storer, 1997]. Adicionalmente, algunos derivados de nucleótidos fluorescentes tal como la 1,*N*⁶-etenoadenosina trifosfato y la 3,*N*⁴-etenocitidina, han sido empleados como sondas para investigar la estructura, dinámica y reconocimiento de biomoléculas [Kricka y Fortina, 2009].

2.2. Estructura de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son polímeros esencialmente lineales formados por una secuencia alternada de un azúcar y un grupo fosfato, donde cada uno de los monosacáridos se

encuentra unido covalentemente a una base nitrogenada. El grupo fosfato, $-O-PO(O^-)-O-$, provee la unión de las unidades monoméricas de la molécula, por medio de dos enlaces éster con dos residuos monosacáridicos, y es el que confiere la carga negativa característica de los ácidos nucleicos.

El residuo que corresponde al monosacárido es una pentosa y puede ser de dos tipos: desoxirribosa, para el ADN; o ribosa, para el ARN. La única diferencia entre estos dos azúcares es que la desoxirribosa tiene un grupo hidroxilo menos. Los grupos monosacáridicos se encuentran unidos entre sí a través de grupos fosfato, que forman enlaces fosfodiéster entre los átomos de carbono 3' (C-3') y carbono 5' (C-5') del siguiente residuo monosacárido. La formación de enlaces asimétricos en torno al fósforo implica que cada cadena de ácido nucleico tiene una dirección definida a lo largo de toda la cadena (Figura 2.1). Por convención, la secuencia de bases en el ADN generalmente se lista en la dirección $5' \rightarrow 3'$.

Las bases nitrogenadas son compuestos heterocíclicos e insaturados, con dos o más átomos de nitrógeno. Las bases nitrogenadas mayoritarias que se encuentran en los ácidos nucleicos son: adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. La timina es exclusiva del ADN, mientras que el uracilo normalmente ocupa el lugar de la timina en el ARN y difiere de ésta en que carece de un grupo metilo en su anillo. El uracilo no se encuentra habitualmente en el ADN, y sólo aparece raramente como un producto residual de la citosina por procesos de desaminación hidrolítica.

1. Adenina. En el código genético se representa con la letra **A**. Es un derivado púrico con un grupo amino en la posición 6. Forma el nucleósido adenosina (2'-desoxiadenosina en el ADN) y los nucleótidos adenilato o 2'-desoxiadenosina monofosfato (AMP, dAMP). Su fórmula química es $C_5H_5N_5$ y su nomenclatura 6-aminopurina. La adenina, junto con la timina, fue descubierta en 1885 por el médico alemán Albrecht Kossel.
2. Guanina. En el código genético se representa con la letra **G**. Es un derivado púrico con un grupo oxo en la posición 6 y un grupo amino en la posición 2. Forma

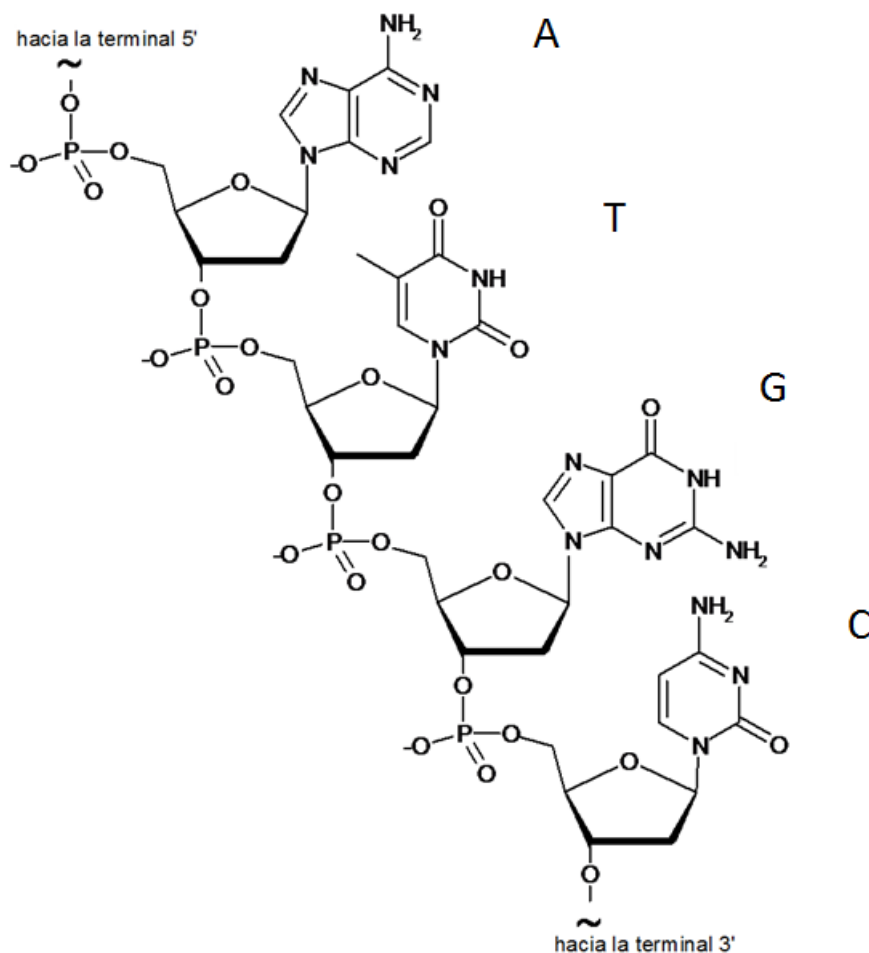


Figura 2.1: Estructura primaria de un tramo de ADN

los nucleósidos guanosina o 2'-desoxiguanosina y los nucleótidos guanilato o 2'-desoxiguanosina monofosfato (GMP, dGMP). Su fórmula química es $C_5H_5N_5O$ y su nomenclatura 6-oxo-2-aminopurina.

3. Citosina. En el código genético se representa con **C**. Es un derivado pirimídico, con un grupo amínico en posición 4 y un grupo oxo en posición 2. Forma el nucleósido citidina (desoxicitidina en el ADN) y los nucleótidos citidilato o 2'-desoxicitidina monofosfato (CMP en el ARN, dCMP en el ADN). Su fórmula química es $C_4H_5N_3O$

y su nomenclatura 2-oxo-4-aminopirimidina.

4. Timina. En el código genético se representa con la letra **T**. Se deriva de la pirimidina y tiene grupos oxo en las posiciones 2 y 4, y un grupo metilo en la posición 5. Forma los nucleósidos 2'-desoxitimidina, en el ADN y, ribotimidina en moléculas de ARNt, y los nucleótidos timidilato o 2'-desoxitimidina monofosfato (dTMP). Su fórmula química es $C_5H_6N_2O_2$ y su nomenclatura 2,4-dioxo-5-metilpirimidina.
5. Uracilo. Es un derivado pirimídico con grupos oxo en las posiciones 2 y 4. Forma el nucleósido uridina, sólo presente en el ARN, y el nucleótido uridina monofosfato (UMP). Su fórmula química es $C_4H_4N_2O_2$ y su nomenclatura 2,4-dioxopirimidina.

Las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos se denominan nucleótidos o unidades nucleotídicas. Los nucleótidos son las formas fosforiladas de los nucleósidos, que a su vez se forman por la unión de una base con un azúcar. Los nucleótidos presentes en el ARN se conocen como ribonucleótidos y los del ADN como desoxirribonucleótidos. En los nucleótidos pirimídicos el nitrógeno 1 (N-1) de la base está unido covalentemente al carbono 1 (C-1') del azúcar, mientras que en los nucleótidos púricos el nitrógeno 9 (N-9) de la base está así enlazado.

Los cuatro átomos de carbono quirales de las pentofuranosas (C1', C2', C3' y C4') pueden producir diferentes estereoisómeros que definen la molécula, siendo las posibilidades ribosa, arabinosa, xilosa y lixosa. En cuanto al enlace glicosídico existen dos posibilidades: la configuración β , que significa que la base y el carbono 5 se encuentran en el mismo lado del anillo de ribosa; la configuración α , que tiene la base en el lado contrario. Cada azúcar tiene dos imágenes espejo: la D y la L. En forma natural, sólo ocurren dos configuraciones en los ácidos nucleicos; para el ADN, el β -D-desoxirribonucleósido; y para el ARN, el β -D-ribonucleósido.

La estructura secundaria de una molécula de ácido nucleico se refiere a las interacciones de apareamiento entre las bases dentro de una molécula o una serie de moléculas que interactúan entre sí, y puede ser representada como una lista de bases que están emparejadas en una molécula de ácido nucleico. Las estructuras secundarias del ADN

y ARN en los sistemas biológicos tienden a ser diferentes: el ADN generalmente se encuentra en forma de doble hélice con la totalidad de las bases apareadas, mientras que las moléculas de ARN forman cadenas sencillas y usualmente forman interacciones complejas de apareamiento de bases debido a su gran capacidad de formar lazos a través de puentes de hidrógeno gracias al grupo hidroxilo adicional de la ribosa. En un contexto no biológico, la estructura secundaria es una consideración vital para el diseño de estructuras de ácidos nucleicos para la nanotecnología del ADN [Rothemund, 2006; Seeman, 2007], a partir de que los patrones de apareamiento determinan la estructura general de las moléculas.

La estructura de doble hélice del ADN permite explicar la conservación de la información genética y su mecanismo de duplicación fiel. Esta estructura se mantiene estable mediante la formación de puentes de hidrógeno entre las bases asociadas a cada una de las hebras. Para la formación de un enlace de hidrógeno una de las bases debe presentar un donador de puente de hidrógeno con un átomo de hidrógeno con carga parcial positiva ($-\text{NH}_2$ o $-\text{NH}$) y la otra base debe presentar un grupo aceptor de puente hidrógeno con un átomo electronegativo que trae un par de electrones libres ($\text{C}=\text{O}$ o $=\text{N}-$). Los puentes de hidrógeno son uniones más débiles que los típicos enlaces covalentes, como los que conectan los átomos en cada hebra de ADN, pero más fuertes que interacciones hidrofóbicas individuales, enlaces de Van der Waals, etc. Como los puentes de hidrógeno no son enlaces covalentes pueden romperse y formarse de nuevo de forma relativamente sencilla. Por esta razón, las dos hebras de la doble hélice pueden separarse como una cremallera, bien por fuerza mecánica o por alta temperatura. La doble hélice se estabiliza además por el efecto hidrofóbico y el apilamiento de las bases (*stacking*) [Ponnuswamy y Gromiha, 1994].

En las conformaciones canónicas del ADN de doble hélice (formas A, B y Z), cada tipo de base en una hebra forma un enlace de hidrógeno únicamente con un tipo de base en la otra hebra, principio que se conoce como 'complementaridad de las bases'. De acuerdo a lo anterior, las purinas forman estos enlaces con las pirimidinas, de forma que la adenina (A) sólo se enlaza con la timina (T) mediante la formación de dos puentes de hidrógeno, y la citosina sólo con la guanina (G) formando tres enlaces, siendo este último

apareamiento mucho más fuerte que el primero. Como consecuencia, tanto el porcentaje de pares de bases GC como la longitud total de la doble hélice de ADN determinan la fuerza de asociación entre las dos cadenas (Figura 2.2).

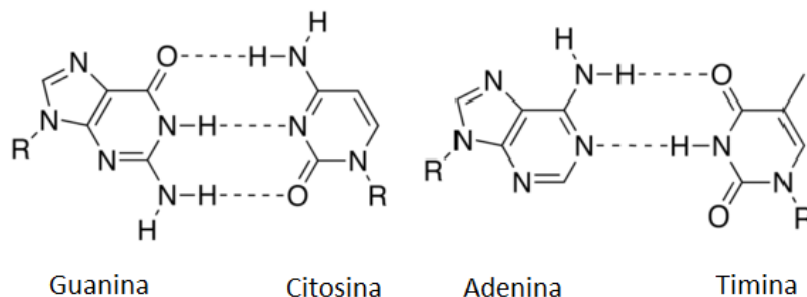


Figura 2.2: Apareamiento de bases que tiene lugar en el ADN

(Adaptado de <http://en.wikipedia.org/w/index.php?oldid=365263398>)

Cuando las dos hebras de ADN se enrollan una sobre la otra, se forman hendiduras o surcos entre una hebra y la otra, dejando expuestos los laterales de las bases nitrogenadas del interior. Las dimensiones de los surcos varían dependiendo de la conformación que adopte el ADN. La anchura del surco mayor implica que los extremos de las bases son más accesibles en éste, lo que facilita la diferenciación entre los pares de bases posibles; también facilita el reconocimiento de secuencias de ADN por parte de diferentes proteínas sin la necesidad de abrir la doble hélice. Así, proteínas como los factores de transcripción que pueden unirse a secuencias específicas, frecuentemente contactan con los laterales de las bases expuestos en el surco mayor [Pabo y Sauer, 1984].

El ARN puede adoptar diferentes estructuras secundarias, una de ellas es la que se conoce comúnmente como horquilla (Figura 2.3). La estructura de la horquilla se forma a partir de una sola hebra, y consiste en un tramo de doble hélice que finaliza en un pequeño lazo con bases sin aparear. Esta estructura es muy común y forma parte de extensos patrones estructurales tales como las estructuras de trébol, en las cuales se presentan uniones de cuatro hélices como las que se han encontrado en el ARNt. También se pueden presentar pequeñas series de bases sin aparear dentro de hélices largas, conocidas como lazos internos, y protuberancias que son regiones en las que una cadena

de la hélice tiene bases supernumerarias insertadas las cuales no tienen correspondencia en la cadena opuesta y por eso se presentan como evertidas de la doble hélice. Existen muchos elementos de las estructuras secundarias que cumplen funciones biológicas muy importantes en las moléculas de ARN, como por ejemplo las horquillas independientes terminadoras Rho y la estructura en forma de trébol del ARNt [Chastain y Tinoco Jr., 1991].

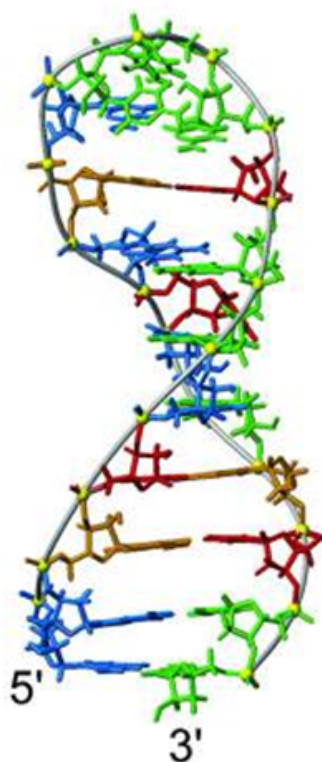


Figura 2.3: Ejemplo de una estructura de horquilla formada en el ARN
De [Finger y col, 2003]

Otra estructura secundaria que puede adoptar el ARN es el 'nudo falso', la cual contiene al menos dos horquillas que están intercaladas por medio de una mitad de un brazo con otro (Figura 2.4). Los nudos falsos se pliegan en conformaciones en forma de nudo pero no son realmente un nudo en el sentido topológico. El apareamiento de bases no coincide por completo, es decir, los pares de bases ocurren mediante un traslape. Esto

hace que la presencia de nudos falsos en secuencias de ARN sea imposible de predecir. Algunos procesos biológicos importantes dependen de la formación de nudos falsos en el ARN. Un ejemplo es el componente de ARN que tiene la telomerasa humana que es vital para su actividad [Chen y Greider, 2005].

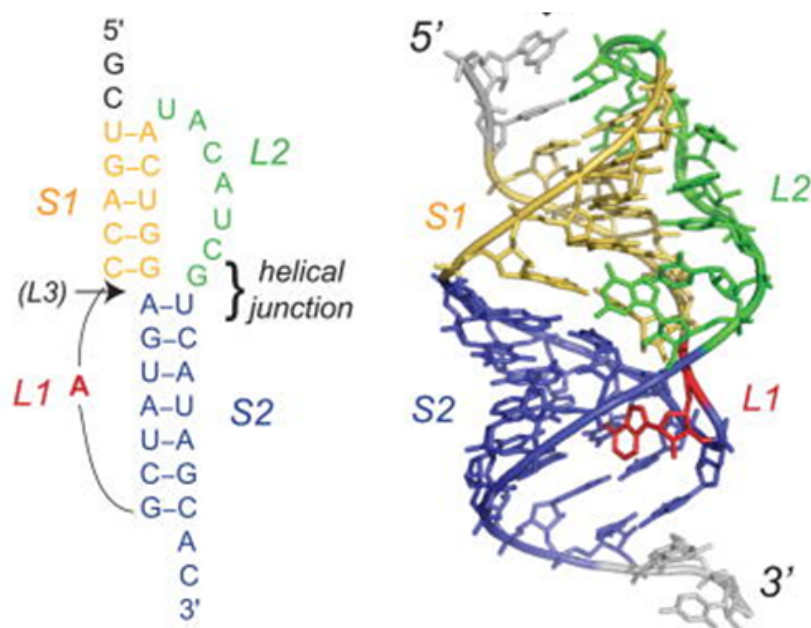


Figura 2.4: Ejemplo de una estructura conocida con nudo falso formada en el ARN De [Giedroc y Cornish, 2009]

La estructura terciaria de los ácidos nucleicos se refiere a la estructura tridimensional precisa definida por las coordenadas atómicas. El ADN y el ARN son capaces de desempeñar funciones que van desde el reconocimiento hasta las actividades catalíticas. Tales funciones requieren una estructura tridimensional muy precisa. Mientras que estas estructuras son diversas y aparentemente complejas, están compuestas de patrones recurrentes y reconocibles.

El ADN en organismos vivos sólo se ha observado en tres conformaciones: A-ADN, B-ADN y Z-ADN (Figura 2.5). El ARN también puede formar estructuras de doble cadena conocidas como A-ARN, el cual, en términos generales, es muy similar a la

forma A del ADN. La conformación que adopta el ADN depende de su secuencia, de la magnitud y del sentido del esfuerzo de superenrollamiento al que está sometido, de la presencia de modificaciones químicas en las bases y de las condiciones de la solución. De las tres conformaciones canónicas arriba nombradas, la forma B es la más común en las condiciones existentes en la célula.

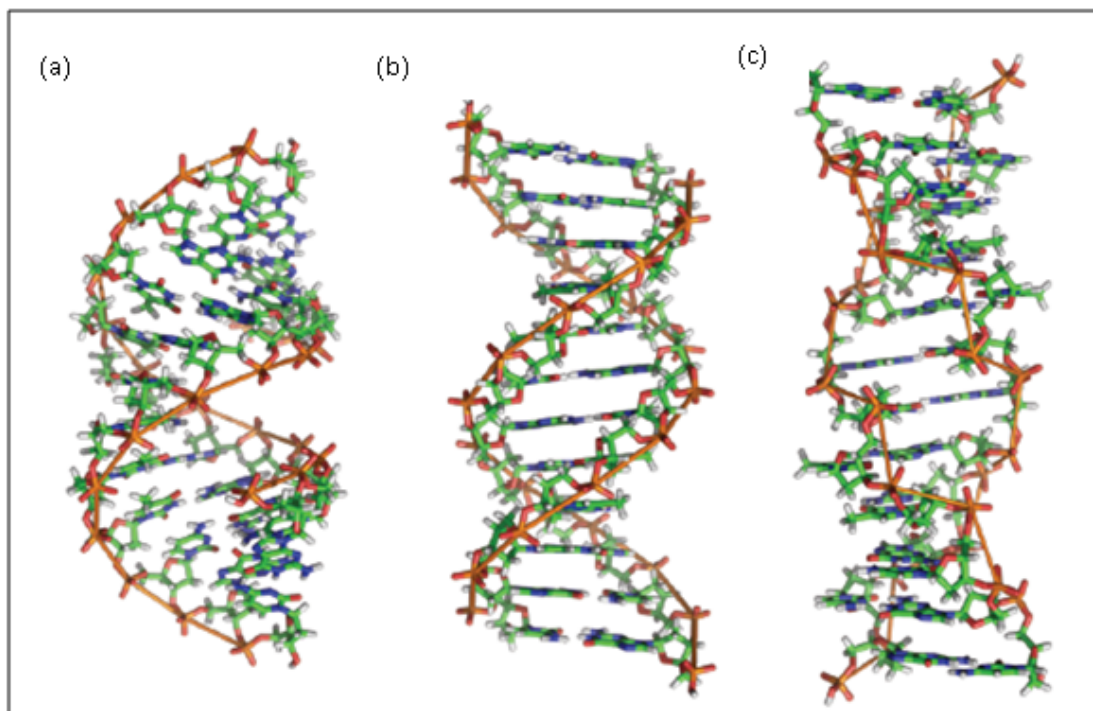


Figura 2.5: Diferentes conformaciones que adopta el ADN de doble cadena. (a) A-ADN; (b) B-ADN; (c) Z-ADN

De <http://en.wikipedia.org>

La conformación A-ADN es un espiral que gira hacia la derecha, más amplia que la B-ADN, con un surco menor superficial y más amplio, y un surco mayor más estrecho y profundo. La forma A ocurre en condiciones no fisiológicas en formas deshidratadas de ADN, mientras que en la célula puede producirse en apareamientos híbridos de hebras ADN-ARN, además de complejos enzima-ADN [Sundaralingam y Wahl, 1999].

Los segmentos de ADN que contienen un tramo extenso de secuencia de purina-pirimidina en estricta alternancia (de preferencia secuencias del tipo CGCGCG...) pueden sufrir cambios conformacionales mayores y adoptar la forma Z, ante todo en situaciones de esfuerzo de enrollamiento negativo y en condiciones de alta fuerza iónica de la solución. Esta conformación también se ve favorecida por sustitución por grupos voluminosos (metilo o bromo) en la posición 8 de las guaninas. En esta geometría, las hebras giran alrededor del eje de la hélice en una espiral que gira a mano izquierda, lo opuesto a la forma B más frecuente [Koch-Nolte y col., 2001]. Estas estructuras poco frecuentes pueden ser reconocidas por proteínas específicas, y es posible que regiones del ADN con potencial de asumir la conformación Z estén implicadas en la regulación de la transcripción [Doo-Byoung y col., 2002].

A nivel celular existe una cantidad considerable de estructuras terciarias que pueden adoptar los ácidos nucleicos, especialmente el ARN. El número de estructuras reportadas se ha incrementado en las últimas décadas. A continuación sólo se mencionan algunas de ellas. Se han encontrado estructuras en forma de tripletes que en parte consisten de ADN de triple hélice [Mirkin y Frank-Kamenetskii, 1994], por ejemplo, intrones del grupo I [Ortoleva-Donnelly y col., 1998]; estructuras cuádruplex formadas a partir de la unión de otras cadenas mediante la inserción de residuos de bases nitrogenadas. Un ejemplo es la estructura que forman los residuos de guanina en algunos ARN mensajeros cerca de los sitios de unión al ribosoma, la cual puede servir como regulador en la expresión génica [Oliver y col., 2000]. La formación de estructuras complejas conocidas como 'cuartetos de G' (*G-quartets*), encontradas en los extremos de los cromosomas, parecen participar en procesos metabólicos importantes [Lane y col., 2008].

Capítulo 3

Antecedentes

3.1. Las bases heterocíclicas en ambientes alcalinos

Albert y Brown realizaron los primeros estudios acerca de la reacción de las bases heterocíclicas con aminas [1954]. Para este trabajo se ensayaron las bases púricas con el fin de determinar su estabilidad en soluciones acuosas en ambientes ácidos y alcalinos. Las bases fueron sometidas a reflujo en H_2SO_4 y NaOH . Los resultados mostraron que los heterociclos eran muy estables en medio alcalino y, en menor grado en el ácido, debido a consideraciones de distribución electrónica en el anillo. Sin embargo, se presentaba una inestabilidad especial en las purinas al agregar un sustituyente en la posición C-2 de la purina. Al calentar la 2-metilpurina con metilamina o dimetilamina a 155°C por 24 horas se producía un rompimiento en el anillo imidazólico, produciéndose 4,5-diamino-2-metilpirimidina. Al someter la 8-metilpurina a las mismas condiciones se obtenía sólo la alquil-aminopurina esperada. Este evento sugería que el ataque nucleofílico inicial tenía lugar en la posición C-8 de la purina.

En cuanto al mecanismo de reacción de los nucleósidos púricos en soluciones alcalinas a altas temperaturas, 100°C , puede llevarse a cabo por tres diferentes reacciones: 1) apertura del anillo imidazólico que conduce a un derivado de 4,5-diaminopirimidina; 2) hidrólisis del enlace glicosídico, produciéndose la liberación de la base libre correspondiente y; 3) el reemplazo de $-\text{NH}_2$ o $-\text{Cl}$ por el grupo $-\text{OH}$ en el anillo de la purina [Jones

y col., 1966]. Para que la reacción se logre es necesario que el heterociclo no esté en forma de anión, puesto que la alta densidad de electrones que esto implicaría, haría imposible el ataque nucleofílico sobre el anillo. De ahí que las bases nitrogenadas, en su forma de base libre, en ambiente básico generalmente son bastante resistentes al ataque nucleofílico, puesto que se desprotonizan con relativa facilidad. Así, Albert y Brown [1954] reportan, en ambiente acuoso, valores de pK_a de 9.8 y 9.2, para la desprotonación en posición N-9 de la adenina y la guanina, respectivamente, mientras que para las bases citosina, timina y uracilo, se han determinado valores de pK_a de 12.2, 9.9 y 9.5, respectivamente [Shugar y Fox, 1952].

En condiciones similares, para la reacción de las bases pirimídicas en el caso mononucleotídico, el ataque inicial al anillo es producido por el ion hidroxilo, como lo comprobaron Jones y col. [1966] utilizando 5'-dCMP y 5'-dTMP. Para el caso de la reacción de formamida con la 2'-dCyd, el punto del ataque inicial sobre la aglicona es la posición C-6 [Saladino y col, 1997]. El mecanismo de degradación de las bases timina en ambiente fuertemente básico no se ha descrito aún, probablemente por la resistencia que tienen sus nucleósidos al ataque nucleofílico en ambiente fuertemente básico, donde la base timina se encuentra desprotonizada, aunque un ataque nucleofílico en la posición C-6 se da en solución acuosa de hidrazina, ambiente moderadamente básico, como se describe en la reacción (C+T) del procedimiento de secuenciación por cercenamiento químico [Maxam y Gilbert, 1980].

En 1988 se describió la degradación hidrolítica del 2'-desoxirribonucleósido de la 2-aminopurina en soluciones acuosas neutrales o básicas, a través de un rango definido de temperaturas [Ratsep y Pless, 1988], examinando incluso el valor a 37°C, temperatura fisiológica. El interés en la labilidad del enlace glicosídico de este compuesto recae en el carácter mutagénico de la 2-aminopurina. Se obtuvieron las tasas de desaparición del nucleósido a diferentes temperaturas y se realizó un análisis comparativo con las obtenidas para la 2'-desoxiadenosina, bajo las mismas condiciones. El efecto del pH sobre la velocidad de la reacción, con una temperatura constante de 70°C, fue examinado, determinando que a medida que el valor de pH decrecía la velocidad de reacción se incrementaba. Otro aspecto a resaltar es que se realizó un análisis para delinear el mecanismo

de reacción de los dos nucleósidos antes mencionados. Para el caso de la 2'-dAdo se identificó sólo un producto principal de la reacción, siendo éste la adenina; mientras que para el caso del otro nucleósido, además de la 2-aminopurina se encontró un nuevo producto que fue identificado como 2,4-diamino-5-formamidopirimidina. Esto sugiere que la descomposición de ambos compuestos se produce a través de mecanismos diferentes.

3.2. Secuenciación química del ADN

La secuenciación del ADN consiste en determinar la sucesión exacta de las bases heterocíclicas que constituyen el ADN, cuyo tamaño puede variar desde un simple oligonucleótido (50 bases o menos), a un polinucleótido (más de 50 bases), o hasta ADN genómico con un gran número de bases. En nuestros días se conocen varias metodologías para determinar la secuencia nucleotídica de un ADN. Central entre ellas está el abordamiento de secuenciación con ADN polimerasas y análogos nucleotídicos terminadores, originalmente introducido por el grupo de Sanger [Sanger y col., 1977], y utilizado hoy en un gran número de modalidades, generalmente altamente automatizadas. Otro abordamiento propuesto hace algunos años, y hoy en desuso, es la secuenciación por hibridación, que propone determinar la presencia de secuencias octanucleotídicas definidas dentro del ADN analito (mediante la interrogación de este analito en una microplantilla que presenta todas las secuencias octanucleotídicas posibles), para luego ensamblar la secuencia total del ADN analito ordenando por traslape las secuencias octanucleotídicas que lo constituyen [Drmanac y col., 1989; Yershov y col., 1996]. Una metodología que ha tomado auge en los últimos años es la pirosecuenciación, desarrollada originalmente por el grupo de Mathias Uhlén [Ronaghi y col., 1996; Ronaghi y col., 1998], basada en la interrogación en pozos de microplacas de un sistema molde-cebador de manera secuencial con los cuatro dNTPs canónicos, uno a la vez, y registrando cuándo en dependencia de la secuencia del molde se da la extensión enzimática de la cadena en crecimiento, evento que implica la liberación de iones pirofosfato que mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas se manifiesta finalmente en la emisión de luz proveniente de oxiluciferina, señal de luminiscencia que atestigua el evento de extensión. Este método se utiliza ante todo para proyectos de rescuenciación masivamente paralelos, por

ejemplo en el campo de la metagenómica [Petrosino y col., 2009]. La compañía 454 Life Sciences, de Bradford, Connecticut, E.U.A., produce el equipo Genome Sequencer FLX, con capacidad de secuenciar 400 millones de bases en sólo 10 horas. Una metodología similar, de reciente desarrollo, fue comercializada por Life Technologies bajo el nombre de Ion Torrent. El abordamiento central es idéntico al arriba descrito, pero la extensión de la cadena no se registra a través de una secuela luminiscente de la liberación del ión pirofosfato, si no mediante el cambio de pH que acompaña el evento de extensión, el cual involucra la liberación de un equivalente de ión de hidronio.

Otro método de reciente desarrollo se conoce por las siglas SBS (del inglés *Sequencing by synthesis*). En esta tecnología, tramos cortos de un genoma de interés se encuentran inmovilizados en una placa sólida, en distribución aleatoria, pero definida. En esta placa son copiadas por una polimerasa en un proceso que utiliza exclusivamente nucleósidos trifosfato que fungen como terminadores de la polimerización y que a la vez llevan fluoróforos con colores característicos para cada una de las cuatro bases canónicas. Al soporte se le ofrece la mezcla de los cuatro nucleósidos bloqueados-marcados, extendiéndose en cada posición de la placa las cadenas por un nucleótido, de acuerdo con la secuencia que dicta el ADN molde. A seguir, se registra la distribución de los diferentes fluoróforos en la placa. Luego, se remueven los fluoróforos bloqueadores, y la placa es de nueva cuenta interrogada con la mezcla de cuatro dNTPs bloqueados-marcados, para determinar, en todas las secuencias representadas en la placa, la identidad del siguiente nucleótido. Esta tecnología, comercializada por la compañía Illumina, de San Diego, E. U. A., se utiliza de manera masivamente paralela para la secuenciación rápida y económica de genomas enteros, por traslape de las secuencias cortas determinadas en la placa.

Finalmente, consideramos la secuenciación por cercenamiento químico, que es el método de interés en el contexto del presente trabajo de tesis. Este método de secuenciación se basa en el principio de la ruptura química de una cadena de ADN produciendo fragmentos oligoméricos cuya longitud está relacionada con la posición de dicha ruptura. Cuando este cercenamiento de la cadena se lleva a cabo mediante una química altamente selectiva para una de las bases que constituyen el ADN, la formación de los fragmentos indica la presencia inicial de ese tipo de base en la posición indicada por el tamaño de

los fragmentos. Este último método es muy útil para la secuenciación de cadenas cortas de ADN, debido a que puede determinar la secuencia desde la primera base, opción que no ofrecen las demás metodologías arriba mencionadas. Además, permite conocer con más detalle modificaciones en la estructura química de los componentes del ADN a secuenciar. Por ejemplo, este método de secuenciación permite localizar o cuantificar bases inusuales en el ADN [Pless y Bessman, 1983; Church y Gilbert, 1984], a diferencia de los métodos enzimáticos.

En 1977, Maxam y Gilbert reportaron seis tratamientos químicos alternativos para efectuar el cercenamiento del ADN, con diferentes propensiones o especificidades en cuanto al tipo de base en que se daban los cortes. La degradación de un ADN analito, marcado en posición terminal mediante cuatro de estos tratamientos en paralelo, seguido de la resolución electroforética, en paralelo, de las mezclas de degradación obtenidas de esta manera, permite deducir la secuencia nucleotídica del ADN analito [Maxam y Gilbert, 1977]. En 1980, describieron con minucioso detalle técnico los procedimientos involucrados en su método para secuenciar [Maxam y Gilbert, 1980]. Estos procedimientos se describen a continuación, para el cuarteto de reacciones de cercenamiento (G+A, A, C, C+T), que generalmente se ha utilizado en secuenciación del tipo Maxam-Gilbert.

1. Reacción en (G+A): el ADN se trata por 60 minutos a 20°C en solución acuosa de hidroformiato de piperidina 4 M. Luego el ADN se precipita con etanol y se trata con piperidina 1 M por 30 minutos a 90°C.

Esta reacción comienza por la despurinación catalizada por la acción del hidroformiato de piperidina. La protonación en N-7 del grupo guanina produce una forma de resonancia con una carga positiva en N-9. Esta situación desestabiliza el enlace glicosídico y permite el ataque del agua en C-1', produciéndose la pérdida de la base. En la estructura apúrica que de esto resulta, el anillo monosacárido se abre, exponiendo un grupo funcional aldehído en C-1'. En el caso de las posiciones de adenina se puede producir un proceso semejante, comenzando en este caso con una protonación en la posición N-1 de la aglicona. En el posterior tratamiento térmico con piperidina acuosa, cualquier estructura apúrica sufre una eliminación

β , formándose un doble enlace entre C-2' y C-3' y liberándose el fragmento de la cadena hacia la terminal 3'. Después, el protón de C-4' es abstraído y se produce otra eliminación β , entre C-4' y C-5', liberándose en este caso el fragmento correspondiente a la terminal 5' (Figura 3.1).

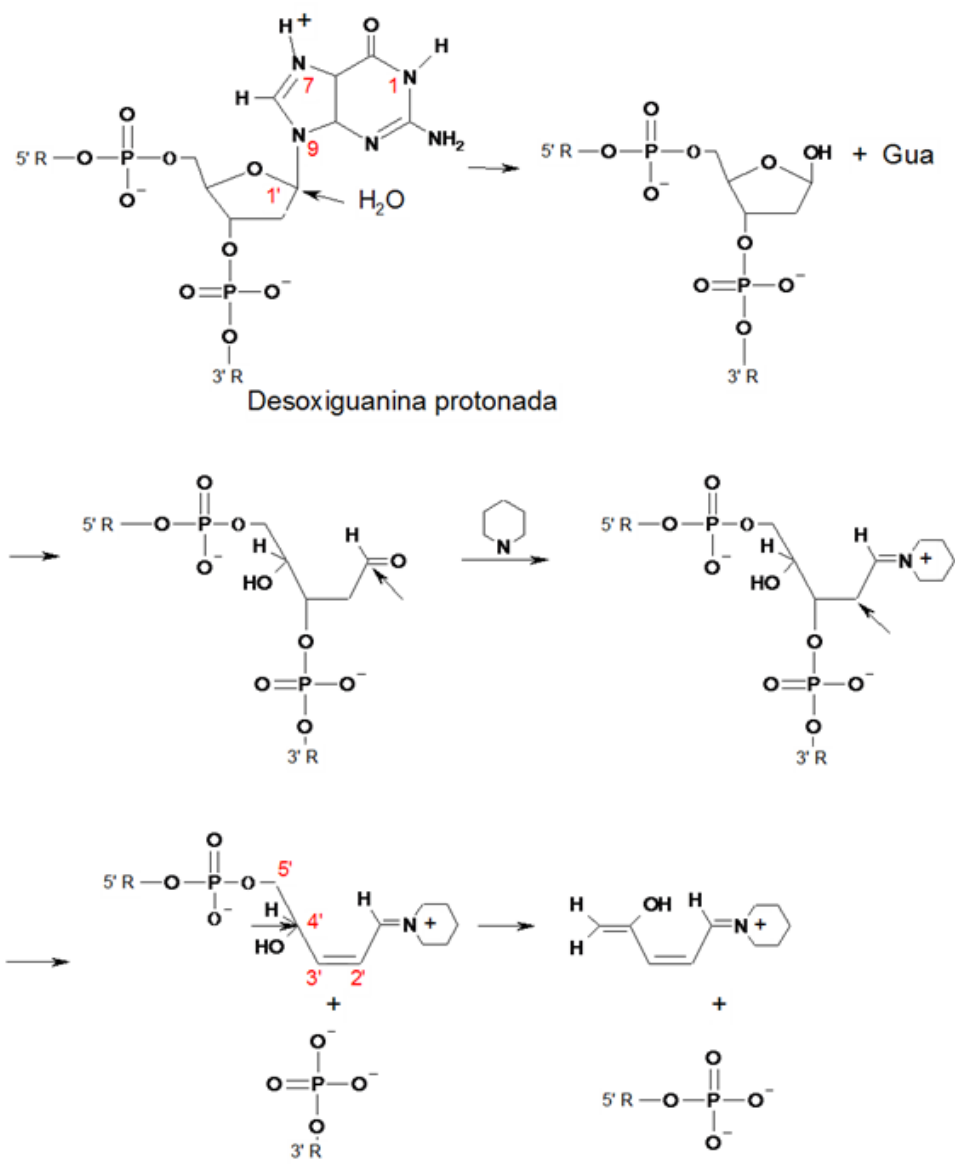


Figura 3.1: Mecanismo del cercenamiento químico específico para posiciones A y G en el ADN

(Adaptado de Maxam y Gilbert, 1980)

2. Reacción en G: El ADN es tratado por 10 minutos a 20°C en solución acuosa de dimetilsulfato 50 mM. El ADN se precipita con etanol, y el precipitado resultante se disuelve en solución acuosa de piperidina 1 M y se calienta a 90°C por 30 min.

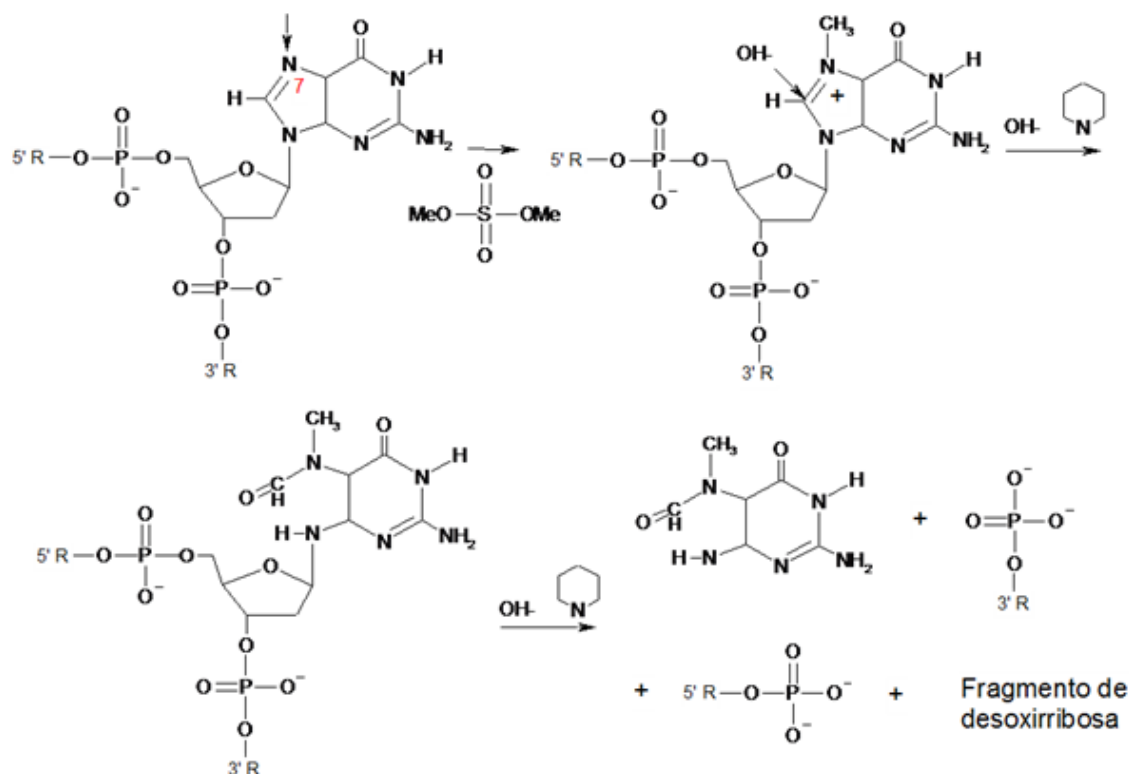


Figura 3.2: Mecanismo del cercenamiento químico específico para posiciones G en el ADN (Adaptado de Maxam y Gilbert, 1980)

La reacción específica de G incluye la metilación de la base guanina en la posición N-7 con dimetilsulfato. En este procedimiento, otras bases también son metiladas, pero aún metiladas no sufrirán el proceso de cercenamiento en el siguiente tratamiento con piperidina, como ocurre con los grupos guanina N⁷-metilados. La guanina metilada es susceptible a un rompimiento del anillo debido al ataque del ion hidroxilo que es seguido del rompimiento del enlace glicosídico efectuado por la piperidina, produciéndose la pérdida de la base (Figura 3.2).

3. Reacción en (C+T): el ADN se somete a tratamiento en una mezcla de hidrazi-

na/agua (3:2, v/v) a 20°C por 10 minutos. Una vez más, sigue precipitación con etanol y degradación con piperidina 1 M a 90°C por 30 minutos.

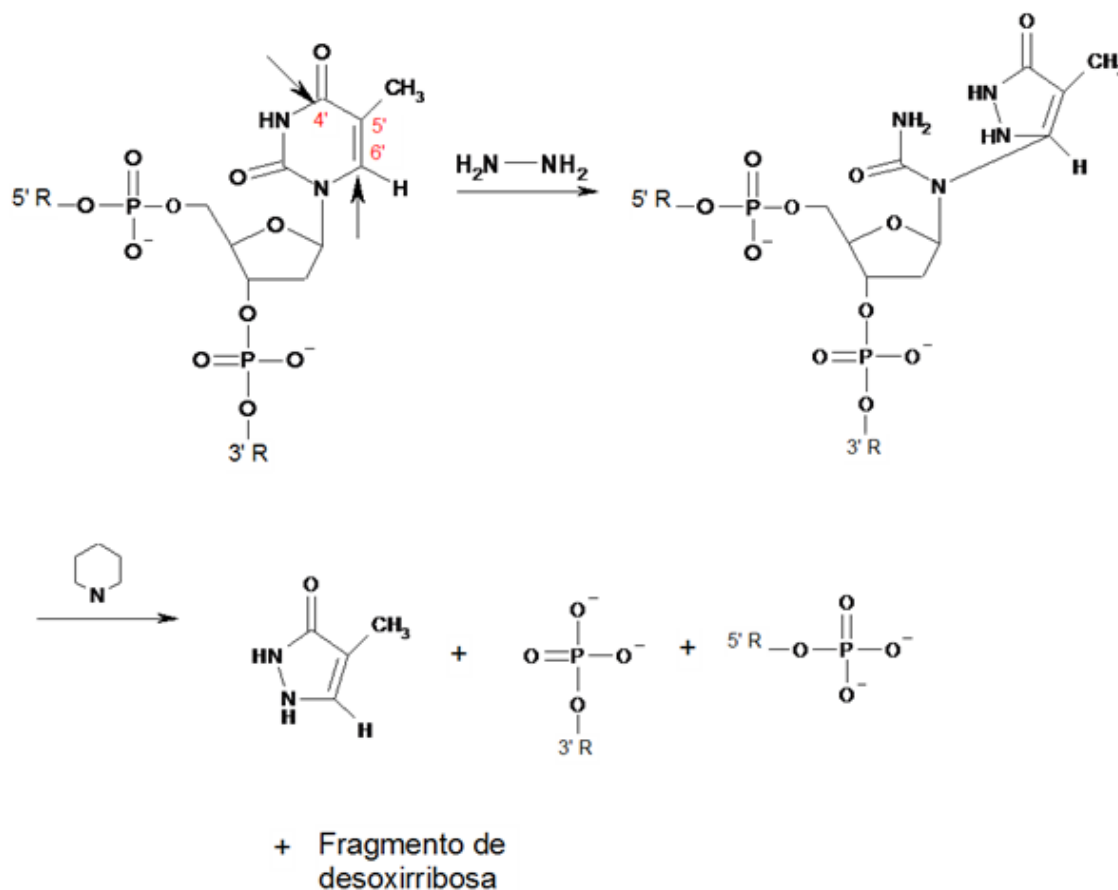


Figura 3.3: Mecanismo del cercenamiento químico para posiciones T en el ADN (Adaptado de Maxam y Gilbert, 1980)

En esta reacción la hidrazina inicialmente se adiciona a través del doble enlace entre C-5 y C-6 e inmediatamente después el otro grupo NH_2 de la hidrazina ataca el grupo carbonilo en la posición 4, para producir un nuevo anillo de cinco miembros, que es un hidrazuro cíclico, y un grupo ureído. En el siguiente tratamiento con piperidina se elimina primero el hidrazuro cíclico, formándose un glicósido de urea, que luego se hidroliza produciendo un sitio abásico en el ADN. A continua-

ción se produce la sucesión de eliminaciones β , como ya fue descrito arriba para los casos de las posiciones A y G (Figura 3.3). Para la reacción en C se da un mecanismo análogo, de nueva cuenta involucrando ataques nucleofílicos sucesivos de la hidrazina sobre las posiciones C-6 y C-4 del aglicón.

4. Reacción en C: El ADN es tratado por 10 minutos a 30°C en una mezcla de hidrazina/agua (3:2, v/v) que contiene NaCl 1.5 M. Luego, se precipita con etanol y piperidinólisis en las mismas condiciones. En estas condiciones, la alta concentración de sal apantalla el efecto del campo eléctrico de las cargas negativas de los fosfatos de la cadena polinucleotídica; con eso se facilita la desprotonación de los grupos timina en el ambiente básico de la mezcla hidrazina-agua, con lo que estos grupos se vuelven resistentes al ataque nucleofílico de las moléculas de hidrazina [Duh y col., 1988], por lo que en estas condiciones de alta salinidad la hidrazinólisis se vuelve una reacción de ataque exclusivamente en posiciones C.

Alícuotas provenientes de las cuatro reacciones se colocan en posiciones adyacentes en un gel desnaturante de poliacrilamida. Después de la corrida electroforética, la distribución de bandas radioactivas en los cuatro carriles paralelos se registra mediante autorradiografía en una película para rayos X. Finalmente, el patrón de bandas oscuras en el autorradiograma se interpreta mediante una lectura cruzada. Un ejemplo de secuenciación de ADN utilizando esta metodología se presenta en la Figura 3.4.

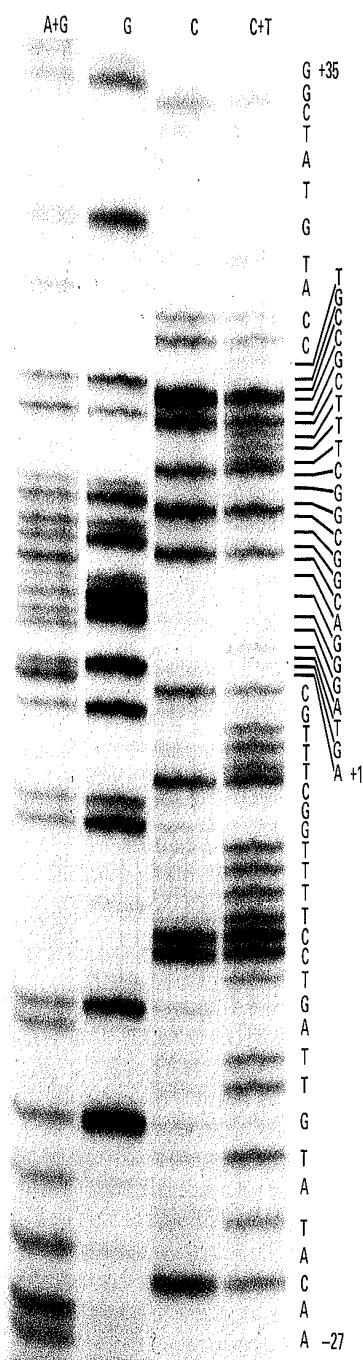


Figura 3.4: Ejemplo de secuenciación por fragmentación química de un tramo de ADN del fago G4
(Adaptado de Kornberg, 1980)

3.3. Variantes de la secuenciación química del ADN

En años subsecuentes a la publicación del procedimiento propuesto por Maxam y Gilbert, se desarrollaron una serie de métodos, resumidos en la reseña de Ambrose y Pless [1987], que pretendían mejorar algunas deficiencias mostradas en los experimentos de dicho protocolo. Estas nuevas alternativas buscaban examinar diferentes reacciones de ataque específico que sustituyeran la identificación indirecta de las bases que ocupaban una determinada posición en la cadena de ADN. De esta forma, en solución acuosa de aminas bajo radiación ultravioleta, la base timina reaccionaba con más frecuencia que la citosina [Simoncsits y Török, 1982]; el peróxido de hidrógeno, en ambientes ligeramente básicos, atacaba selectivamente los sitios ocupados por la timina [Sverdlov y Kalinina, 1983]. Para el ataque específico de los grupos citosina en el ADN se reportó la oxidación con peróxido de hidrógeno en ambiente acuoso neutral [Sverdlov y Kalinina, 1983] y el tratamiento con hidrocloreuro de hidroxilamina en ambiente neutral [Rubin y Schmid, 1980]. En solución acuosa a pH 2, grupos adenina en el ADN son atacados específicamente por el compuesto K_2PdCl_4 [Iverson y Dervan, 1987]. Todas estas variantes empleaban la segunda etapa del procedimiento de Maxam y Gilbert, es decir, el tratamiento en solución acuosa de piperidina a temperatura de $90^\circ C$, en la cual se producía el corte de la cadena en las posiciones donde la base había sido dañada.

Aparte del método de secuenciación por cercenamiento químico efectuado por cuatro diferentes tratamientos en paralelo, seguido de electroforesis en cuatro carriles electroforéticos, también se ha descrito un procedimiento que involucra un solo tratamiento del polinucleótido con marca radioactiva en posición terminal, seguido de electroforesis en un carril. En solución acuosa de piperidina, a temperaturas elevadas, las moléculas de ADN reaccionan de tal manera que se lleva a cabo un rompimiento en la cadena nucleotídica, produciéndose un conjunto de fragmentos oligoméricos radioactivos, análogos a los que se obtienen con el procedimiento de Maxam y Gilbert [Ambrose y Pless, 1985]. La química subyacente implica una labilización inicial de las bases, seguida por una sucesión de eliminaciones β como fue descrito anteriormente. Estas reacciones se producen en el mismo tratamiento y en la misma solución. Los aminolisatos resultantes pueden ser resueltos en un gel secuenciador de poli(acrilamida), obteniéndose una escalera

de bandas de diferente intensidad, que permite deducir la secuencia del ADN inicial. Esta representación diferencial se debe a la diferente resistencia química que tienen las bases del ADN en las condiciones de aminólisis.

Este método alternativo permite realizar la fragmentación del ADN en un solo tratamiento químico, que de hecho resulta ser mucho más simple que cualquiera de los cuatro tratamientos en paralelo del método de Maxam y Gilbert. Este planteamiento fue llevado a la práctica inicialmente con polinucleótidos específicamente marcados en su terminal 5' con el radioisótopo ^{32}P [Ambrose y Pless, 1985]; luego, se utilizó para la secuenciación de fragmentos de ADN radiomarcados en su terminal 3' [Ambrose y col., 1988]. También ha sido utilizado para la determinación de la secuencia de oligodesoxirribonucleótidos [González-Jasso y col., 2007; Arredondo Vazquez, 2008]. Un ejemplo de las escaleras de secuenciación que se obtienen de esta manera se muestra en la figura 3.5.

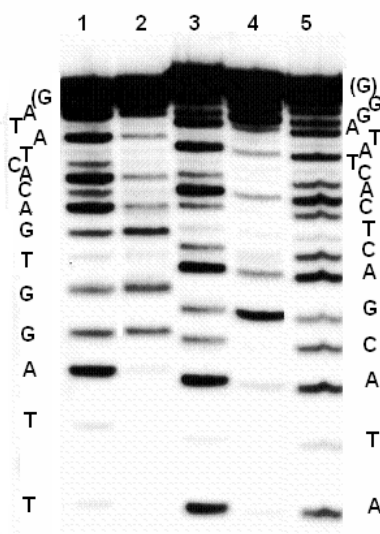


Figura 3.5: Ejemplo de un autorradiograma de secuenciación obtenido a partir de la aminólisis de SP6 Promoter Primer (carriles 1 y 2) y T7 Promoter Primer (carriles 3-5), con diferentes aminos

(De González-Jasso y col., 2007)

Una metodología de secuenciación análoga, basada en el tratamiento del ADN en formamida/agua (80:20, v/v) o en N-metilformamida/agua (80:20, v/v) a 110°C fue descrita por el grupo de Di Mauro [Negri y col., 1991; Ferraboli y col., 1993; Negri y col., 1994; Negri y col., 1996]. También en este caso se observan tasas diferenciales para el cercenamiento de la cadena polinucleotídica en las posiciones ocupadas por las diferentes bases.

Para este tipo de cercenamiento del ADN, los detalles mecánicos del ataque de la formamida sobre la base heterocíclica fueron explorados a nivel de los 2'-desoxinucleósidos. En el caso de la 2'-dAdo, se determinó que el ataque nucleofílico inicial es sobre la posición C-8, en la aglicona, produciéndose una apertura del anillo imidazólico, con formación de un aducto formamido-desoxiadenosina (Figura 3.6). Luego, mediante deshidratación y la acción de las altas temperaturas, se fractura el enlace glicosídico produciéndose el residuo monosacárido y 4,6-diamino-5-formamidopirimidina [Saladino y col., 1996]. Para la 2'-dGuo, el mecanismo de reacción es mucho más rápido y sencillo.

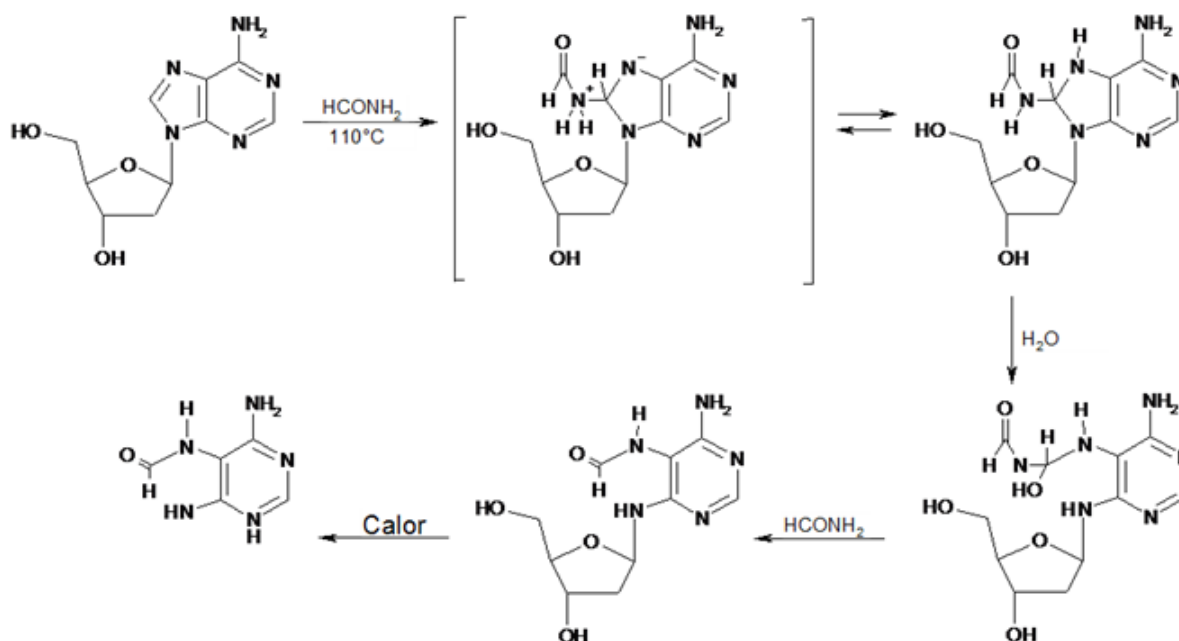


Figura 3.6: Mecanismo de reacción de la 2'-dAdo con formamida
De [Saladino y col., 1996]

En el caso de la 2'-desoxicitidina, el ataque de la formamida ocurre en la posición C-6 de la aglicona, produciéndose una adición nucleofílica [Saladino y col., 1997]. A continuación, se puede producir un segundo ataque nucleofílico en C-4, produciéndose finalmente el ureidoglucósido correspondiente [Figura 3.7]. A diferencia de las purinas, en la 2'-dCyd no se produce la ruptura del enlace glicosídico, sino simplemente una apertura del anillo de pirimidina. Bajo estas condiciones, la base timina prácticamente no reacciona [Saladino y col., 1997].

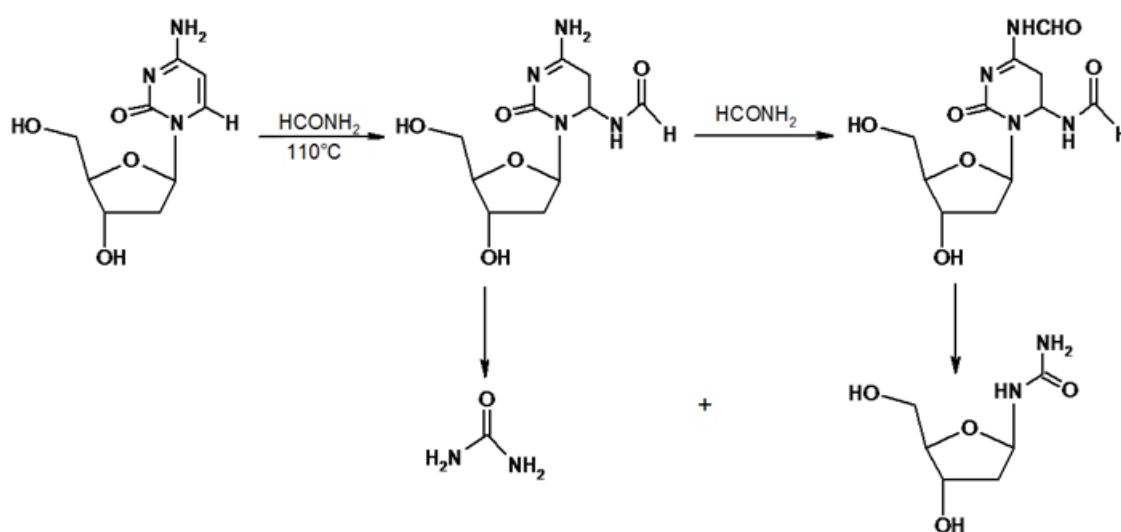


Figura 3.7: Mecanismo de reacción de la 2'-dCyd con formamida
De [Saladino y col., 1997]

Una desventaja en la aplicación del tratamiento con formamida para la secuenciación de oligodesoxirribonucleótidos es que por lo general no se verifica la segunda de las eliminaciones β , debido a la baja basicidad de la formamida, por lo que es necesario un tratamiento posterior con piperidina para lograr la formación final de los fragmentos del cercenamiento [Negri y col., 1996].

Mediante un estudio comparativo en condiciones similares (amina al 0.5 M, 0.3 M NaCl, 90°C), se determinó que diversas aminas pueden ser utilizadas de la misma forma que la piperidina, para secuenciar moléculas de ADN por cercenamiento aminolítico [Testoff y Pless, 1991]. Todas las aminas ensayadas producían el mismo conjunto

de fragmentos marcados en su terminal 5'. Sin embargo las diferentes aminas podían mostrar diferentes reactividades generales con el ADN. Por ejemplo, piperidina y dietilamina producían un patrón de bandas radioactivas fuerte, mientras que la trietilamina, en las mismas condiciones, generaba un patrón más débil. Además, las diversas aminas podían evidenciar cambios significativos en su reactividad diferencial con las diferentes bases del ADN. Así, por ejemplo, la intensidad de bandas obedecía el orden $A > G > C > T$ para aminólisis con dietilamina, y $G > A > C > T$ para la reacción con diazabicyclo[2.2.2]octano. La preferencia de ataque que presentan las aminas sobre las bases heterocíclicas también puede variar por la concentración salina empleada. Por lo tanto, existen aminas que mostraron una preferencia muy marcada por la guanina, a diferencia de la piperidina que lo hacía con la adenina. Este efecto podría ser utilizado para lograr una mejor distinción entre las bandas producidas por G y C, cuya intensidad relativa era prácticamente la misma en el procedimiento original de secuenciación aminolítica de un solo carril [Ambrose y Pless, 1985].

Por sus características estructurales la base guanina se desprotoniza con más facilidad que las demás bases canónicas del ADN, disminuyendo su reactividad debido a una redistribución del orbital electrónico del anillo. Pero cuando esta base se encuentra dentro de un ambiente oligonucleotídico, su pK_a sufre una transición hacia valores mayores [Martínez Reyes, 2007], debido a la influencia del campo eléctrico de los grupos fosfato del esqueleto de la cadena oligonucleotídica, el cual dificulta la formación del grupo guanina aniónico. Por esta razón, en el entorno oligonucleotídico se aumenta la susceptibilidad del grupo guanina al ataque nucleofílico. Dado que el efecto de campo eléctrico de los fosfatos sobre la desprotonación del grupo guanina se amortigua en soluciones de fuerza iónica elevada, la susceptibilidad relativa de las posiciones G en estas reacciones de secuenciación por aminólisis se puede manejar en cierta medida ajustando la concentración de sal de la solución. Por las consideraciones arriba enunciadas, es muy probable que la tasa de ataque aminolítico sobre la base guanina en el nucleósido 2'-dGuo sea significativamente menor que para posiciones G en oligonucleótidos o polinucleótidos.

Como se mencionó, el uso de soluciones acuosas de aminas para escindir cadenas de ADN también se ha utilizado para determinar la secuencia de oligodesoxirribonucleótidos

marcados con ^{32}P en su terminal 5' [González-Jasso y col., 2007; Arredondo Vazquez, 2008]. En ese trabajo se estudiaron las reacciones de un oligómero de 32 nucleótidos con una serie de diferentes aminas, todas a una concentración de 0.5 M, a 110°C y a diferentes concentraciones de sal (0.3 M NaCl, 1M NaCl y 3 M LiCl). Los resultados obtenidos mostraron que diferentes aminas pueden presentar diferente reactividad general con el ADN, produciendo diferentes niveles de intensidad general de las señales, así como diferencias en su reactividad con las varias bases en el ADN, produciéndose diferentes patrones de intensidad relativa de las bandas a lo largo del carril, en dependencia de las aminas empleadas. En detalle, la vulnerabilidad de los sitios ocupados por adenina, citosina y timina en el ADN, al cercenamiento catalizado por aminas puede ser ordenado como $A > C > T$ para todas las condiciones y todas las aminas ensayadas. En qué posición, dentro de esta secuencia de reactividades se ubica la reactividad de los sitios ocupados por la guanina, depende de las condiciones precisas empleadas en la aminólisis, ante todo de la amina específica empleada y la concentración salina usada durante la reacción.

En lo que respecta a la tasa de cercenamiento del oligodesoxirribonucleótido de secuencia definida, se habían obtenido para la reacción en pirrolidina a 0.5 M y temperatura de 110°C, estimados gruesos de 100 horas para la vida media ($t_{1/2}$) de las posiciones ocupadas por timinas [Arredondo Vázquez, 2008], lo que corresponde a una constante de velocidad de primer orden de aproximadamente $k = 0.01 \text{ h}^{-1}$. Las bases más vulnerables, adenina y guanina, evidenciaron una cinética más rápida por un factor de aproximadamente 10, o sea, $t_{1/2} = 10 \text{ h}$ y $k = 0.1 \text{ h}^{-1}$.

Capítulo 4

Justificación

La secuenciación de polidesoxirribonucleótidos por cercenamiento químico se fundamenta en el hecho de que, mediante una química selectiva, se produce la ruptura de una cadena sencilla de ADN, formándose fragmentos oligoméricos, cuyo peso molecular definido indica la posición de la base atacada, así como, implícitamente, la presencia de la base en dicha estructura. Hasta la fecha han sido reportados procedimientos bien estructurados que permiten el análisis rutinario de tales moléculas lineales de ADN.

En soluciones acuosas de aminas a altas temperaturas, las moléculas de ADN reaccionan de tal manera que se lleva a cabo un rompimiento de la cadena de ADN, produciendo fragmentos oligoméricos similares a los que se forman en los procedimientos originalmente descritos por Maxam y Gilbert [1977]. La tasa de cercenamiento en un sitio dado en el ADN depende de cuál base heterocíclica (Ade, Cyt, Gua o Thy) en particular, ocupa ese sitio, un efecto que ha sido utilizado para secuenciar moléculas cortas de ADN por fragmentación química a través de aminólisis. Sin embargo, el mecanismo por el cual se da la labilización química inicial de las bases en tales condiciones aún es desconocido, lo que dificulta la tarea de optimización de las condiciones de cercenamiento químico a emplear en este tipo de secuenciación.

El conocimiento detallado de las reacciones que tienen lugar entre diferentes aminas y las bases heterocíclicas que ocurren en el ADN, así como un mejor entendimiento de cómo las condiciones del tratamiento afectan estas reacciones, permitirá una mejor

selección de aminas y un ajuste de las condiciones del tratamiento con el propósito de optimizar el procedimiento de secuenciación por cercenamiento químico por aminólisis.

El mecanismo del ataque de las aminas sobre las bases heterocíclicas se podrá estudiar con mayor facilidad utilizando, como moléculas modelo, los simples 2'-desoxirribonucleósidos en lugar de oligonucleótidos, especialmente en lo que se refiere a la identificación de los productos de la reacción, por lo que el presente trabajo se realizó ante todo con los nucleósidos como sustrato.

Capítulo 5

Objetivos

Objetivo general: Delinear el mecanismo del ataque de aminas a altas temperaturas, en medio acuoso, sobre las bases heterocíclicas que se encuentran en el ADN, usando como moléculas modelo a los 2'-desoxirribonucleósidos correspondientes.

Objetivos específicos:

1. Estudio de la reacción de 2'-dAdo, 2'-dGuo, 2'-dCyd, 2'-dThd y 2'-dUrd con pirrolidina, con el propósito de determinar las tasas de desaparición de cada nucleósido, así como la identificación de los principales productos intermedios y finales de la reacción.
2. Estudio de la reacción de los trinucleótidos modelo d-TpApT y d-TpGpT con pirrolidina.
3. Determinación del efecto de la temperatura sobre la aminólisis de la 2'-dAdo, para determinar la energía de activación mediante la ecuación de Arrhenius.
4. Estudio del efecto de solventes acuoso-etanólicos sobre la aminólisis de la 2'-dAdo.
5. Comparación de las tasas de aminólisis entre 2'-desoxirribonucleósidos y ribonucleósidos.
6. Estudio del efecto de la concentración de pirrolidina en la reacción de 2'-dAdo.

7. Estudio del efecto del uso de óxido de deuterio como solvente.
8. Identificación de los productos principales de la pirrolidinólisis de los 2'-desoxinucleósidos ensayados.

Capítulo 6

Materiales y métodos

Reactivos

Los reactivos químicos utilizados fueron adquiridos de los siguientes proveedores:

2'-dAdo, 2'-dGuo, 2'-dCyd, 2'-dThd y 2'-dUrd, 99.9 %: Sigma

2-desoxirribosa, 99.9 %: Aldrich

Adenina, guanina y citosina, 99 %: Sigma

Oligonucleótidos d-TpApT y d-TpGpT, desalados: TriLink BioTechnologies (Carlsbad, California, E.U.A.). Los espectros de masa, obtenidos del certificado de análisis, de ambos oligonucleótidos se muestran en las Figuras 6.1 y 6.2

Pirrolidina, 99.9 %: Aldrich

NH₄OH, 28-30 %: Karal

HCl, 37 %: Fermont

NaOH: Merck, No. de producto 6498, lote 905256

H₂O (grado HPLC): J.T.Baker

CH₃CN (grado HPLC): J.T.Baker

MeOH (grado HPLC): J.T.Baker

D₂O, 99.9 %: Aldrich, No. de producto 15,188-2, lote 01404

EtOH, 96 %: Karal

Todos estos reactivos fueron utilizados sin ninguna purificación adicional.

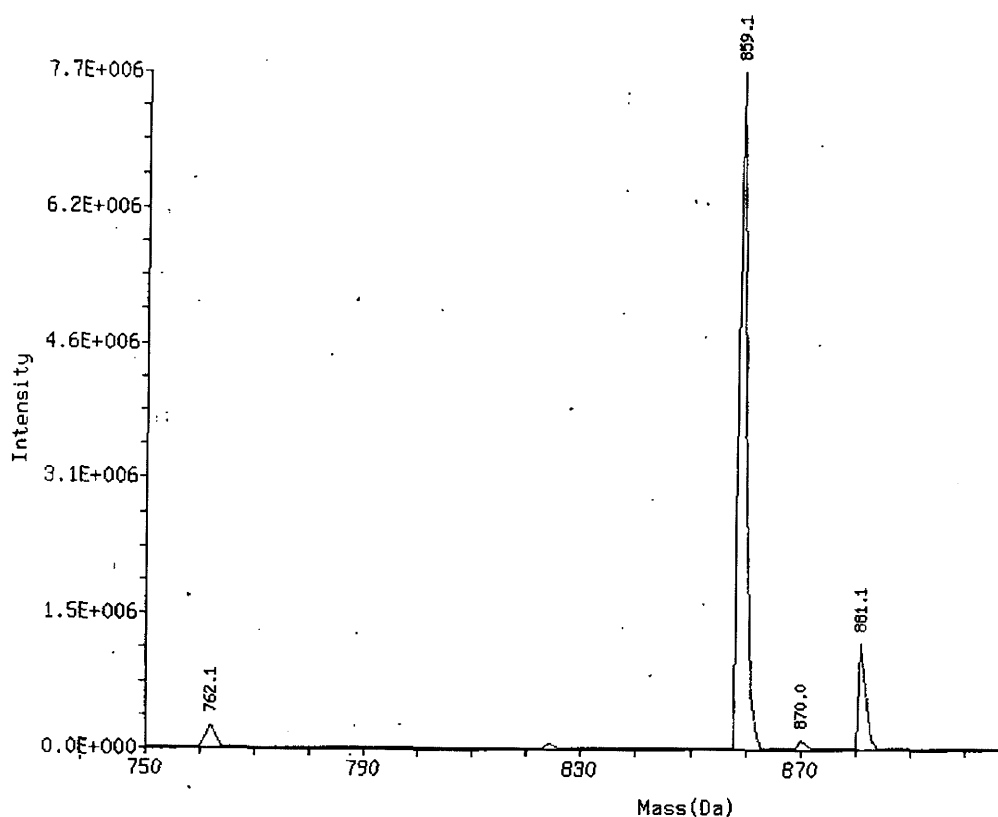


Figura 6.1: Espectro de masas del oligonucleótido d-TAT (certificado de análisis de la compañía TriLink BioTechnologies)

Materiales

- (a). Celdas espectrofotométricas de cuarzo, con volumen contenido de 1.4 mL y paso de 1 cm, marca Hellma.
- (b). Ampolletas de vidrio de borosilicato, 1 mL: Wheaton.
- (c). Capilares de vidrio de borosilicato: Thomas Catalogue No. 6418F10.
- (d). Tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- (e). Puntas de pipeta, RT-250 y RT-100, marca Rainin.

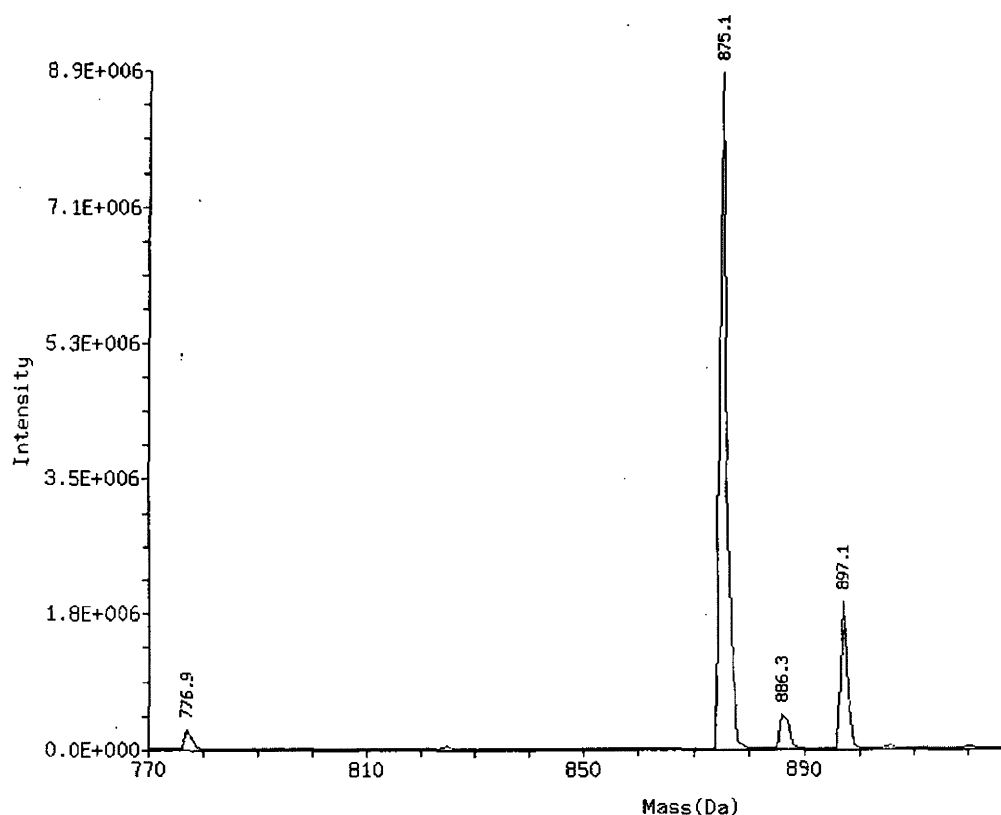


Figura 6.2: Espectro de masas del oligonucleótido d-TGT (certificado de análisis de la compañía TriLink BioTechnologies)

Equipo

1. Cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento (HPLC), equipo Agilent 1200, con columna Zorbax XDB-CN, de 4.6 mm x 150 mm, con partículas de 3.5 μm de diámetro.
2. Termómetro de mercurio, 0 - 400°C, para inmersión total, marca Lauka.
3. Horno de secado de circulación forzada, marca Riossa (48 x 30 x 35 cm).
4. Micropipetas ajustables, con volúmenes máximos de 200 y 1000 μL , marca Rainin, U.S.A., modelo pipetlite.
5. Espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo Lambda 35, con doble haz.

6. Bloque de calentamiento, marca Lab Line, modelo 2000, No. serie 0305-6478.

El espectrofotómetro se calibró con un estándar de óxido de didimio, modelo 666-F, número individual E665, de Hellma, Alemania. Las mediciones se efectuaron contra aire. La línea base fue registrada con aire contra aire.

Longitud de onda. Para la característica línea de absorción en la región de 329 nm, el máximo de absorbancia se ubicó en 328.9 nm, mientras que el certificado de Hellma indica 328.65 nm. Por ende, en esta región del espectro, el valor de longitud de onda indicado por el instrumento se excede por 0.2 nm del valor correcto. Esta desviación se consideró lo suficientemente pequeña como para ser desdeñada en general en el presente trabajo.

Absorbancia. A longitudes de onda nominales de 270.2 nm, 280.2 nm, 300.2 nm y 340.2 nm (longitudes de onda reales de 270.0 nm, 280.0 nm, 300.0 nm, y 340.0 nm, respectivamente), se midieron las absorbancias por triplicado, y los promedios calculados se compararon con los valores correspondientes listados en el certificado de Hellma. A continuación se lista, para cada longitud de onda considerada, la razón de $A_{medida}/A_{certificada}$:

λ (nm)	270	280	300	340
$A_{medida}/A_{certificada}$	1.0006	1.0013	1.0079	1.0073

Es decir, que en el intervalo ensayado, el instrumento indica valores de absorbancia ligeramente altos en comparación con el estándar. Estas desviaciones se consideraron lo suficientemente pequeñas como para ser desdeñadas en general en el presente trabajo.

6.1. Ensayos de composición del eluente

Inicialmente, se inyectaron 20 μ L de solución 5 % H₂O (HPLC)-95 % CH₃CN/MeOH, con diferentes composiciones de CH₃CN/MeOH: 77:23, 85:15 y 90:10 (v/v), para poder

determinar el tiempo en que era retenida la solución de carga. Luego, se prepararon soluciones acuosas de cada uno de los nucleósidos a una concentración de 10 mM y se tomaron 20 μL , los cuales fueron disueltos en 380 μL del eluente, para dar una solución 0.5 mM en nucleósido. Se inyectaron 20 μL de las mezclas resultantes en el HPLC a una temperatura de 25°C, con elución isocrática de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ a diferentes composiciones, con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, presión de 25 bar, con monitoreo de absorbancia a 220 nm, 240 nm, 250 nm, 260 nm y 280 nm. En HPLC todos los datos de absorbancia fueron medidos contra A_{320} como referencia.

Los solventes de elución fueron preparados el mismo día de su uso, mezclando los volúmenes apropiados de solventes grado HPLC, que habían sido pasados por un filtro con tamaño de poro de 0.45 μm , marca Agilent.

6.2. Análisis cinético

Cinéticas de descomposición

Para las reacciones de aminólisis se mezclaron 1.5 mL de solución acuosa de nucleósido, base nitrogenada o 2-desoxirribosa al 10 mM con 1.5 mL de solución acuosa de amina al 1 M para dar 3 mL de una solución 5 mM en nucleósido y 500 mM en amina. Posteriormente, alícuotas de 200 μL de esta solución fueron depositadas en ampollitas de vidrio de borosilicato, las cuales fueron tapadas con Parafilm y congeladas a -20°C por una noche. Las ampollitas fueron selladas utilizando un mechero y fueron sometidas a la temperatura seleccionada (por ejemplo 110°C \pm 1°C), monitoreada con el termómetro, en el horno de secado, por diferentes tiempos de reacción. Después del tiempo determinado, la ampollita correspondiente se quitó del horno, se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se agitó para garantizar la homogeneidad de su contenido. Se fracturó el cuello de la ampollita y se trasladaron por micropipeta 160 μL del contenido líquido a un tubo Eppendorf, el cual se mantuvo destapado hasta que la solución se secara por completo. Se añadieron 15 μL de agua y se repitió el secado de la mezcla, buscando una evaporación total de la pirrolidina. Luego, el residuo se disolvió con 80 μL de agua, grado HPLC, para dar una solución 10 mM nominal en nucleósido inicial.

De esta mezcla se tomaron 20 μL y se diluyeron con 380 μL de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ de la composición (por ejemplo, 85:15, v/v) que se utilizaría en el análisis por HPLC. Éste se realizó bajo las condiciones descritas anteriormente, siendo el volumen de inyección 20 μL , lo que equivale nominalmente a 10 nmol de nucleósido inicial.

En el caso de la pirrolidinólisis de los oligonucleótidos cortos d-TAT y d-TGT, se tomaron 25 μL de solución acuosa de oligonucleótido a 10 mM y se pipetearon hacia 745 μL de solución acuosa de pirrolidina a 517 mM, para dar una solución acuosa a 0.325 mM en oligonucleótido y a 500 mM en amina. Se prepararon alícuotas de 70 μL en ampolletas de borosilicato selladas en el mechero. Las condiciones de reacción fueron similares a las de los nucleósidos. Una vez finalizado el tiempo de reacción correspondiente se extrajeron 60 μL y se dejaron secar completamente a temperatura ambiente. Las mezclas se redisolviéron en 3 μL de agua, grado HPLC, y 57 μL de la mezcla $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (85:15, v/v). Para su análisis por HPLC se inyectaron 20 μL de esta solución, bajo las mismas condiciones anteriores. Con este volumen de inyección, la cantidad nominal de material es aproximadamente 10 nmol de trinucleótido inicial.

Las reacciones en capilares se prepararon depositando 10 μL de una solución a 5 mM en nucleósido y a 500 mM en amina. Se sellaron en el mechero y se calentaron en un bloque de calentamiento, en pozos llenados con aceite de silicón, a la temperatura requerida, por diferentes tiempos de reacción. Las capilares se limpiaron con etanol y se fracturaron en uno de sus extremos. El contenido líquido fue transferido con una micropipeta a un tubo Eppendorf. El proceso de secado de las mezclas de reacción fue similar al utilizado para el líquido extraído de las ampolletas. Luego, el residuo se redisolvió con agua, para dar una concentración nominal en nucleósido de 10 mM y se prepararon para el HPLC de tal manera que la mezcla final tuviera una composición 5 % en solución acuosa y 95 % de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$, que pudiera ser (85:15,v/v) o (90:10,v/v).

La desaparición del material inicial fue medida mediante la determinación del área del pico o midiendo la absorbancia máxima (altura del pico) a 280 nm. Ambos métodos dieron, prácticamente, los mismos resultados en términos de los valores cinéticos derivados (k , $t_{1/2}$). Los datos obtenidos se evaluaron mediante un ajuste a la ecuación cinética

de primer orden $A = A_0 * e^{-kt}$, donde A es la señal del material de inicio a tiempo t , A_0 es la señal a tiempo cero, k es la constante de velocidad de primer orden, y t es el tiempo de reacción. Del valor de k que arroja este ajuste se calcula la vida media ($t_{1/2}$) mediante la ecuación: $t_{1/2} = \ln 2/k$. Los ajustes de los datos se realizaron con un algoritmo en el programa OriginPro 8.

Reacciones de aminólisis a diferentes temperaturas

La preparación de las soluciones para las reacciones de aminólisis, se llevó a cabo de la manera antes descrita. Se ensayaron diferentes temperaturas de reacción: 90°C, 100°C, 110°C y 120°C, por diferentes tiempos de reacción. El análisis de los aminolisatos se realizó en HPLC bajo las condiciones usuales, pero utilizando, para el caso de 100°C y 110°C una solución isocrática de CH₃CN/MeOH (90:10, v/v), y para el caso de las otras temperaturas (85:15, v/v).

La energía de activación (E_a) se calculó mediante la ecuación de Arrhenius, graficando el logaritmo natural del valor numérico de la constante de velocidad en función del recíproco de la temperatura absoluta, donde la pendiente de línea que une los puntos multiplicada por el valor de la constante de los gases reales, $R = 1.987$ cal/mol K, es igual al valor de E_a .

Dependencia de la velocidad de pirrolidinólisis de 2'-dAdo de la composición del solvente

Los ensayos se llevaron a cabo bajo el mismo procedimiento anterior, utilizando los siguientes solventes acuoso-etanólicos: agua, etanol/agua (30:70, v/v), etanol/agua (50:50, v/v), etanol/agua (75:25, v/v), etanol/agua (95:5, v/v).

Dependencia de la velocidad de reacción de la concentración de la amina

Las concentraciones de pirrolidina ensayadas fueron 0.2 M, 0.5 M y 1.5 M, además se realizó un ensayo en ausencia de amina. Las reacciones de aminólisis como el análisis

de las mezclas resultantes se realizaron bajo las condiciones usuales.

Efecto isotópico del solvente sobre la reacción de pirrolidinólisis de 2'-dAdo

Se utilizó óxido de deuterio, D₂O, como solvente para la reacción de la 2'-dAdo con pirrolidina; en lo demás, el procedimiento fue el mismo que en las reacciones anteriores. Para el trabajo posterior a la reacción y la HPLC ya no se usó D₂O, sino H₂O. Para el análisis por HPLC, se utilizaron los mismos parámetros antes descritos, con una solución isocrática de CH₃CN/MeOH (90:10, v/v).

6.3. Identificación de productos de la reacción

Comparación de espectros de absorción UV, a diferentes valores de pH

Los compuestos de interés fueron colectados directamente del HPLC de forma manual después de su paso por el detector de arreglo de diodos del instrumento. Esta actividad fue realizada por varias ocasiones hasta lograr una concentración adecuada que tuviera máximos de absorbancia superiores a 0.5 AU en el análisis espectrofotométrico. Una vez recolectados, los compuestos se dejaron secar por completo a temperatura ambiente, hasta lograr la completa evaporación del solvente CH₃CN/MeOH (85:15, v/v). Los residuos se redisolvieron en 780 μ L de agua tridestilada, se depositaron en las cubetas de cuarzo y se registró su espectro de absorción UV en el espectrofotómetro, contra agua como referencia. Luego se agregaron 8 μ L de HCl 0.5 M para dar un pH \approx 2 y se hizo un nuevo barrido en UV, bajo las mismas condiciones. A la misma solución, se le pusieron 16 μ L de NaOH 0.5 M, resultando un nuevo pH \approx 12, y se analizó en el instrumento bajo las mismas condiciones.

Capítulo 7

Resultados y discusión

En esta sección se presentan los resultados tras la realización de los diferentes ensayos que dieron cumplimiento a los objetivos establecidos. Como primera parte se examinaron diferentes composiciones del eluente (fase móvil del análisis cromatográfico) para definir un procedimiento simple y robusto para el análisis rutinario de las mezclas de la reacción entre los 2'-desoxinucleósidos y las aminas. Posteriormente, se determinó la tasa de degradación aminolítica, a 110°C, para cada uno de los nucleósidos y oligonucleótidos cortos modelo, a través del análisis cinético correspondiente. Una vez determinadas las constantes de velocidad, se evaluaron algunas condiciones de experimentación, tales como composición del solvente, concentración de la amina, basicidad de la amina atacante, y se determinó la energía de activación para la pirrolidinólisis de la 2'-desoxiadenosina. Para finalizar, se examinaron los productos principales de varias de las reacciones para poder elucidar su mecanismo subyacente.

7.1. Ensayos de composición del eluente

Inicialmente se examinó el comportamiento cromatográfico de los diferentes nucleósidos. Los perfiles cromatográficos resultantes de la elución isocrática de los nucleósidos, utilizando CH₃CN/MeOH (77:23, v/v) como fase móvil, todos obtenidos a 280 nm por ser más claros y limpios, se muestran en la Figura 7.1. Todas las señales, con excepción de la correspondiente a la 2'-dCyd, muestran una sola banda bien formada. Sin embargo,

el hecho de que el tiempo de retención sea el mismo en prácticamente todos los casos suscita dudas. Se observa que con el eluente isocrático utilizado en esta prueba, los nucleósidos analito no son lo suficientemente retardados como para separarse por completo del volumen de solución de carga (5 % de agua-95 % de CH₃CN/MeOH (77:23, v/v)).

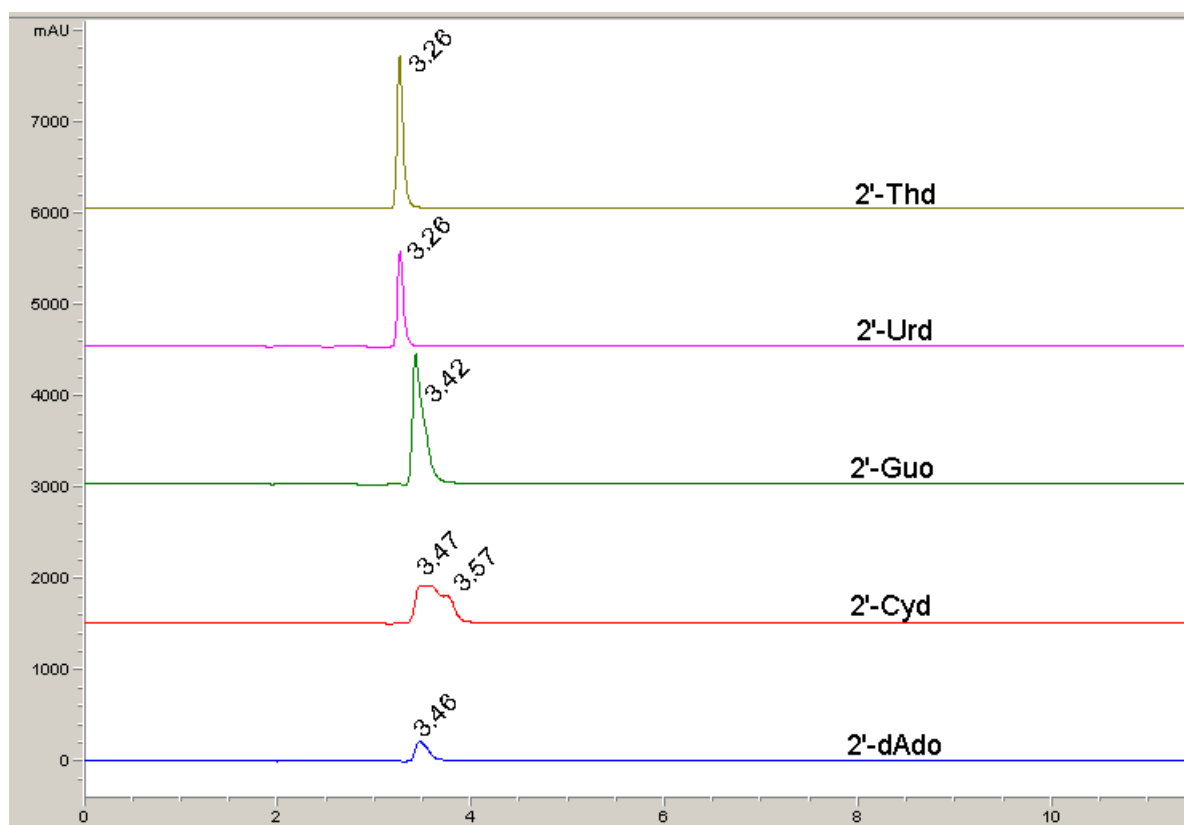


Figura 7.1: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de la elución isocrática de 2'-desoxinucleósidos, utilizando CH₃CN/MeOH (77:23, v/v) como eluente

La extraña doble banda formada por la 2'-dCyd pudiera sugerir la presencia de dos productos distintos comigrando a tiempos de elución muy similares. Para aclarar si las bandas corresponden o no al mismo compuesto, se tomaron los espectros de absorción en cuatro puntos distintos de las señales, como se muestra en la Figura 7.2. De acuerdo a esta misma figura se aprecia que los espectros no muestran una variación significativa

en su absorbancia máxima y mínima a 280 nm, por lo que se puede concluir que se trata del mismo nucleósido de partida, la 2'-dCyd.

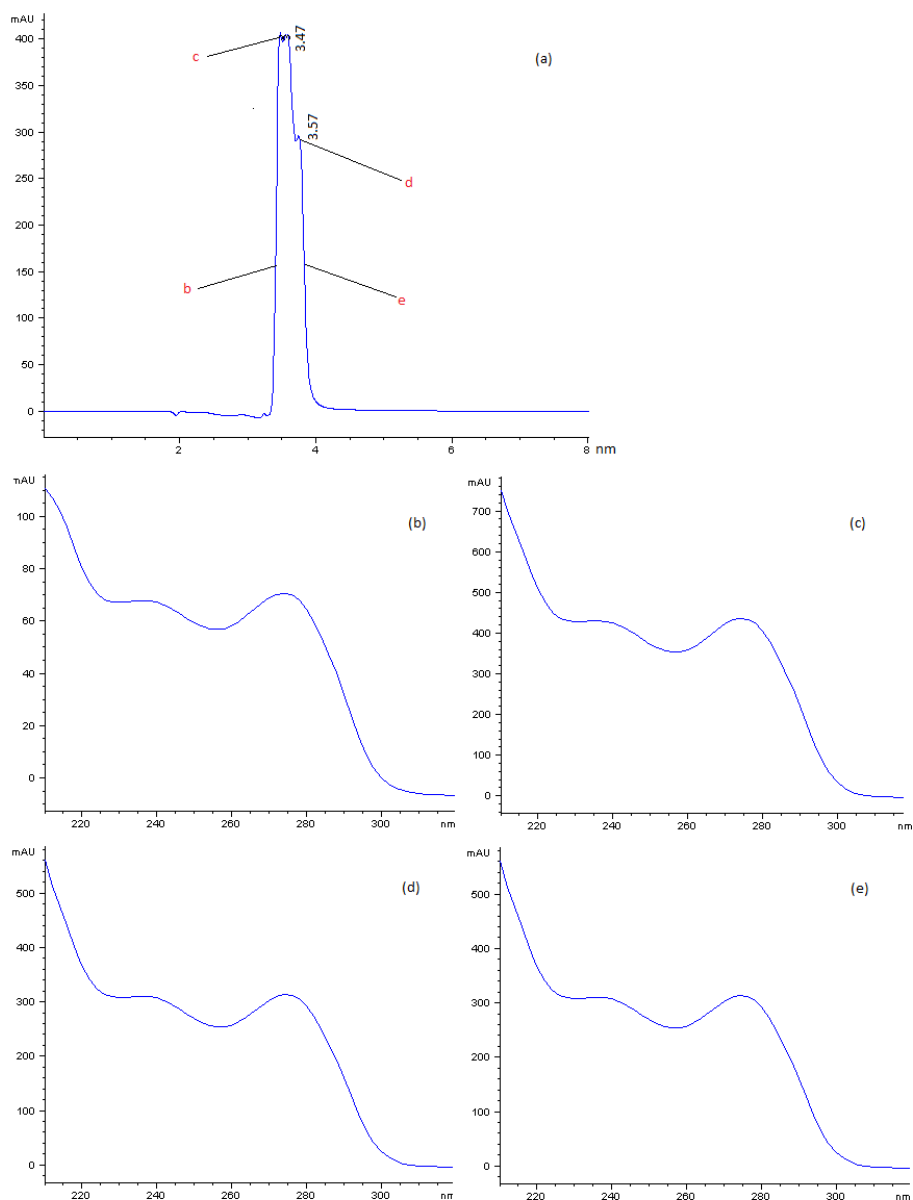


Figura 7.2: Espectros de absorción de la doble banda formada por la 2'-dCyd, tras su análisis por HPLC con $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (77:23, v/v) como eluente. (a) Perfil cromatográfico (280 nm) de 2'-dCyd, indicando los puntos donde se tomaron los espectros de absorción; (b), (c), (d) y (e) Espectros de absorción correspondientes a cada punto

Para un mejor entendimiento, se necesita saber el tiempo de retención de la solución de carga para estas condiciones, por lo que se realizó un simple experimento cromatográfico donde se ensayó un volumen de 20 μL de 5 % agua-95 % $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (77:23, v/v), sin nucleósido. El resultado se muestra en la Figura 7.3, donde se notan desviaciones de la línea base para tiempos de retención entre 2.6 y 3.7 minutos, con aparentes máximos de absorbancia bien marcados a 3.29 min y 3.47 min. Esto se debe a los gradientes abruptos de índice de refracción que se dan al pasar el volumen de solución de carga por el detector de absorbancia. Aunque el efecto en absorbancia es demasiado pequeño como para interferir en medida significativa con la señal superpuesta de los nucleósidos, queda la preocupación de que los analitos nunca salieron por completo de la solución de carga, es decir que nunca experimentaron la partición entre la fase estacionaria y la fase móvil isocrática, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (77:23, v/v), por lo que las separaciones cromatográficas con este sistema podrían ser ineficaces.

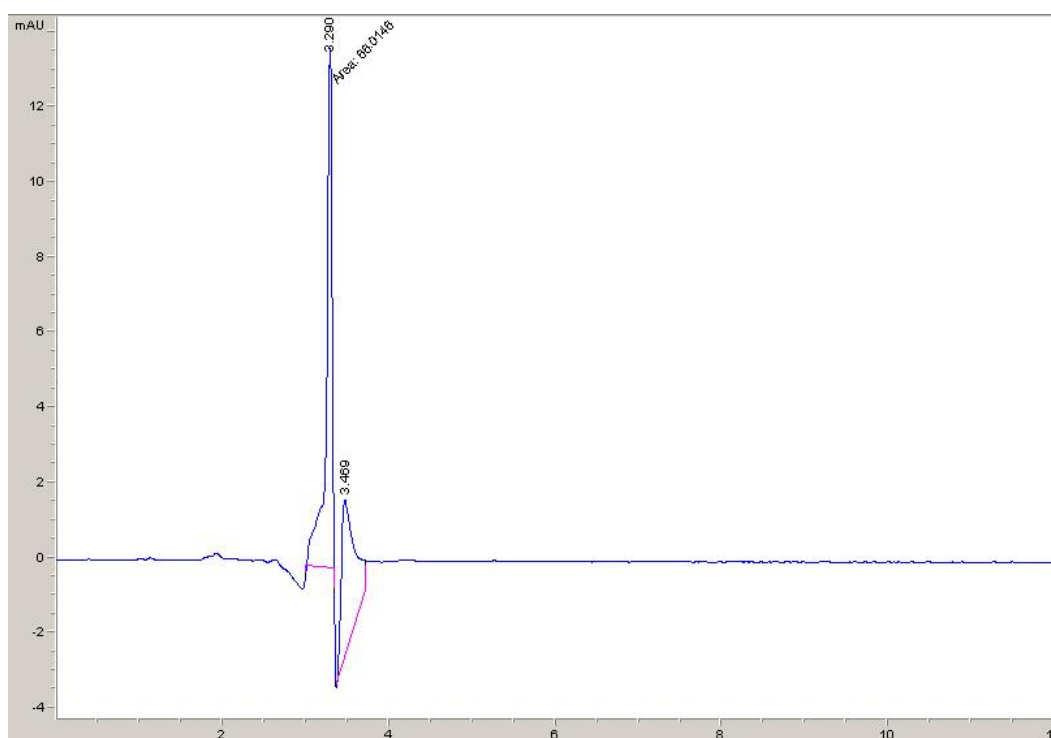


Figura 7.3: Cromatograma de 20 μL de 5 % agua-95 % $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (77:23, v/v), utilizando $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (77:23, v/v) como eluente

En la Tabla 7.1 se presenta un resumen de los tiempos en los cuales se dan las perturbaciones de la línea base debidas al paso del solvente de carga, y los tiempos de retención de los diferentes nucleósidos. Los datos demuestran un traslape sustancial de las señales de los nucleósidos con la solución de carga, lo que significa que éstos están siendo mal retenidos por la columna.

Tabla 7.1: Comparación de tiempos de retención de los nucleósidos utilizando como eluente CH₃CN/MeOH (77:23, v/v)

Analito	Inicia (min)	Termina (min)	Tiempo de retención (min)
2'-dAdo	3.37	3.75	3.46
2'-dGuo	3.34	3.73	3.42
2'-dCyd:			
primera banda	3.32	3.57	3.47
segunda banda	3.57	3.98	3.57
2'-dThd	3.13	3.49	3.26
2'-dUrd	3.17	3.46	3.26
5 % agua-95 % CH ₃ CN/MeOH (77:23, v/v)	Perturbación de línea base entre 2.6 y 3.7 min		

Las señales producidas por el paso del volumen de carga a través del detector de UV aparecen en un intervalo de tiempo de retención comprendido entre 2.6 min y 3.7 min. El inicio y término de las bandas producidas por los nucleósidos 2'-dThd y 2'-dUrd se traslapan con la solución de carga, es decir, que se encuentran dentro de su periodo de elución. Esto indica que estos nucleósidos no están siendo retenidos por la columna con la composición ensayada del eluente isocrático. Para los nucleósidos restantes, los picos se traslapan parcialmente con el volumen de elución de la solución de carga.

Por consiguiente, se ensayaron composiciones diferentes del solvente de elución, disminuyendo la proporción del componente de mayor polaridad, procurando una mejor

retención de los nucleósidos en la columna y un comportamiento más diferenciado de los nucleósidos ensayados; esto no por una necesidad de lograr una separación entre los diversos nucleósidos (que no serán analizados en una forma intermezclada), sino con miras a una separación cromatográfica entre estos nucleósidos y sus posibles productos de degradación por aminólisis.

El siguiente solvente de elución ensayado fue CH₃CN/MeOH (90:10, v/v). Como se muestra en la Figura 7.4, con este eluente los cinco desoxinucleósidos examinados muestran diferentes tiempos de retención: 3.34 min para la 2'-dAdo, 4.12 min para la 2'-dGuo, 5.30 min para la 2'-dCyd, 3.24 min para la 2'-dThd y 3.26 min para la 2'-dUrd (Tabla 7.2), lo que indica que en comparación con los resultados obtenidos con CH₃CN/MeOH (77:23, v/v), con el uso del nuevo eluente se logra una mejor retención

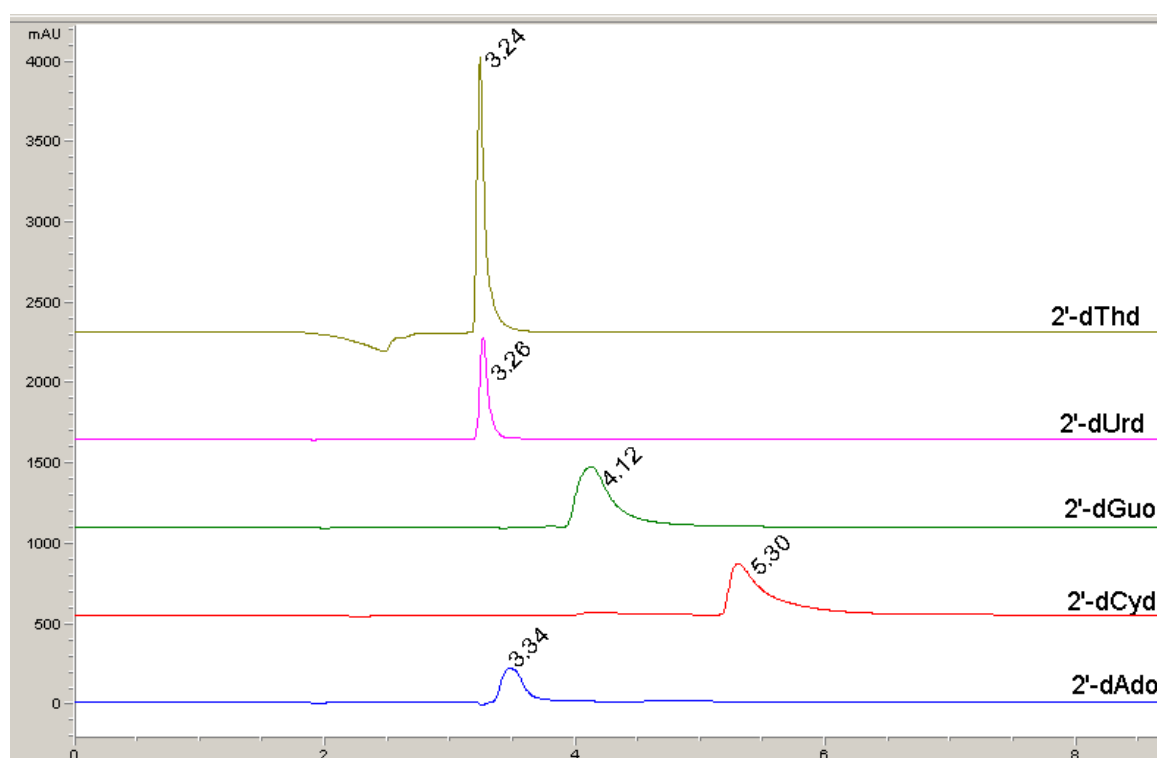


Figura 7.4: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de la elución isocrática de 2'-desoxinucleósidos, utilizando CH₃CN/MeOH (90:10, v/v) como eluente

Tabla 7.2: Comparación de tiempos de retención de los nucleósidos utilizando como eluyente CH₃CN/MeOH (90:10, v/v)

Analito	Inicia (min)	Termina (min)	Tiempo de retención (min)
2'-dAdo	3.34	3.71	3.48
2'-dGuo	3.91	4.56	4.13
2'-dCyd	5.15	5.70	5.30
2'-dThd	3.18	3.61	3.24
2'-dUrd	3.19	3.52	3.26
5 % agua-95 % CH ₃ CN/MeOH (90:10, v/v)			Perturbación de línea base entre 1.8 y 3.7 min

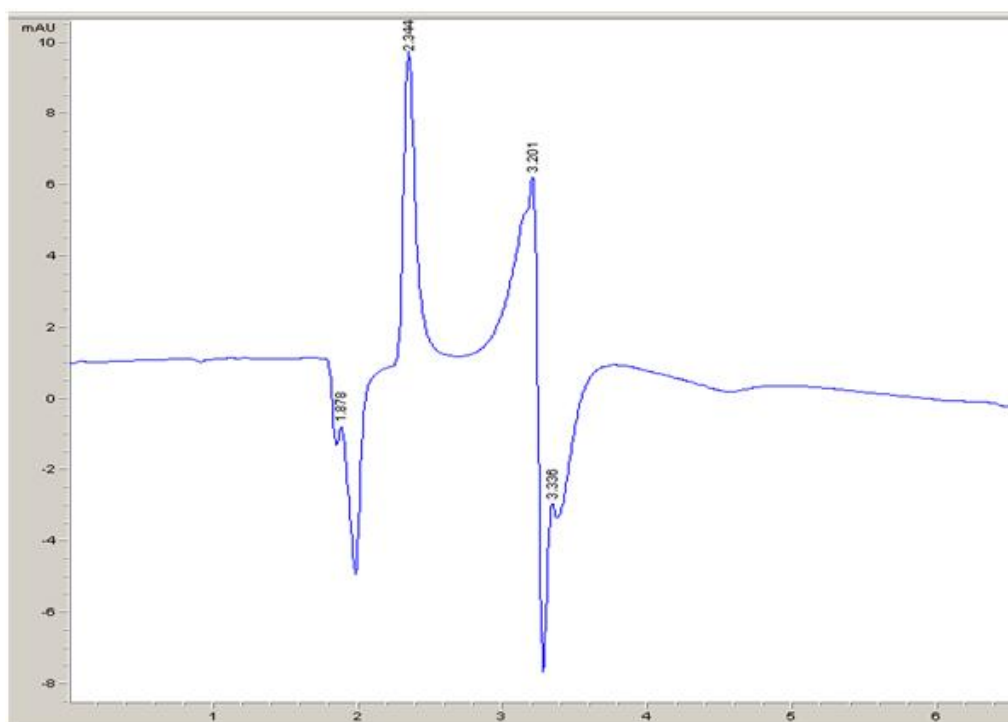


Figura 7.5: Cromatograma de 20 μ L de 5 % agua-95 % CH₃CN/MeOH (90:10, v/v), utilizando CH₃CN/MeOH (90:10, v/v) como eluyente

de la 2'-dCyd y la 2'-dGuo en la columna, mientras que para la 2'-dThy, la 2'-dUrd, y la 2'-dAdo los tiempos de retención coinciden con el paso de la solución de carga, que en este sistema abarca desde 1.80 a 3.70 minutos, como lo muestra la Figura 7.5, donde se aprecia un efecto óptico similar al que se observó con la composición de eluente anteriormente ensayada.

Con el eluente CH₃CN/MeOH (90:10, v/v), las bandas para los nucleósidos 2'-dCyd y 2'-dGuo muestran una marcada tendencia a una forma asimétrica (*tailing*), lo que luego pudiera interferir en la interpretación de mezclas más complejas. Por esta razón, se ensayó una composición diferente de eluente, a saber, CH₃CN/Me-OH (85:15, v/v), composición intermedia entre las antes ensayadas. Con este solvente de elución se reduce el problema del 'tailing', como se aprecia en la Figura 7.6.

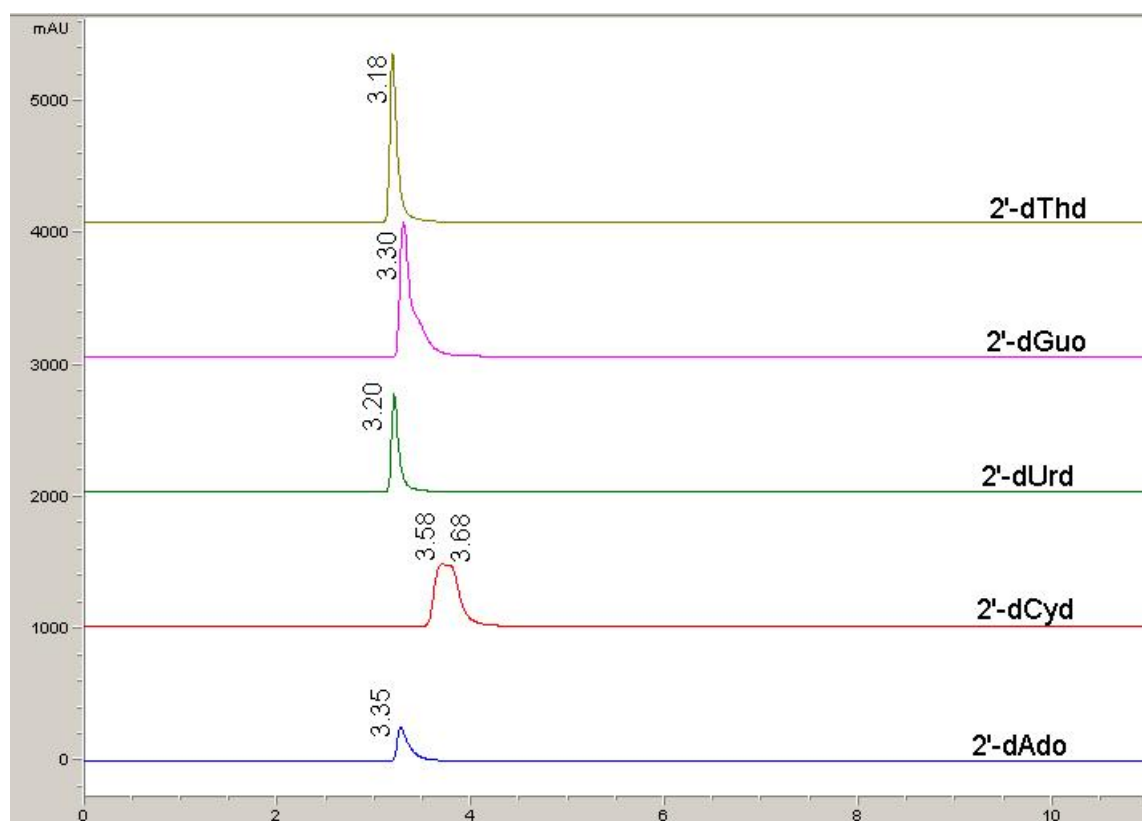


Figura 7.6: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de la elución isocrática de 2'-desoxinucleósidos, utilizando CH₃CN/MeOH (85:15, v/v) como eluente

Tabla 7.3: Comparación de tiempos de retención de los nucleósidos utilizando como eluyente CH₃CN/MeOH (85:15, v/v)

Analito	Inicia (min)	Termina (min)	Tiempo de retención (min)
2'-dAdo	3.16	3.57	3.35
2'-dGuo	3.16	3.52	3.30
2'-dCyd:			
primera banda	3.19	3.66	3.58
segunda banda	3.66	4.03	3.68
2'-dThd	3.10	3.38	3.18
2'-dUrd	3.10	3.38	3.20
5 % agua-95 % CH ₃ CN/MeOH (85:15, v/v)			Perturbación de línea base entre 1.8 y 3.90 min

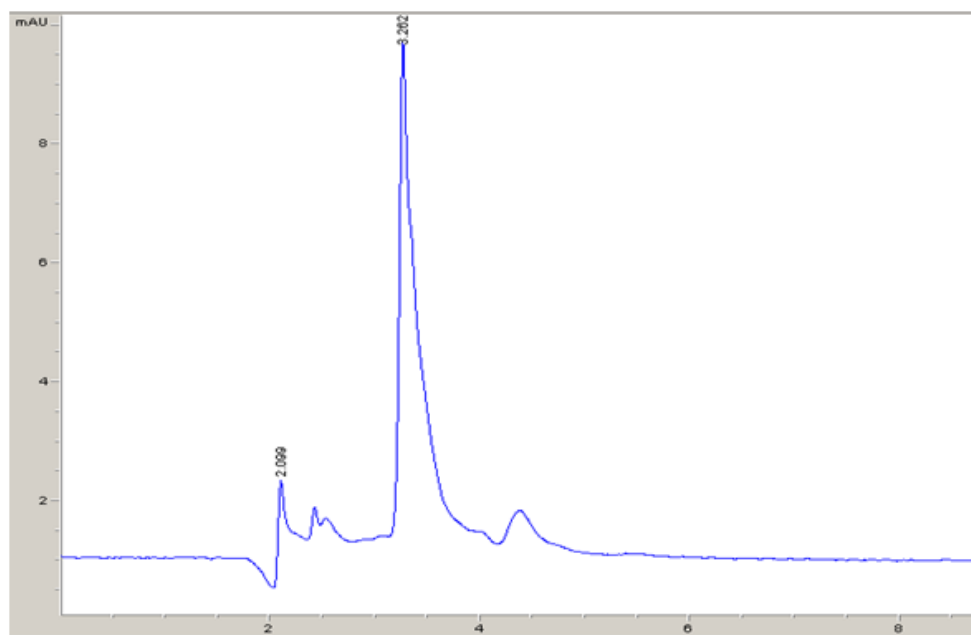


Figura 7.7: Cromatograma de 20 μ L de 5 % agua-95 % CH₃CN/MeOH (85:15, v/v), utilizando CH₃CN/MeOH (85:15, v/v) como eluyente

En este caso, la perturbación de la línea base va de 1.80 min a 3.90 min, con aparentes máximos de absorbancia a 2.01 y 3.26 min. Con estas condiciones, la 2'-dCyd se ve rezagada respecto a la solución de carga, mientras que los demás desoxinucleósidos eluyen dentro de ese volumen, aunque con ligeras diferencias, siendo la 2'-dAdo y la 2'-dGuo ligeramente ralentizadas con respecto a la 2'-Thd y la 2'-dUrd (Tabla 7.3).

Este último eluyente, CH₃CN/MeOH (85:15, v/v), fue utilizado en la gran mayoría de los casos para el análisis de las diversas corridas cinéticas que se realizaron.

7.2. Reacciones de pirrolidinólisis de desoxinucleósidos

Aunque en los trabajos anteriores [Ambrose y Pless, 1985; Ambrose, 1986; Ambrose y col., 1988; Testoff y Pless, 1991; González-Jasso y col., 2007] la gran mayoría de los experimentos de aminólisis de polinucleótidos se habían llevado a cabo con piperidina, en el presente trabajo la amina empleada fue la pirrolidina, amina secundaria cíclica de geometría molecular muy parecida a la piperidina. Además, sus valores de pK_a son prácticamente idénticos: 11.30, para la pirrolidina, y 11.20, para la piperidina. Esto obedece a la situación de difícil adquisición de la piperidina, cuya distribución está vedada, por ser esta sustancia utilizada como material de partida en la manufactura ilícita de la feniclidina. Comparaciones directas de la reactividad de las dos aminas, piperidina y pirrolidina, con oligonucleótidos no mostraron diferencias detectables [González-Jasso y col., 2007].

Los experimentos cinéticos de pirrolidinólisis se llevaron a cabo para los cuatro desoxinucleósidos canónicos del ADN, a saber, 2'-dAdo, 2'-dGuo, 2'-Thd y 2'-dCyd. También se incluyó el análogo 2'-dUrd. En todos los casos se usó pirrolidina a una concentración de 500 mM, a temperatura constante de 110°C. En el caso de la 2'-dThd no se realizó un análisis cinético tan detallado, debido a que la vida media de esta molécula en pirrolidinólisis resultó ser extremadamente larga, estimándose en más de 1000 h.

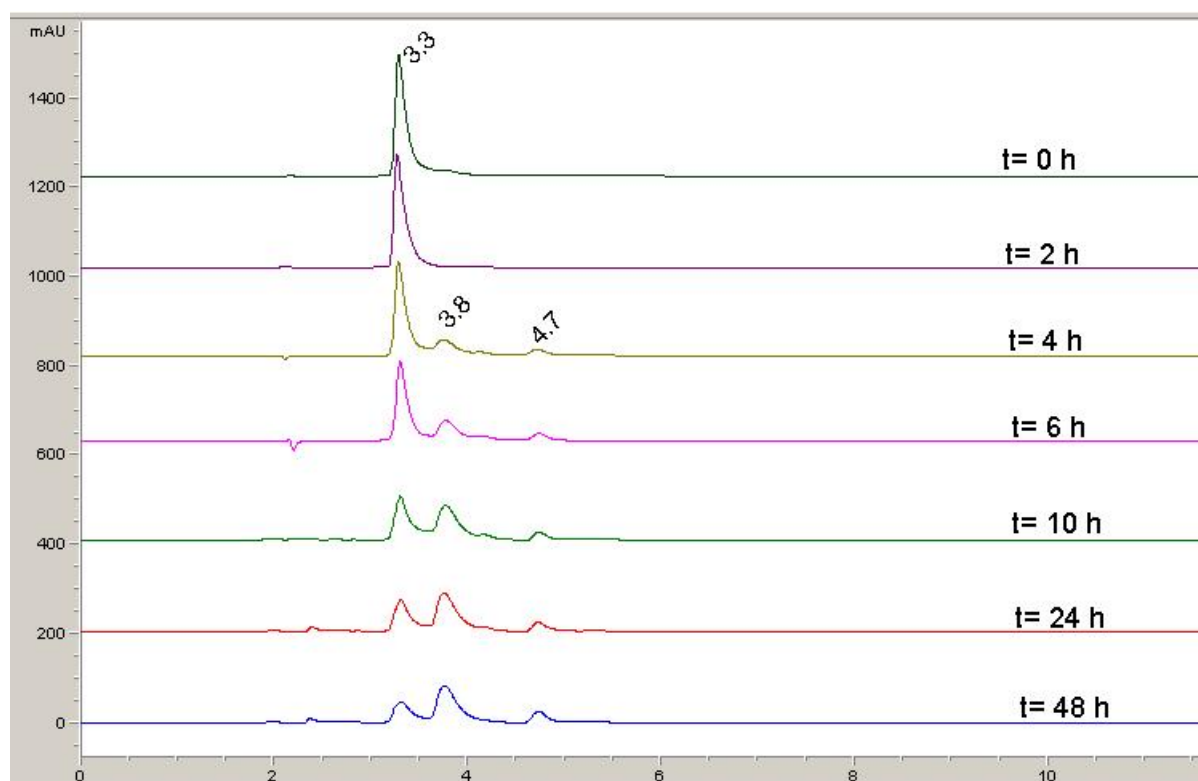


Figura 7.8: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dAdo tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

En la Figura 7.8 se muestran los perfiles cromatográficos, a 280 nm, obtenidos para las pirrolidinólisis de 2'-dAdo, por los tiempos de reacción indicados. Se observa a lo largo del tiempo de reacción una progresiva disminución de la banda con tiempo de retención de 3.3 min, que representa el material de partida, 2'-dAdo. En el perfil que corresponde a 4 horas de tratamiento, se perciben pequeñas bandas nuevas, con tiempos de retención de 3.8 y 4.7 min, indicando productos de la reacción. Estas bandas se vuelven más importantes tras tiempos de reacción mayores.

Para las bandas que eluyen a 3.8 min y 4.7 min en el cromatograma que corresponde a $t = 48$ h, se presentan los espectros de absorción, registrados para el punto máximo de la banda en cada caso, en la Figura 7.9. El primero de ellos tiene un espectro de absorción semejante al de la adenina ($\lambda_{max} \approx 259$ nm, $\lambda_{min} \approx 225$ nm), mientras que el

segundo tiene un espectro diferente ($\lambda_{max} \approx 277$ nm).

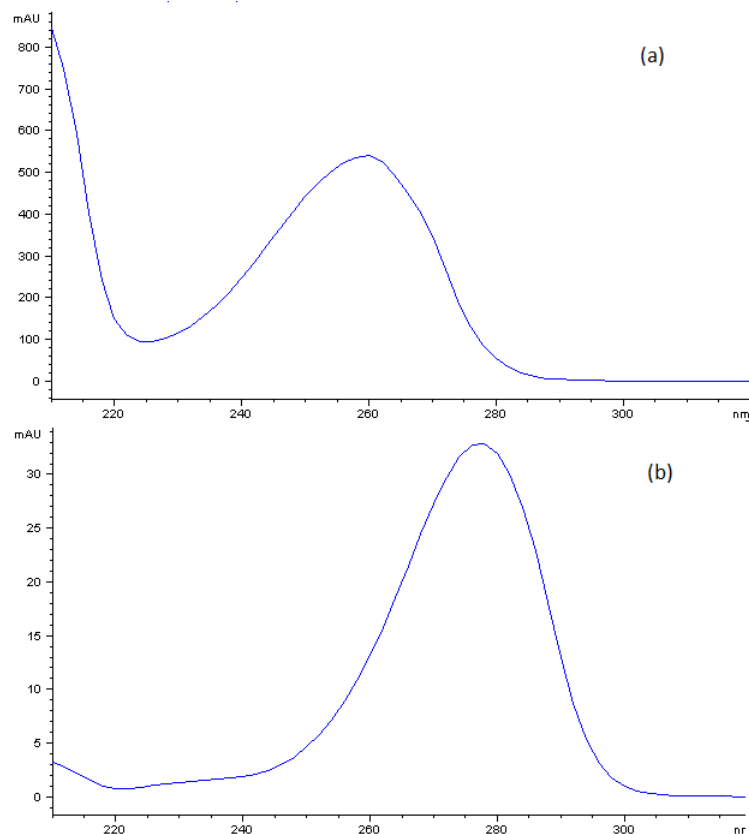


Figura 7.9: Espectros de absorción de los productos que eluyen en HPLC a: (a) 3.8 min y (b) 4.7 min, tras 48 horas de pirrolidinólisis de la 2'-dAdo

Si de hecho el primero de estos productos fuera la base libre adenina, esto implicaría la ruptura del enlace glicosídico entre la base heterocíclica y la 2-desoxirribosa. Esto propone la posibilidad de que la banda observada a 4.7 min sea un producto derivado por una reacción secundaria de la 2-desoxirribosa una vez liberada. De hecho, experimentos posteriores (pág. 95 de esta tesis) mostraron que en estas condiciones la 2-desoxirribosa rápidamente rinde un producto con este espectro de absorción en UV y este tiempo de retención.

Para una evaluación de la cinética de descomposición de los 2'-desoxinucleósidos en las condiciones ensayadas, se graficó la altura del pico cromatográfico correspondiente

al material inicial, en función del tiempo de pirrolidinólisis. En la Figura 7.10 se muestra un ejemplo que corresponde a la 2'-dAdo, junto con la línea de ajuste para una cinética de decaimiento de primer orden.

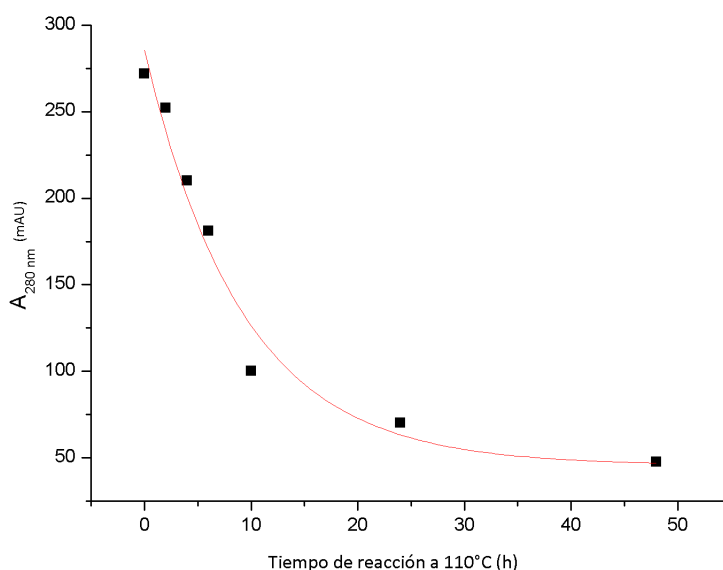


Figura 7.10: Cinética de la descomposición de la 2'-dAdo con pirrolidina a 500 mM, a 110°C

Además, se hizo un análisis de los datos utilizando una ecuación de cinética de primer orden, a saber:

$$A = A_0 * e^{-kt}$$

donde A es la señal del analito después de un tiempo de reacción t , A_0 es la señal inicial del mismo analito (es decir, a $t = 0$ h), y k es la constante de velocidad de primer orden. Esta ecuación se usó para la determinación de k , mediante un programa de ajuste, para cada uno de los analitos. A partir de los valores de k se calcularon los correspondientes valores de $t_{1/2}$, mediante la ecuación $t_{1/2} = \ln 2/k$. Los resultados obtenidos de este análisis para la pirrolidinólisis de cuatro de los 2'-desoxinucleósidos se resumen en la

Tabla 7.4, junto con los coeficientes de correlación, R^2 . El valor calculado de $t_{1/2} = 6.37$ h para la degradación de la 2'-dAdo es comparable con el estimado grueso de 10 h reportado por Arredondo Vázquez [2008] para posiciones de A en oligodesoxirribonucleótidos, en estas mismas condiciones.

Tabla 7.4: Resultados cinéticos de las reacciones de pirrolidinólisis de los 2'-desoxinucleósidos, a 110°C

ANALITO	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	R^2
2'-dAdo	0.1088	6.37	0.9696
2'-dGuo	0.0111	63.0	0.9918
2'-dUrd	0.1744	3.96	0.9946
2'-dCyd	0.0873	7.97	0.9925
2'-dThd		≈ 1000	

En la Figura 7.11 se muestra el comportamiento cinético de los productos de la pirrolidinólisis de 2'-dAdo a 110°C. La forma de las curvas, en ambos casos, indica que los productos son relativamente estables en las condiciones de reacción utilizadas y que se comportan como dos productos directos del material inicial. Después de 10 h se observa que la tendencia de incremento inicial en la altura de las bandas cambia y se mantiene constante en función del tiempo.

Para el análisis de la reacción entre la 2'-dGuo y la pirrolidina, tanto las condiciones de reacción como los parámetros en el análisis por HPLC fueron los mismos que en el caso de la 2'-dAdo. Los resultados se muestran en la Figura 7.12. Comparando los valores cinéticos para 2'-dGuo obtenidos con los correspondientes de la 2'-dAdo se observa claramente que la 2'-dGuo reacciona más lentamente (por un factor de 10, ver Tabla 7.4), confirmando preliminarmente la suposición inicial de que la tasa de ataque en la base guanina en el nucleósido, 2'-dGuo, sería significativamente menor, debido a la desprotonación que sufre la base guanina en el ambiente fuertemente básico, un evento

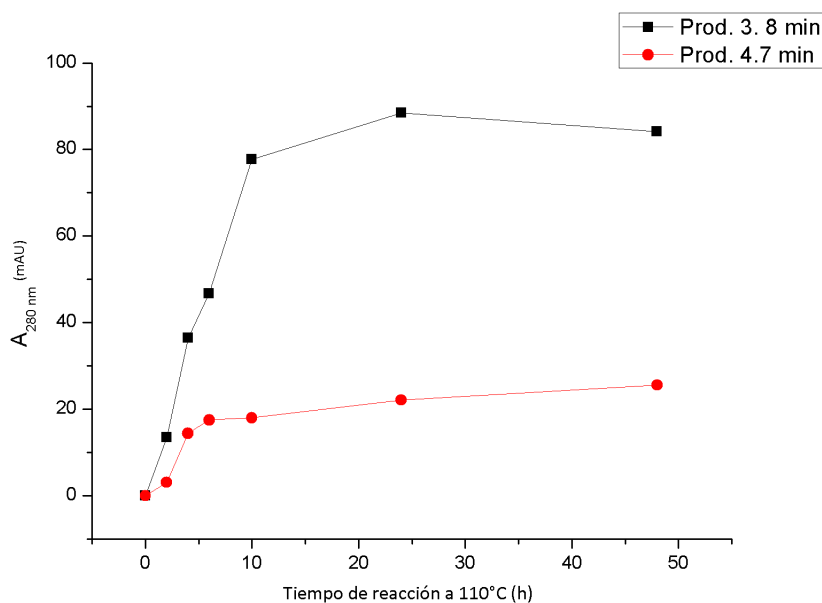


Figura 7.11: Cinética de la aparición de los productos de la pirrolidinólisis de 2'-dAdo a 110°C

que no se da en medida total en el caso de los oligonucleótidos, debido al efecto de campo eléctrico de los grupos fosfato [Martínez Reyes, 2007].

Para mayor claridad, la Figura 7.13 muestra el trazo cromatográfico correspondiente a $t = 96$ h (en escala aumentada), en el cual se pueden observar algunas pequeñas bandas atribuibles a los productos de esta reacción. Los espectros de absorción en UV de los productos que eluyen a 2.9 min y 4.0 min (Figura 7.14) no proporcionan información contundente que permita su identificación preliminar. También se muestra el espectro correspondiente al compuesto que eluye a 3.3 min, que verifica que es el material inicial, 2'-dGuo. Posteriormente, a 5.1 min eluye un material con un máximo de absorbancia de 277 nm, tal y como sucedió en el experimento de la 2'-dAdo. Las bandas que representan a los productos de la reacción, son por mucho menores en comparación con la del nucleósido inicial.

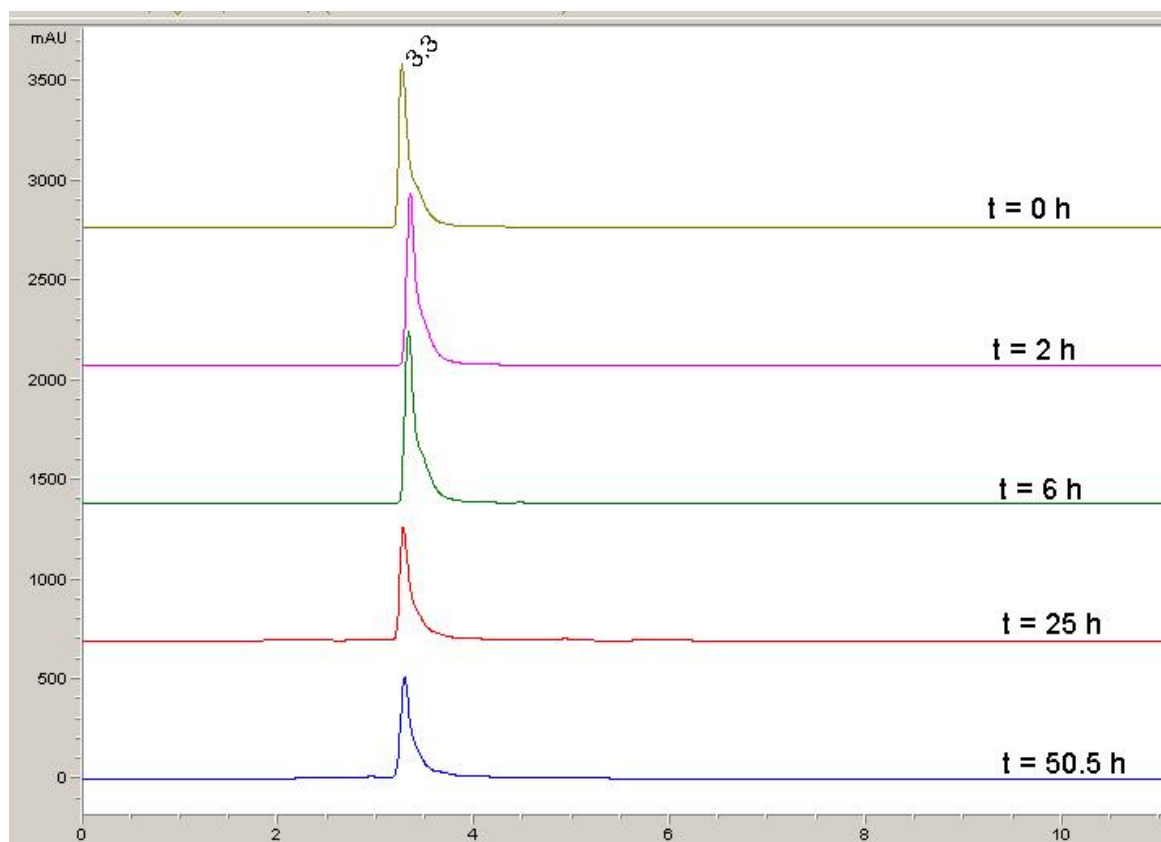


Figura 7.12: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dGuo tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

Se puede considerar la reacción del grupo guanina con un producto de la descomposición de la desoxirribosa. Por ejemplo, Hecht y col. [1992] describieron la formación, en bajo rendimiento, de compuestos del tipo 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina, con 4-oxo-2-pental (= 3-acetilacroleína). Sin embargo, en los experimentos realizados en esta tesis, la pirrolidinólisis de los nucleósidos no conduce a la formación de 4-oxo-2-pental (aunque en el caso de los oligonucleótidos d-TAT y d-TGT este producto sí se da). Por ende, no es de sorprender que ninguno de los productos de la pirrolidinólisis de la 2'-dGuo (Figura 7.14, a, c, y d) muestra un espectro de absorción semejante al que fue registrado por Hecht y col. [1992] en solución acuosa a pH 7, para el aducto formado entre la 2'-dGuo y el 4-oxo-2-pental, con $\lambda_{max} = 229$ nm, $\lambda_{min} = 247$ nm, $\lambda_{max} = 284$ nm.

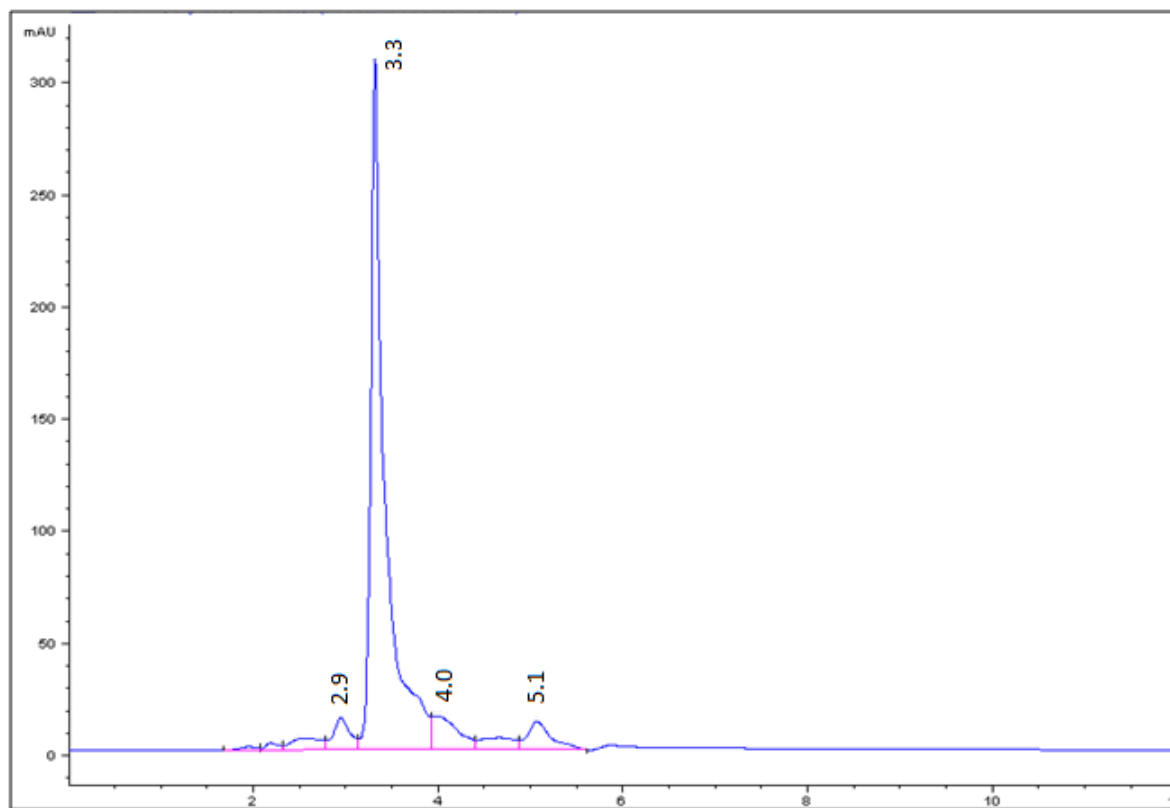


Figura 7.13: Perfil cromatográfico de la 2'-dGuo, a 280 nm, tras pirrolidinólisis a 110°C por 96 h

Para la pirrolidinólisis de la 2'-dThd, en este caso con análisis por HPLC usando CH₃CN/MeOH (77:23, v/v) como fase móvil, se determinó que el nucleósido prácticamente no sufre degradación alguna (Figura 7.15). Los espectros de absorción en UV del material que eluye a 3.3 min, para tiempos de reacción de 0 h y 22 h, son muy similares, con $\lambda_{max} \approx 266$ nm, verificando que se trata del mismo compuesto. Para este nucleósido se estimó muy gruesamente una vida media de más de 1000 horas, siendo significativamente mayor comparado con los valores de alrededor de 100 horas estimados para las posiciones T en oligodesoxirribonucleótidos en el trabajo anterior de Arredondo-Vázquez [2008]. Es probable que las tasas de cercenamiento en posiciones T en esos trabajos con oligonucleótidos reflejaran ante todo una escisión por radiólisis causado por el radioisótopo ³²P, efecto que está ausente en el presente trabajo. En este contexto vale considerar que experimentos de solvólisis en solución acuosa de piperidina a alta temperatura, con

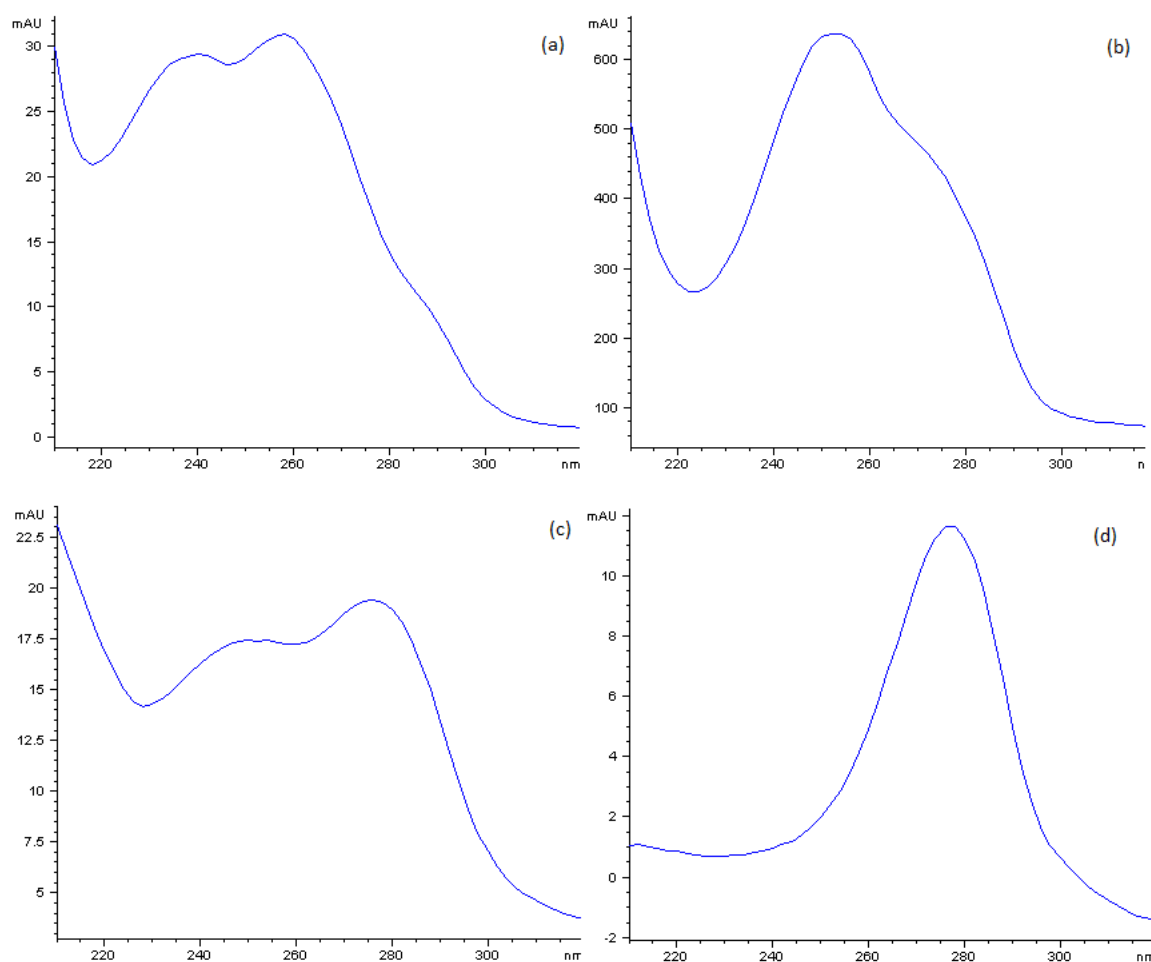


Figura 7.14: Espectros de absorción de los productos que eluyen en HPLC a: (a) 2.9 min, (b) 3.3 min, (c) 4.0 min y (d) 5.1 min, tras 96 h de pirrolidinólisis de la 2'-dGuo

un polinucleótido que se había marcado con ^{32}P 10 días antes, resultaron en escaleras autorradiográficas en las que las bandas relacionadas con las posiciones de timina en el polímero eran las más fuertes, indicando que la radioactividad resulta predominantemente en lesiones en las bases timina que predisponen a estas posiciones al subsiguiente cercenamiento por aminólisis [Ambrose, 1986]. El trabajo de Uliana y col. [1971] indica que, bajo irradiación por una fuente de cobalto-60, en solución acuosa a pH 7, la tasa de descomposición de las bases sigue el orden $T > C > A \approx G$, tanto para los monodesoxirribonucleótidos como para el ADN.

Otra consideración en este contexto es que en ambientes básicos, ataques nucleofílicos que se puedan dar a baja frecuencia sobre grupos de timina en polinucleótidos pueden ser aún severamente reducidos en el caso de los nucleósidos de timina, nuevamente por consideración del efecto de campo de los grupos fosfato en el caso polinucleotídico, argumento que en esta tesis se hace en repetidas ocasiones con respecto a la reactividad diferencial del grupo guanina en los ámbitos nucleosídico y polinucleotídico.

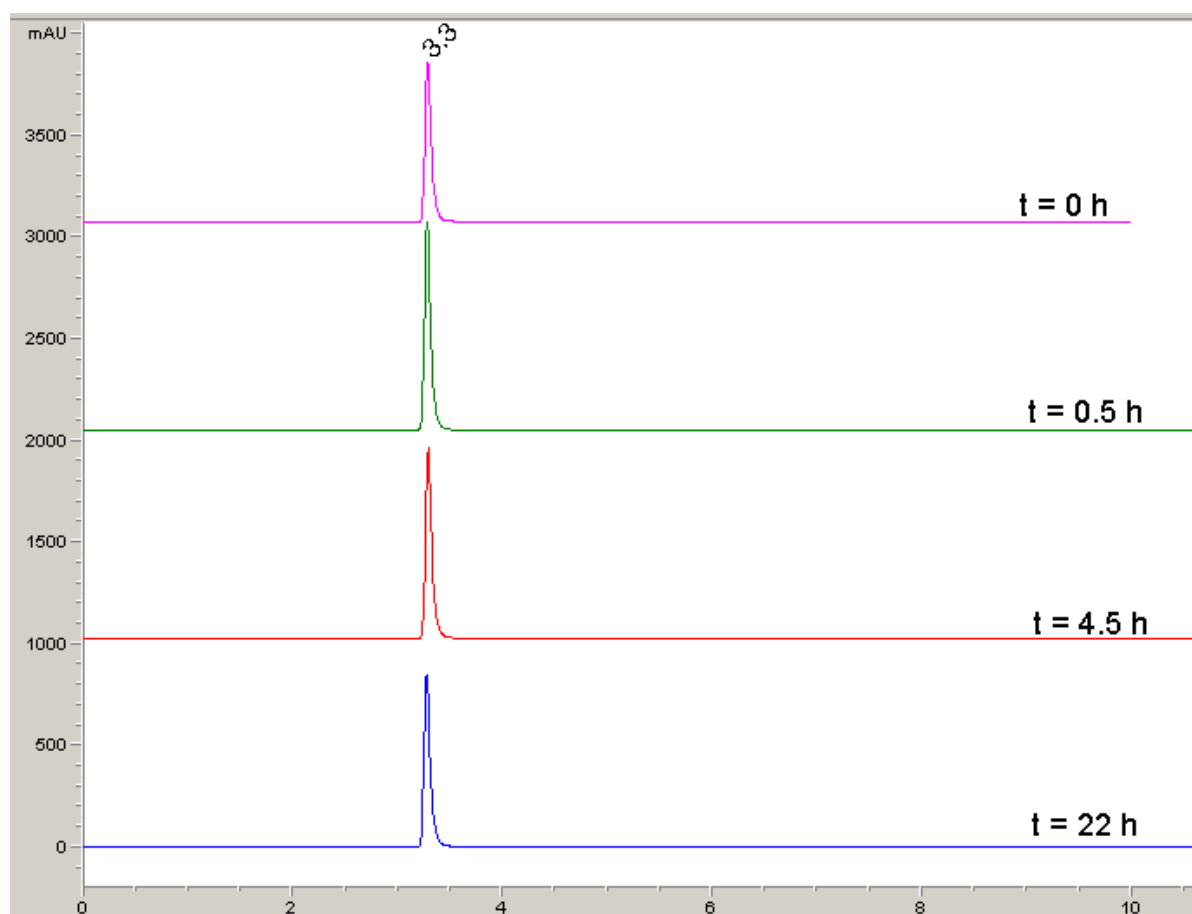


Figura 7.15: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dThd, tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

Las reacciones de pirrolidinólisis de los 2'-desoxinucleósidos ensayados hasta el momento producen una nueva señal con un máximo de absorbancia a 277 nm, con un

tiempo de retención aproximado de 5 min para los tres ensayos. Si de hecho se trata del mismo material en todos los casos, es probable que se origine de la parte que es común en estos nucleósidos, es decir, pudiera ser un producto derivado de la 2-desoxirribosa.

A continuación se ensayó la pirrolidinólisis de la 2'-dCyd. En la Figura 7.16 se puede ver una banda que eluye a 3.25 min y que tiene un espectro de absorción con valores de $\lambda_{max} \approx 257$ nm y $\lambda_{min} \approx 227$ nm (Figura 7.17 a), similares a los reportados en la literatura para la 2'-dUrd a pH 1-7, $\lambda_{max} = 262$ nm y $\lambda_{min} = 231$ nm [Beaven y col., 1955], considerando que los datos de la literatura se refieren a solución acuosa; aunque también pudiera ser uracilo. La aparición temprana de este material en el aminolisato de la 2'-dCyd se interpreta como resultado de la pérdida del grupo 4-amino de la aglicona por hidrólisis, en analogía a la desaminación reportada por Lönnberg y col. [1986] para el ribonucleósido, citidina, en solución acuosa de NaOH a pH 13 y 90°C, con una k de $2.6 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$ ($= 0.094 \text{ h}^{-1}$; $t_{1/2} = 7.4 \text{ h}$). En las condiciones del experimento, la 2'-dUrd, a su vez, se descompone rápidamente, con una $k = 0.1744 \text{ h}^{-1}$.

También, a un tiempo de retención de 4.7 min se aprecia una pequeña banda que tiene $\lambda_{max} \approx 270$ nm, 236 nm y $\lambda_{min} \approx 257$ nm (Figura 7.17 d), que pudiera tratarse de citosina. Los datos reportados en la literatura para la base citosina en solución acuosa a pH 7-10 indican una $\lambda_{max} = 267$ nm [Beaven y col., 1955]. Sin embargo, el tiempo de elución de la base libre citosina utilizando fase móvil CH₃CN/MeOH (85:15, v/v) fue de 3.8 min (no mostrado), indicando una diferencia significativa contra el tiempo de 4.7 min registrado para la banda observada. También es improbable que este material sea un aducto del tipo 3, N⁴-etenocitidina, formado por una reacción entre la Cyt o la 2'-dCyd con la 2-desoxirribosa, ya que esta reacción requeriría del encuentro entre dos especies presentes en concentraciones muy bajas (concentraciones milimolares); además, el espectro de absorción de este material no corresponde al reportado en la literatura para este tipo de cromóforo. Así, por ejemplo, la 3, N⁴-etenocitidina presente, en solución acuosa neutral, tiene un máximo de absorción a 270 nm y un mínimo de absorción fuertemente marcado a 230 nm [Barrio y col., 1976].

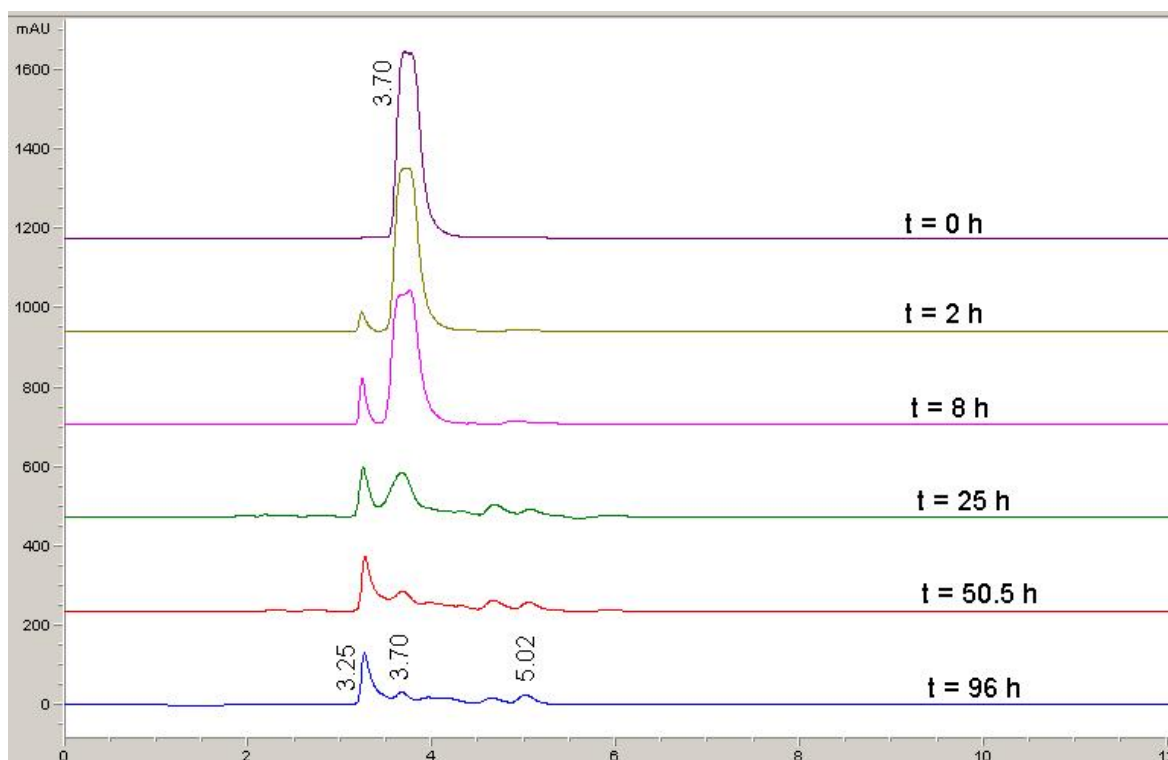


Figura 7.16: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dCyd tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

En los perfiles cromatográficos resultantes de los tiempos tardíos de esta reacción se forma una pequeña banda con tiempo de retención de 4.0 min, la cual no se había observado en los ensayos de pirrolidinólisis anteriores (Figura 7.17 c). A 5.02 min de tiempo de retención se aprecia una banda atribuible al producto que absorbe maximalmente aproximadamente a 277 nm, presente en los casos antes mencionados.

En los presentes análisis, para pirrolidinólisis a 110°C, la 2'-dCyd es sólo ligeramente menos vulnerable que la 2'-dAdo (Tabla 7.4). En cambio, en los ensayos de cercenamiento de oligodesoxirribonucleótidos, la reactividad en cuanto a cortes en posiciones A y C se relacionaba aproximadamente como 3:1 [Arredondo Vázquez, 2008]. Es posible que en el ámbito oligonucleotídico, el ataque aminolítico sobre las posiciones C resulte inicialmente en una hidrólisis que forma una unidad de desoxiuridilato, sin cercenamiento inmediato de la cadena. La degradación de la posición de U, rápida de

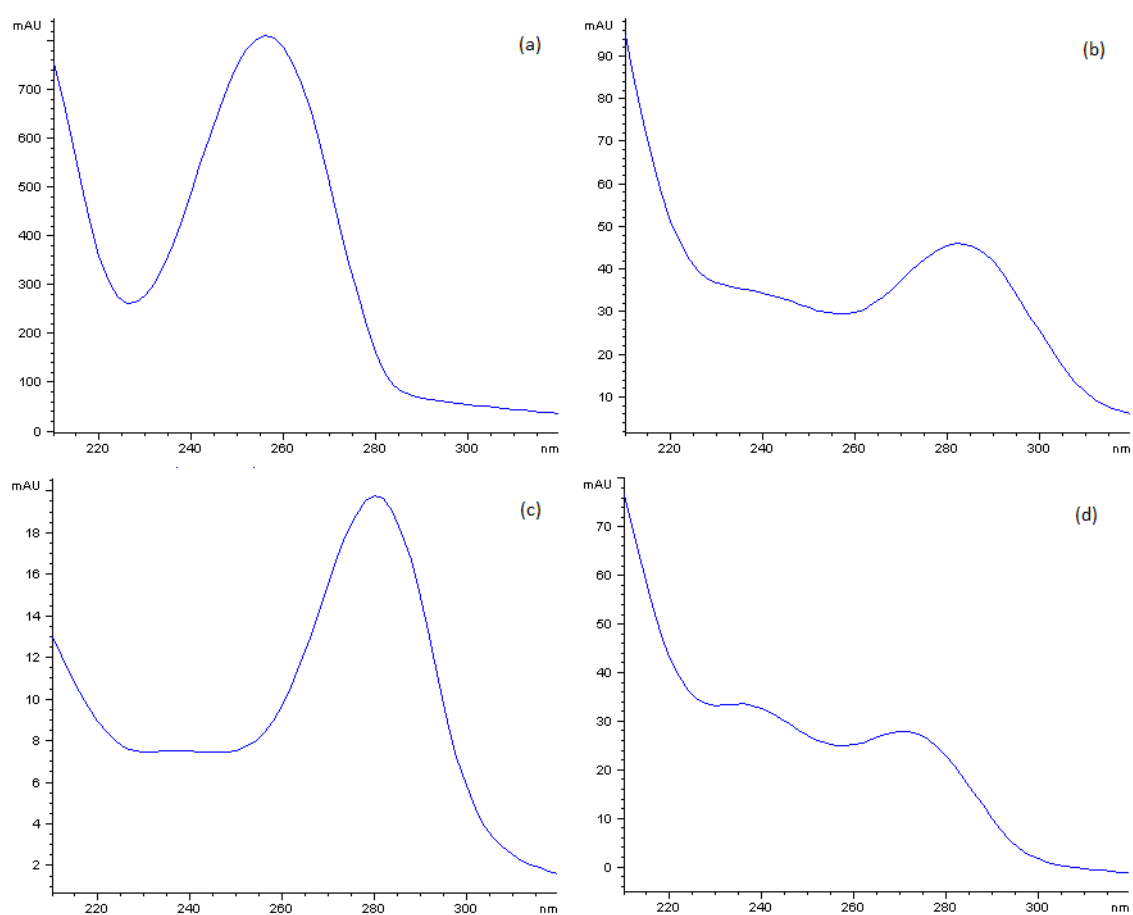


Figura 7.17: Espectros de absorción en UV de los productos que eluyen en HPLC a: (a) 3.25 min, (b) 3.7 min, (c) 4.0 min y (d) 4.7 min, tras 96 horas de aminólisis de la 2'-dCyd

acuerdo a los presentes resultados, luego redundaría en cercenamiento de la cadena. Si esto es el caso, los fragmentos radiactivos observados en los trabajos anteriores [Ambrose y Pless, 1985; Testoff y Pless, 1991; González-Jasso y col., 2007; Arredondo Vázquez, 2008] bien pueden haber contenido una medida sustancial de daño críptico interno, en forma de unidades de desoxiuridilato.

También se ensayó la reacción entre la 2'-dUrd, que se anticipaba fuera menos resistente que la 2'-dThd por consideraciones electrónicas. Tanto las condiciones de reacción como el análisis por HPLC fueron realizados de igual manera que con la 2'-dAdo. Los resultados se muestran en la Figura 7.18.

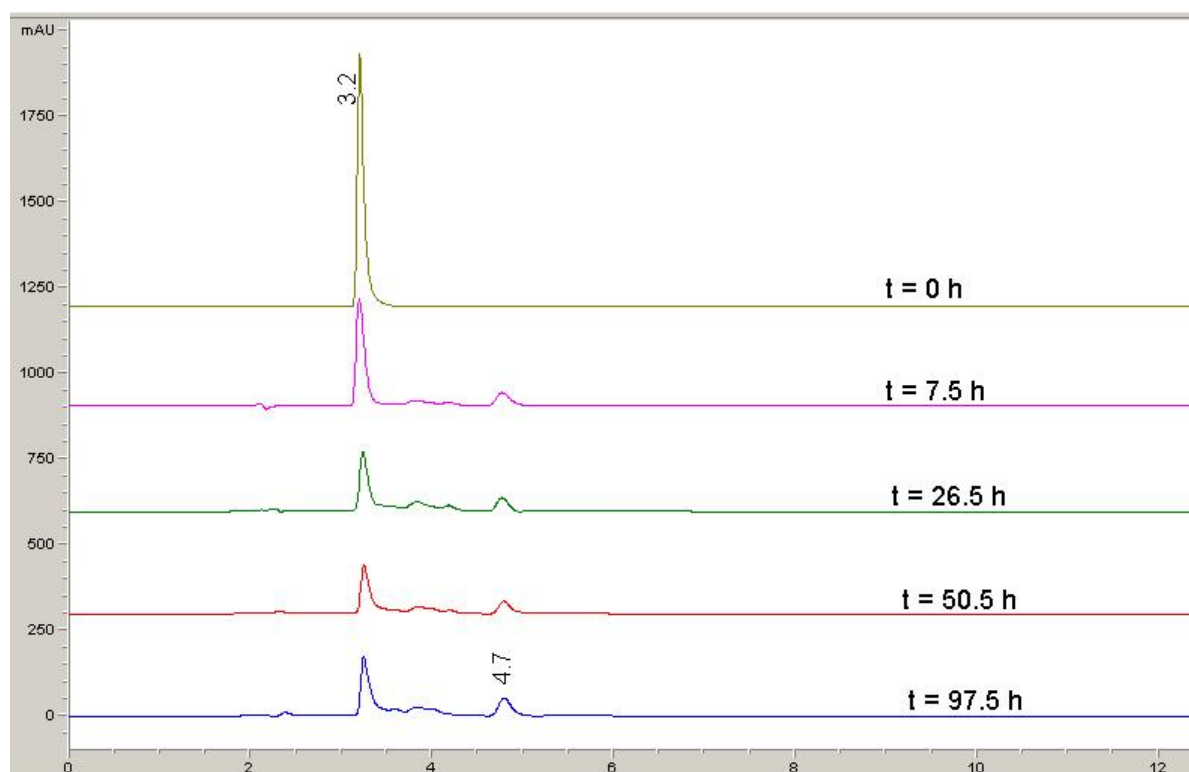


Figura 7.18: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dUrd tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

La degradación de la 2'-dUrd se produce rápidamente en las primeras horas de reacción, con una $k = 0.1744 \text{ h}^{-1}$, sin embargo después de 26.5 h la altura de la banda ya no disminuye. El comportamiento observado sugiere la formación de la base libre uracilo que estaría eluyendo al mismo tiempo que la 2'-dUrd. Este hecho explicaría la presencia de la banda que eluye a 3.2 min para tiempos tardíos de reacción, es decir, de acuerdo a la tasa de desaparición de la 2'-dUrd, la cantidad de este nucleósido debería ser cercana a cero después de tales periodos de tratamiento (por ejemplo 97.5 h) y, sin embargo, se observa una banda a ese mismo tiempo de elución. En este contexto se deben mencionar los resultados de Lönnberg y col. [1986] sobre la degradación del ribonucleósido, uridina, en NaOH a 0.01 M, a 90°C, donde determinaron para k un valor de $0.45 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$ ($= 0.0162 \text{ h}^{-1}$; $t_{1/2} = 42.8 \text{ h}$). Estos autores no reportaron formación de uracilo para esta reacción; indican que la uridina sólo deriva en productos no cromofóricos.

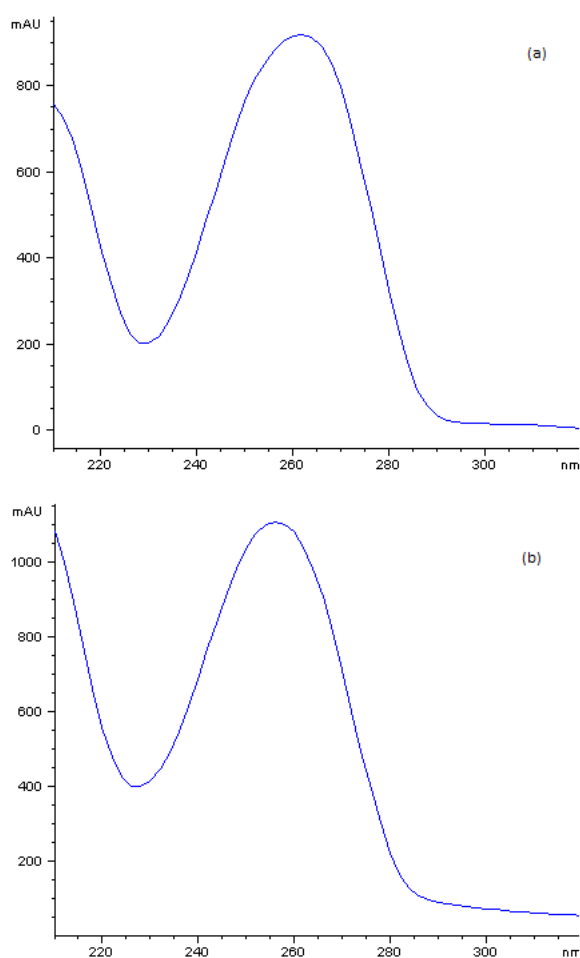


Figura 7.19: Espectros de absorción de: (a) 2'-dUrd a tiempo cero; (b) producto que eluye a 3.2 min en HPLC, tras 97.5 h de pirrolidinólisis de la 2'-dUrd

La Figura 7.19 muestra los espectros de absorción del producto que eluye a 3.2 min, tras 97.5 h de pirrolidinólisis de la 2' d-Urd, así como el correspondiente al material inicial, 2'-Urd, a tiempo cero. El espectro de absorbancia para el nucleósido tiene $\lambda_{max} \approx 262$ nm y $\lambda_{min} \approx 228$ nm, los cuales coinciden con los reportados en la literatura para este nucleósido en solución acuosa a pH 1-7, $\lambda_{max} = 262$ nm y $\lambda_{min} = 231$ nm. Los datos espectrales del producto mostrado en la figura, con $\lambda_{max} \approx 257$ nm, coinciden con los datos reportados en la literatura para el uracilo en solución acuosa a pH 4.4-7.2, $\lambda_{max} = 259.5$ nm; así, se verifica las suposiciones mencionadas con anterioridad. La banda que eluye a 4.7 min tiene $\lambda_{max} \approx 277$ nm, similar a las observadas en ensayos anteriores.

7.3. Pirrolidinólisis de adenosina

Para el caso de la pirrolidinólisis del ribonucleósido adenosina (Ado), los experimentos de degradación fueron realizados de la misma forma que con los 2'-desoxirribonucleósidos: ribonucleósido a 5 mM, amina a 500 mM, a una temperatura de 110°C, con la excepción que se utilizaron capilares de borosilicato, con volúmenes de líquido de 20 μL . Para el análisis cromatográfico se usó como eluyente $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (90:10, v/v). Los tiempos de reacción comprenden un intervalo desde 0 hasta 48 horas. Los perfiles cromatográficos resultantes, con un seguimiento a 280 nm, se muestran en la Figura 7.20. A partir de 1 h aparece una banda con un tiempo de retención de 4.80 min como único producto de la reacción que absorbe a 280 nm.

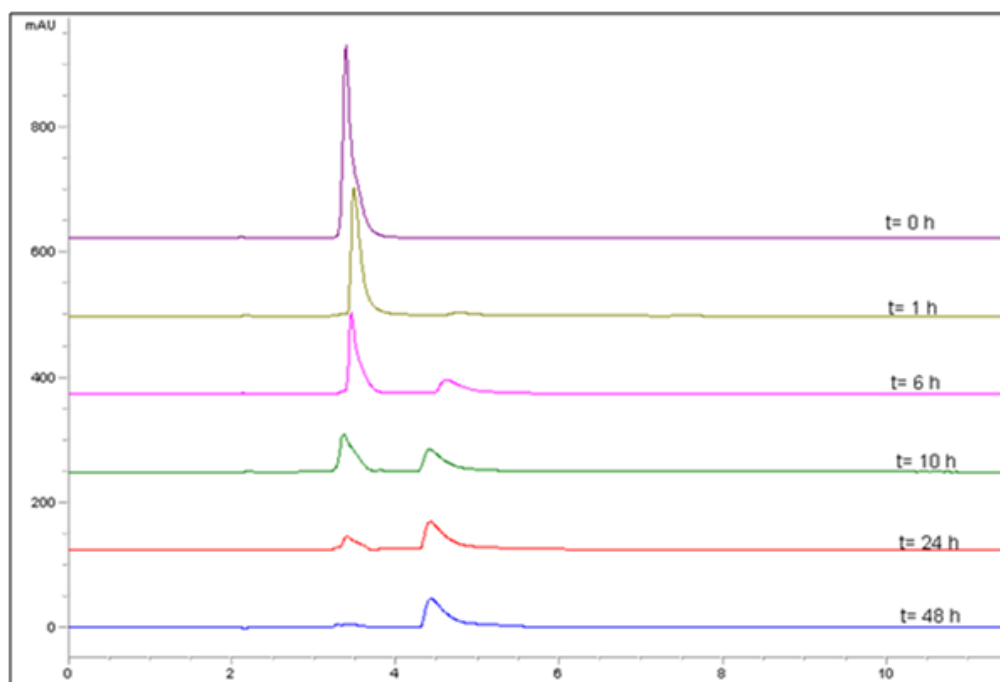


Figura 7.20: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la adenosina, tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

El espectro de absorción en UV con una $\lambda_{max} \approx 259$ nm de tal especie química coincide con el obtenido en la degradación de la 2'-dAdo, lo que sugiere que se trata de

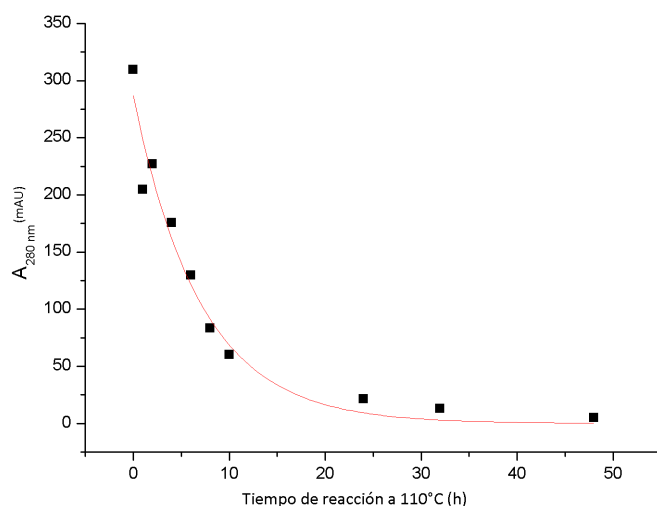


Figura 7.21: Cinética de la pirrolidinólisis de la adenosina a 110°C

la base adenina. Este evento confirma que también para el caso de los ribonucleósidos se produce, en primera instancia, la liberación de la base heterocíclica del residuo monosacárido. Para tiempos tardíos de esta reacción no aparece ninguna otra banda, en el intervalo de longitudes de onda monitoreadas. Este hecho sugiere que en las condiciones de pirrolidinólisis ensayadas la ribosa reacciona de manera distinta que la 2-desoxirribosa.

Mediante el análisis cinético de la reacción (Figura 7.21) se calculó una constante de velocidad con un valor de 0.1427 h^{-1} , lo que equivale a una vida media de 4.88 h ($R^2 = 0.9623$). Comparando estos valores con los obtenidos para la 2'-dAdo, se verifica un incremento en la tasa de reacción de aproximadamente un 30%. Esto representa un argumento en contra de un mecanismo A1 para el cercenamiento del enlace glicosídico de los nucleósidos de adenina en estas reacciones en ambiente amínico acuoso. En el mecanismo A1, que rige en solución acuosa en condiciones neutrales o ácidas, el desoxirribonucleósido reacciona más rápido que el ribonucleósido, ya que en este mecanismo el estado de transición se caracteriza por una carga parcial positiva en C-1', situación que se dificulta en el caso del ribonucleósido, por el efecto inductivo del grupo 2'-OH.

7.4. Efecto de la temperatura en la reacción de 2'-dAdo

Para evaluar el efecto de la temperatura en las reacciones de pirrolidinólisis de la 2'-dAdo se ensayaron cuatro temperaturas diferentes: 90°C, 100°C, 110°C y 120 °C. Las reacciones se llevaron a cabo tanto en ampollitas, para el caso de 120°C, como en capilares de borosilicato, para las temperaturas restantes. Se emplearon volúmenes de 200 μL y 20 μL , respectivamente. Las constantes de velocidad de primer orden (k) para cada caso se resumen en la Tabla 7.5. En este caso no se muestran los perfiles cromatográficos.

Tabla 7.5: Valores de k para la pirrolidinólisis de la 2'-dAdo a diferentes temperaturas

T (°C)	k (h^{-1})	1/T (K^{-1})	R^2
90	0.0254	0.00275	0.9965
100	0.0562	0.00268	0.9956
110	0.1088	0.00261	0.9696
120	0.3014	0.00254	0.9876

La energía de activación (E_a) para la degradación de la 2'-desoxiadenosina se determinó a partir de los valores de k obtenidos a diferentes temperaturas de reacción mediante la ecuación de Arrhenius:

$$k = A * e^{-E_a/RT}$$

donde k es la constante de velocidad, E_a es la energía de activación, R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura absoluta y A es el factor de frecuencia; éste está relacionado con la frecuencia de las colisiones. Resulta más conveniente tener esta ecuación en su forma logarítmica, para poder obtener el valor de E_a dividido entre la constante de los gases ideales, que sería la pendiente de la ecuación, entonces:

$$\ln k = \ln k_0 - E_a/RT$$

En la Figura 7.22 se grafican los valores de $\ln k$ contra $1/T$.

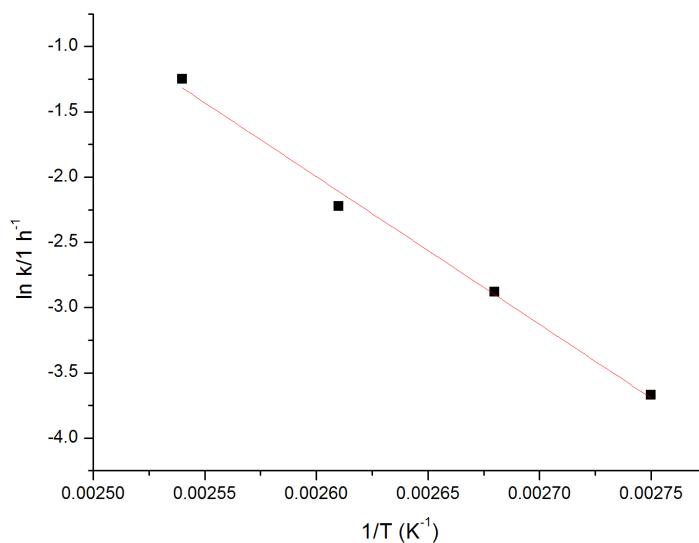


Figura 7.22: Gráfica de Arrhenius de la reacción de 2'-dAdo en solución acuosa de pirrolidina a 500 mM.

Del ajuste lineal se obtuvo, con $R^2 = 0.9908$:

$$\ln k = 27.43 - [-11318.57 \text{ K } (1/T)]$$

es decir, la pendiente de la línea de ajuste tiene el valor de -11,318.57 K. Esta pendiente es igual a E_a/R .

$$11318.57 \text{ K} = E_a/R$$

$$E_a = R * 11318.57 \text{ K}$$

$$E_a = 11318.57 \text{ K} * (1.987 \text{ cal/K mol})$$

$$E_a = 22.405 \text{ kcal/mol} = 94.103 \text{ kJ/mol}$$

Como se esperaba, el aumento de la temperatura en el sistema aceleró de forma monótona la velocidad de la reacción de pirrolidinólisis de 2'-dAdo. El valor de la energía de activación que se deduce de estos datos, $E_a = 22.4$ kcal/mol es similar al obtenido en trabajos anteriores para la hidrólisis de 2'-dAdo en solución acuosa a pH neutral, $E_a = 23.4$ kcal/mol [Ratsep y Pless, 1988]. Este hecho podría indicar que el evento fundamental es la fractura del enlace glicosídico en ambos casos.

7.5. Amonólisis de 2'-dAdo y 2'-dGuo

Para la determinación del efecto que tiene la basicidad de la amina utilizada sobre la velocidad de reacción, fue ensayada la descomposición de los nucleósidos 2'-dAdo y 2'-dGuo en solución acuosa de amoníaco a 500 mM, a 110°C. El amoníaco se escogió por ser significativamente menos básico que la pirrolidina empleada inicialmente.

En el caso de la 2'-dAdo se obtuvo una k de 0.0080 h^{-1} ($R^2 = 0.9701$), que corresponde a $t_{1/2} = 86.6$ h. Este valor de $t_{1/2}$ es aproximadamente 13 veces mayor que en el caso de la pirrolidinólisis del mismo compuesto, 0.1088 h^{-1} . En los perfiles cromatográficos (Figura 7.23), se aprecia sólo un producto con tiempo de elución a 3.8 min, que pudiera ser la base libre, adenina. El hecho de que en los trazos cromatográficos se observe una sola banda atribuible a productos de la reacción sugiere un comportamiento distinto al mostrado por la pirrolidina. Alternativamente, podría indicar que, a diferencia de la pirrolidina, el amoníaco no reacciona con la 2-desoxirribosa liberada. Es evidente que las gráficas resultantes son más sencillas y limpias, facilitándose así el análisis de las mezclas de reacción. El efecto en la reducción de la velocidad de la reacción probablemente se debe a que el amoníaco es menos nucleofílico y por ende menos efectivo en su ataque sobre la base heterocíclica. Los valores de nucleofilicidad, n_{CH_3I} , reportados en la literatura para amoníaco y pirrolidina son 5.50 y 7.23, respectivamente [Pearson y col., 1968].

La Figura 7.24 muestra los trazos cromatográficos para la amonólisis de la 2'-Guo. La banda que eluye a 2.6 min, es semejante a la observada en la pirrolidinólisis del mismo nucleósido, tanto en tiempo de elución como en datos espectrales. Para la degradación

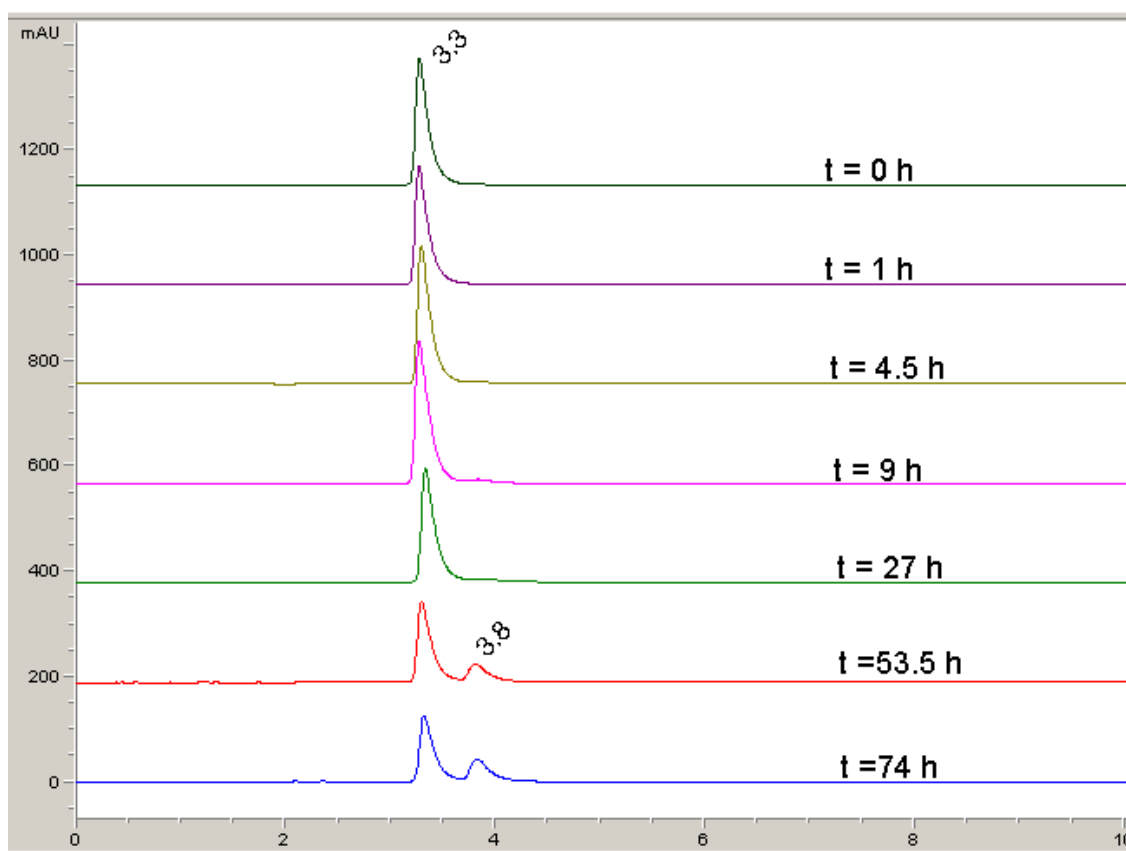


Figura 7.23: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dAdo, tras amonólisis por diferentes tiempos de reacción

de 2'-dGuo con amoníaco acuoso (amonólisis) a 500 mM, a 110°C, se calculó $k = 0.0387 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0.9888$), con una vida media de 18.24 h.

A diferencia de los resultados obtenidos para la 2'-dAdo, la tasa de reacción en este caso es por mucho más rápida usando amoníaco en lugar de pirrolidina. Se puede considerar que el amoníaco, aunque menos nucleofílico que la pirrolidina, es menos básico que ésta, y por lo tanto reacciona más rápido con la 2'-dGuo, por desprotonizarla en menor medida. Los valores de pK_a del amoníaco y de la pirrolidina en solución acuosa a 25°C están reportados en 9.24 [Everett y Landsman, 1954], 11.30 [Hetzer y col., 1963], respectivamente, de lo que se calculan valores de pH de 11.47 y 12.48, respectivamente, para soluciones acuosas de estas aminas a 500 mM y 25°C. Esta diferencia en la

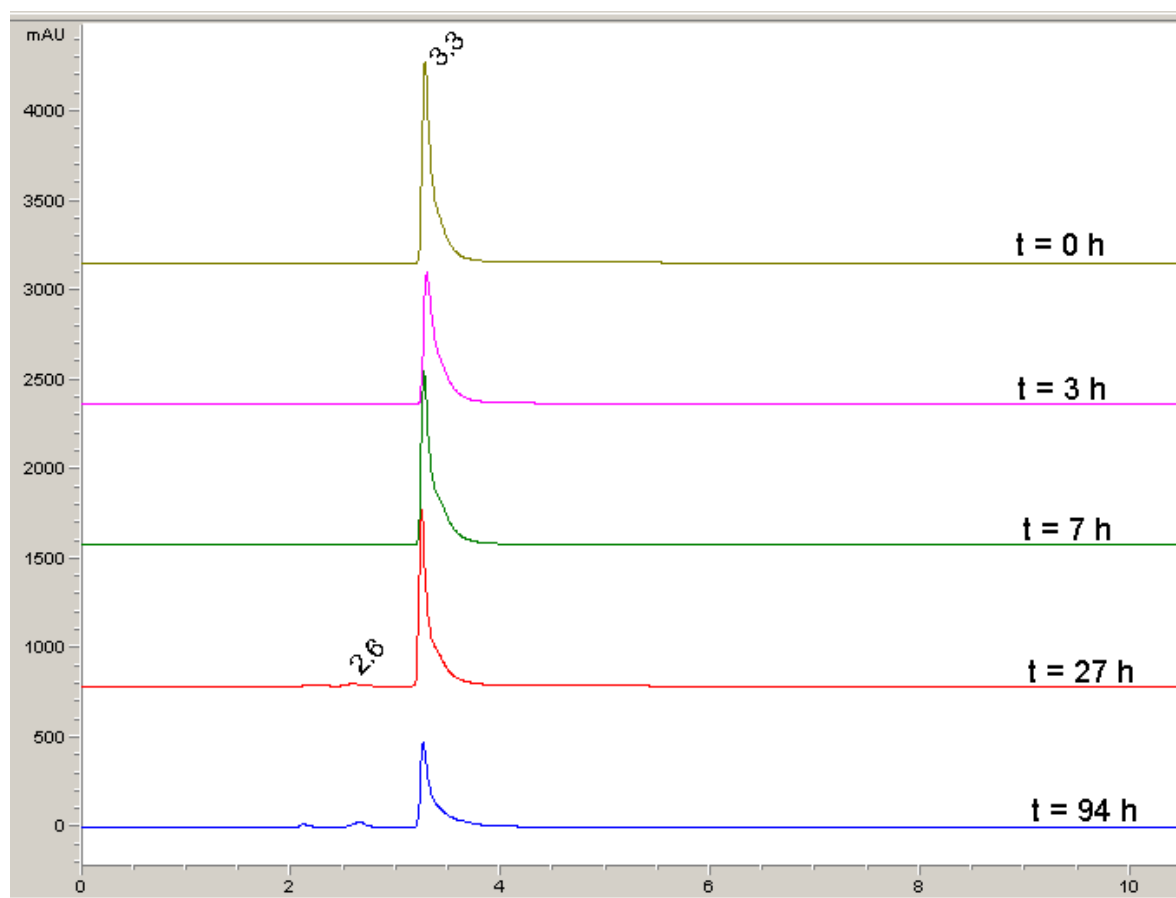


Figura 7.24: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para la 2'-dGuo, tras amonólisis por diferentes tiempos de reacción

basicidad de estas aminas también se da para solución acuosa a 110°C (pK_{as} de 7.2 y 9.1, respectivamente, para amoníaco y pirrolidina, valores calculados por extrapolación) [González-Jasso y col., 2007].

El aumento de la reactividad de la base guanina a nivel nucleosídico por aminas menos básicas, coincide con lo reportado para el ataque a oligonucleótidos en las posiciones ocupadas por la base guanina [González-Jasso y col., 2007], donde se observó, por ejemplo, un orden de $G > A > C > T$ para la intensidad de las bandas en solvólisis en 500 mM de amoníaco acuoso a 110°C, comparada con una secuencia de $A > G \approx C > T$ para la reacción en pirrolidina acuosa a 500 mM, a 110°C.

7.6. Efecto de la concentración de la pirrolidina

Con el propósito de examinar el efecto de la concentración de la amina atacante sobre la velocidad de la reacción en reacciones de degradación de 2'-dAdo a 110°C, se ensayaron tres concentraciones distintas de pirrolidina: 0.2 M, 0.5 M y 1.5 M, y además se realizó un ensayo en ausencia de esta amina. Las demás condiciones de la reacción fueron las usuales. Los resultados obtenidos se muestran en forma numérica en la Tabla 7.6, y en forma gráfica en la Figura 7.25.

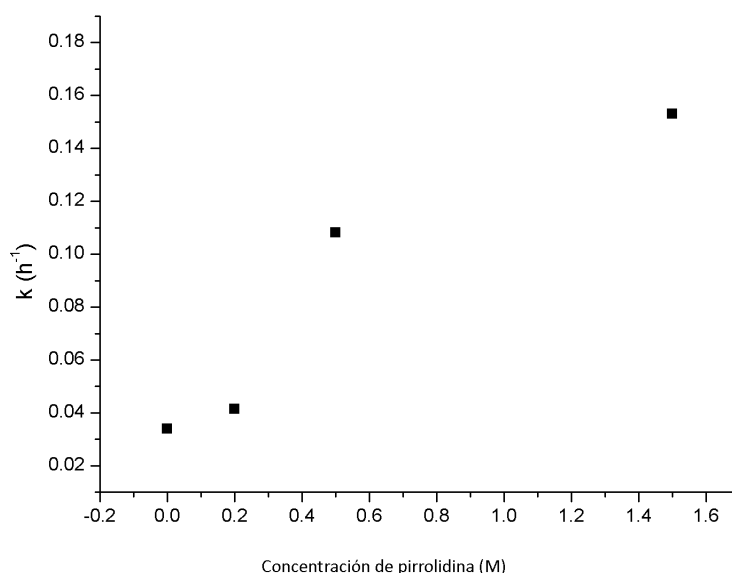


Figura 7.25: Constantes de velocidad de primer orden (k) para la pirrolidinólisis de 2'-dAdo a 110°C, a diferentes concentraciones de amina

Según la gráfica, la constante de velocidad de primer orden aumenta de manera monótona al aumentar la concentración de la pirrolidina, lo que representa el resultado esperado. El valor de $k = 0.0339 \text{ h}^{-1}$ obtenido para la reacción sin amina (0 M), es comparable con el reportado para la hidrólisis de 2'-dAdo a 110°C, en solución acuosa amortiguada con cacodilato de sodio a 15 mM, pH 6.9, $k = 0.0302 \text{ h}^{-1}$ [Ratsep y Pless, 1988].

El hecho de que, en ausencia de amina, se da una tasa significativa de degradación de la 2'-dAdo sugiere que en las condiciones de pirrolidinólisis ensayadas en el presente trabajo, hay una contribución de la reacción del propio solvente, agua, con el nucleósido. Sin embargo, es probable que esta reacción, en alrededor de pH 7 está relacionada linealmente con la concentración de los iones hidronio [Ratsep y Pless, 1988], ya se ve prácticamente anulada en las condiciones fuertemente básicas de las soluciones acuosas de pirrolidina.

Tabla 7.6: Valores de k para la pirrolidinólisis de la 2'-dAdo a diferentes concentraciones de esta amina

Concentración pirrolidina (M)	k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	R ²
Sin amina	0.0339	21.00	0.9803
0.2 M	0.0415	16.15	0.9877
0.5 M	0.1088	6.37	0.9696
1.5 M	0.153	4.53	0.9760

En la Figura 7.25, el comportamiento de k en función de la concentración de la amina claramente diverge de lo lineal. Para esto, se pueden proponer explicaciones. Los puntos para $[\text{pirrolidina}] = 0.2 \text{ M}$ y $[\text{pirrolidina}] = 0.5 \text{ M}$, están relacionados de manera lineal, como se espera si la concentración de la amina entra en la ecuación cinética en primer orden. La desviación de k para $[\text{pirrolidina}] = 0$ hacia un valor mayor se puede explicar por una reacción del nucleósido con el agua, por un mecanismo del tipo A1, como arriba mencionado. La desviación de k para $[\text{pirrolidina}] = 1.5 \text{ M}$ hacia un valor menor puede deberse a que a altas concentraciones de la amina la solución se vuelve menos polar, con lo que se dificulta la reacción. Este efecto se había notado de manera cualitativa, en las aminólisis de polinucleótidos en soluciones concentradas de piperidina (2.5 M) [Ambrose y Pless, 1985].

7.7. Efecto isotópico del solvente en la reacción

Estas reacciones se llevaron a cabo en capilares selladas de vidrio de borosilicato a 110°C. Se usaron volúmenes totales de 10 μL de solución de óxido de deuterio conteniendo 500 mM de pirrolidina y 5 mM de nucleósido inicial. Después de este paso, los aminolisatos se prepararon de la forma usual, con agua, para su análisis por HPLC.

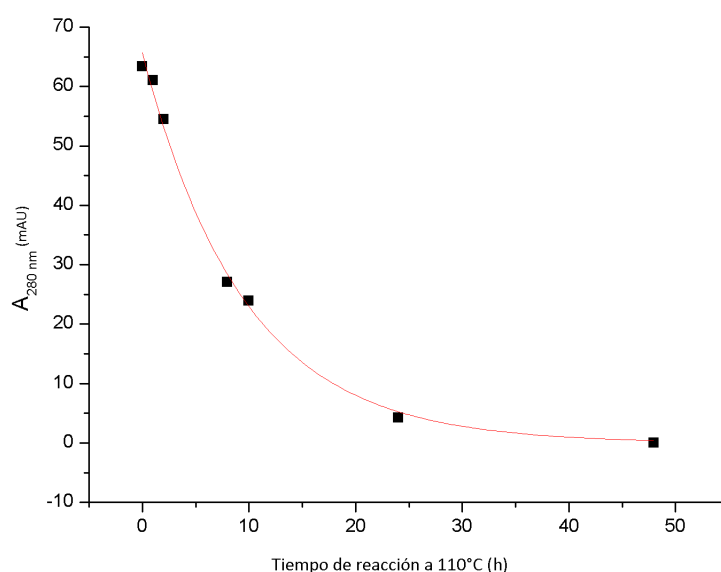


Figura 7.26: Cinética de la descomposición de la 2'-dAdo con pirrolidina a 110°C, utilizando óxido de deuterio como solvente

La progresión de la degradación del nucleósido se presenta en la Figura 7.26. El valor de k obtenido fue de 0.1050 h^{-1} , con $R^2=0.9959$. Para el caso de la pirrolidinólisis de 2'-dAdo utilizando H_2O como solvente, la reacción tenía una k de 0.1088 h^{-1} (Tabla 7.4). Esta similitud en los valores de la constante de velocidad para ambos casos indica que no existe un efecto isotópico del solvente en la reacción. Esto se interpreta en el sentido de que el paso definitorio de la reacción no involucra un traspaso de protón (o deuterón) desde el H_2O o D_2O , ya que tales situaciones generalmente se manifiestan por un efecto cinético isotópico del solvente importante. Así, para la hidrólisis del anhídrido

propiónico o del anhídrido succínico en H_2O y en D_2O , Davis y Hogg [1983] reportan efectos cinéticos isotópicos del solvente (k_{H_2O}/k_{D_2O}) de aproximadamente 3.

A semejantes conclusiones también se había llegado en un estudio anterior a nivel de polinucleótido, donde en una comparación entre H_2O y D_2O como solventes para la reacción de un polinucleótido marcado con ^{32}P en su terminal 5', por 5 horas a $90^\circ C$, en solución de 0.3 M NaCl/0.5 M piperidina (amina cíclica secundaria semejante a la pirrolidina), la evaluación de los autorradiogramas indicó aproximadamente la misma tasa de degradación general del polinucleótido y la misma vulnerabilidad relativa entre las diferentes bases heterocíclicas [Ambrose, 1986].

7.8. Ensayos de solventes acuoso-etanólicos en la reacción de 2'-dAdo

En la reacción de pirrolidinólisis de la 2'-dAdo y la 2'-dGuo, se ensayaron diversas composiciones de solventes acuoso-etanólicos, a saber, 30 % (v/v), 50 % (v/v), 75 % (v/v), 95 % (v/v) de etanol (en este último solvente sólo en el caso de la 2'-dAdo), para conocer el efecto de diferentes solventes sobre la velocidad de reacción.

Con respecto a la 2'-dAdo, no se aprecia una degradación evidente del nucleósido inicial para los tres últimos porcentajes (Figura 7.27). Cuando el solvente contiene una fracción de 30 % (v/v) de etanol (Figura 7.28), la velocidad de reacción se reduce por un orden de magnitud con relación a la reacción en solvente completamente acuoso (Tabla 7.7). Probablemente este efecto se deba a la disminución de la constante dieléctrica del solvente, siendo el solvente acuoso-alcohólico menos apto para la estabilización del zwitterión, que es el probable resultado inmediato del ataque de la amina sobre el nucleósido. Éste es un indicio importante para la elucidación del mecanismo de reacción.

En lo que se refiere a la reacción de la 2'-dGuo con pirrolidina, cada composición presenta un efecto diferente. Con una proporción de 30 % de etanol en el solvente, la constante de velocidad disminuye considerablemente ($\approx 50\%$) en comparación con la

7.8. ENSAYOS DE SOLVENTES ACUOSO-ETANÓLICOS EN LA REACCIÓN DE 2'-DADO83

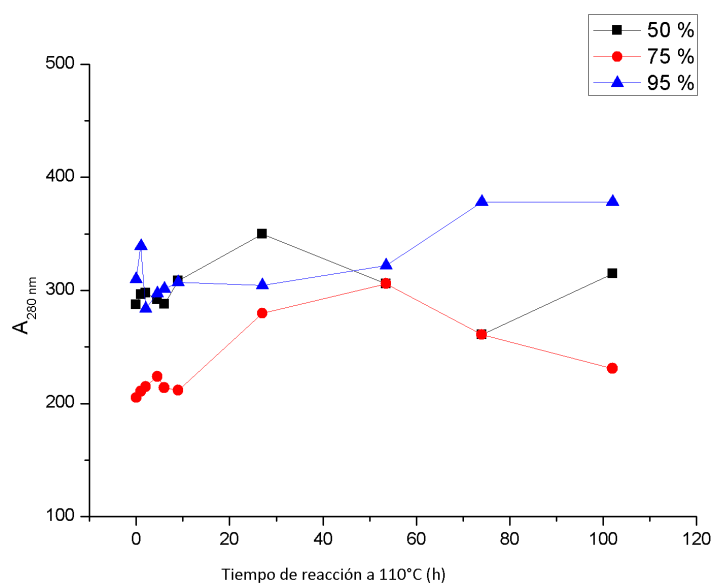


Figura 7.27: Cinética de la descomposición de la 2'-dAdo en solventes acuoso-etanólicos a 50 %, 75 % y 95 % de etanol, a 110°C

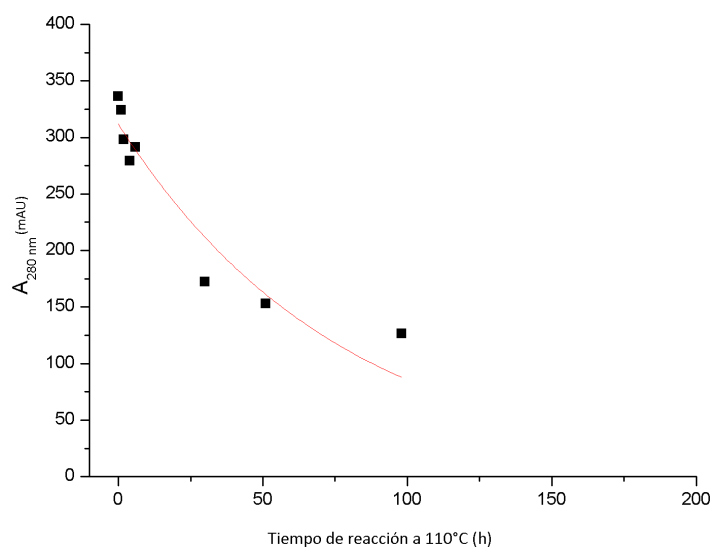


Figura 7.28: Cinética de la pirrolidinólisis de 2'-dAdo en etanol-agua (30:70, v/v), a 110°C

obtenida para el caso del solvente totalmente acuoso. Cuando la proporción de etanol aumenta a 50 %, el valor de la constante k se incrementa aproximadamente 3 veces, con respecto al valor observado para 30 % etanol (Tabla 7.7), excediendo ahora la tasa observada en solvente totalmente acuoso ($k = 0.0111 \text{ h}^{-1}$). Finalmente, a una composición de 75 % de etanol en el solvente no se aprecia degradación del nucleósido después de varias horas de tratamiento.

Tabla 7.7: Resultados cinéticos de pirrolidinólisis de 2'-dAdo y 2'-dGuo en solventes acuoso-etanólicos

	% etanol	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	R^2
2'-dAdo				
	0 %	0.1088	6.37	0.9696
	30 %	0.0129	53.72	0.8956
	50 %	No se produce degradación		
	75 %	No se produce degradación		
	95 %	No se produce degradación		
2'-dGuo				
	0 %	0.0111	63.0	0.9918
	30 %	0.0059	138.6	0.9840
	50 %	0.0175	40.76	0.9779
	75 %	No se produce degradación		

Esta dependencia complicada que se manifiesta para diversas proporciones de etanol en el solvente posiblemente refleja efectos encontrados de la disminución de la constante dieléctrica del solvente: una disminución moderada en ϵ podría reducir la estabilización del zwitterión incipiente, resultando en una reducción de la tasa de degradación (como en el caso de la 2'-dAdo), mientras que una disminución mayor de ϵ podría fuertemente reprimir la desprotonación de la 2'-dGuo, aumentando la proporción de las moléculas neutras, que son las que pueden sufrir el ataque nucleofílico de la amina.

7.9. Cinética de la pirrolidinólisis de d-TAT y d-TGT

El resultado obtenido en la pirrolidinólisis de la 2'-dThd, indicando una resistencia prácticamente total de este nucleósido, propuso la idea de utilizar cortos oligonucleótidos conteniendo una base de interés (por ejemplo, Ade o Gua) rodeada de timinas poco reactivas que harían las veces de bases generalizadas en el ADN. Así, se podría estudiar la reactividad con la amina de un residuo de adenina o de guanina en un entorno oligonucleotídico, sin interferencia por reacciones de las bases circundantes.

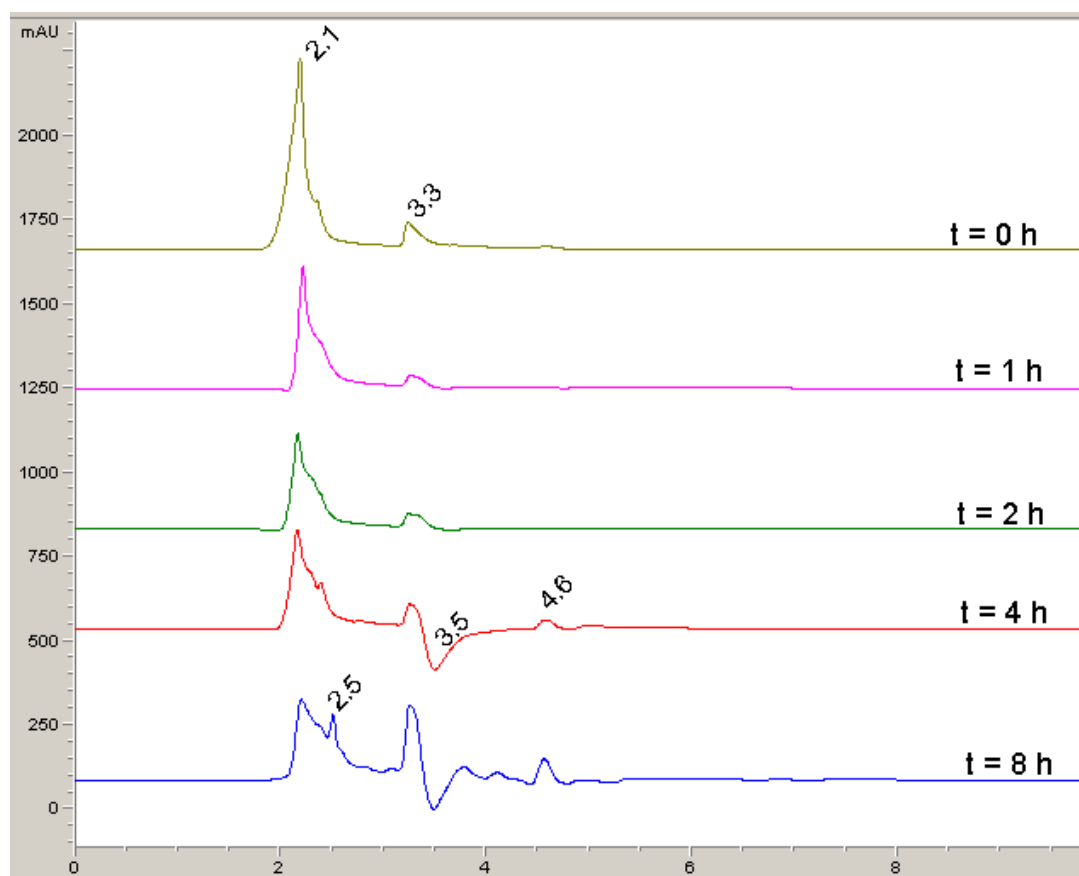


Figura 7.29: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para d-TAT tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

En el primer caso se utilizó una solución acuosa de d-TAT a 0.325 mM y pirrolidina a 500 mM, en volúmenes de reacción de 70 μL . La temperatura de reacción se mantuvo en 110°C. Los tiempos de reacción no fueron tan prolongados debido a que se esperaba una degradación más rápida del material inicial. La Figura 7.29 muestra la cinética de descomposición de d-TAT por los tiempos de reacción indicados.

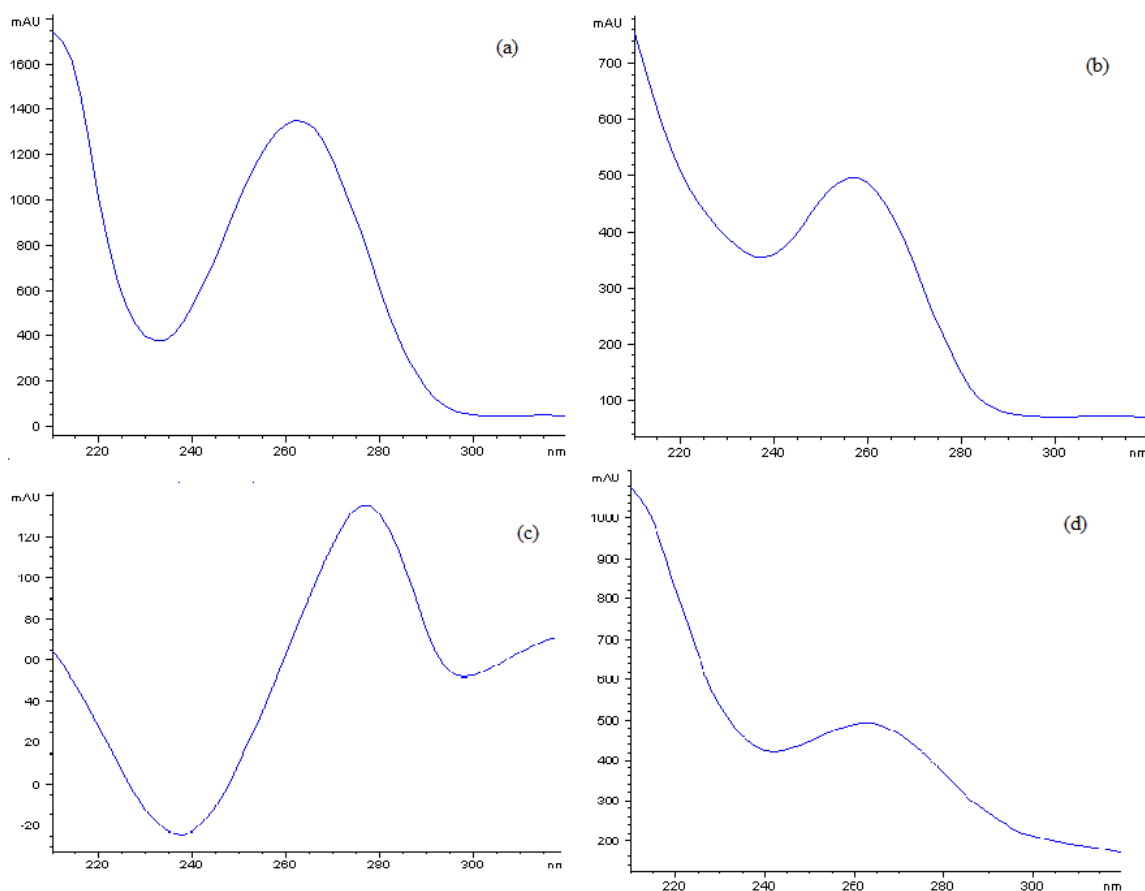


Figura 7.30: Espectros de absorción de los productos que eluyen en HPLC, tras 8 horas de pirrolidinólisis de d-TAT. (a) 2.1 min; (b) 3.3 min; (c) 4.6 min; y (d) 2.5 min

En el perfil cromatográfico correspondiente a $t = 0$ h aparece una banda con un tiempo de retención de 2.1 min atribuible al material inicial, cuyo espectro de absorción en UV (en el solvente de elución) muestra una longitud de onda máxima de absorbancia de aproximadamente 262 nm (Figura 7.30 a), razonable para d-TAT, cuya λ_{max} debe ser

intermedia entre los valores de λ_{max} de 2'-dAdo y 2'-dThd. Lo anterior indicaría que el material no está siendo retenido por la columna al coincidir con el periodo de tiempo de elución del solvente de carga, 5% agua-95%CH₃CN/MeOH (85:15, v/v). Esto es de esperar puesto que estos oligonucleótidos son compuestos altamente polares (por sus grupos fosfato) y por ende no debieran de ser retenidos en esta columna cromatográfica.

El mismo perfil muestra una pequeña banda que eluye aproximadamente a 3.3 min cuyos datos espectrales, $\lambda_{max} \approx 257$ nm y $\lambda_{min} \approx 236$ nm, sugieren que pudiera tratarse de la base adenina, posible contaminante del oligonucleótido inicial. En la Figura 7.29 se aprecia un moderado incremento de la altura de este pico en función del tiempo. Después de 8 horas de reacción, el oligómero se ha degradado significativamente. Así mismo, la aparición de una banda negativa a un tiempo de retención de 3.5 min sugiere la presencia de un producto de la reacción que absorbe en medida significativa a 320 nm. El producto que eluye a 4.5 min coincide con el observado en la degradación de los desoxinucleósidos, tanto en tiempo de retención como en la longitud de onda de absorbancia máxima, 277 nm. El espectro de absorción para la banda con tiempo de retención de 2.5 min, con $\lambda_{max} \approx 263$ nm y $\lambda_{min} \approx 242$ nm, sugiere que pudiera tratarse de los compuestos d-Tp y d-pT resultantes del cercenamiento del oligómero tras la liberación de la adenina y el rompimiento de los enlaces fosfodiéster que unen el residuo de desoxirribosa en esa posición con los grupos fosfato en las terminales 5' y 3'.

El cálculo de la constante de velocidad de primer orden de la degradación del oligonucleótido d-TAT se efectuó de la misma forma que en los anteriores casos. La gráfica resultante se muestra en la Figura 7.31.

El ajuste de la curva da como resultado un valor de $k = 0.3042 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0.9474$), por lo tanto, la vida media de este oligonucleótido es de 2.28 h. Estos parámetros cinéticos indican que la descomposición de los residuos de adenina en el trímero se lleva a cabo cerca de 3 veces más rápido que en el caso del mismo grupo en el desoxinucleósido. La vida media que se esperaba para este oligonucleótido era de alrededor de 6 horas, es decir cercana a la calculada para la 2'-dAdo; incluso, se consideraba probable un valor

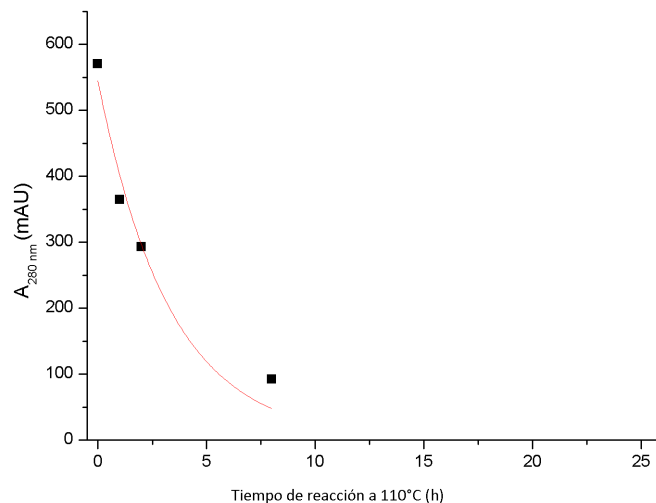


Figura 7.31: Cinética de la pirrolidinólisis de d-TAT, en solución acuosa, a 110°C

mayor debido a una menor disponibilidad del grupo adenina por razones de impedimento estérico en el trinucleótido.

Para la degradación del oligonucleótido d-TGT, las condiciones de reacción fueron las mismas que las utilizadas en d-TAT. La gráfica de la pirrolidinólisis por varios tiempos de reacción de d-TGT se muestra en la Figura 7.32. De acuerdo al perfil cromatográfico que se obtiene a partir de la solución a tiempo cero, el material que eluye a 2.1 min corresponde al oligonucleótido d-TGT. La degradación de d-TGT es evidente a simple vista; después de 4 h de reacción la cantidad que permanece del material inicial es ínfima. Al igual que en el experimento con la 2'-dAdo, se puede ver una pequeña banda con un tiempo de retención de 3.2 min. También, la banda con absorbancia negativa que eluye a 3.5 min aparece en ambos casos, posiblemente se trate de algún producto común.

El cálculo de los parámetros cinéticos correspondientes a la degradación de d-TGT se realizó de la misma forma que en el caso anterior. El valor de la constante de velocidad de pseudoprimer orden resultante del ajuste de la curva fue de 0.618 h^{-1} ($R^2 = 0.9923$), con un correspondiente tiempo medio de 1.12 h (Figura 7.33).

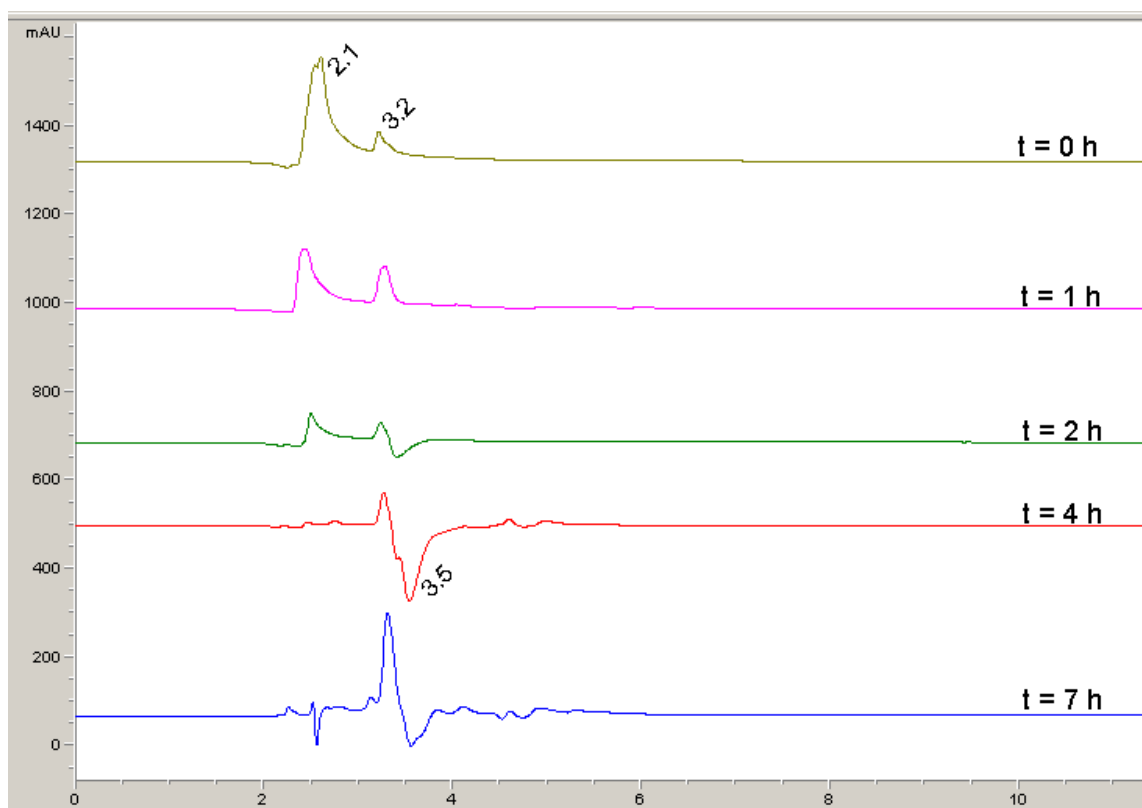


Figura 7.32: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, para d-TGT tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

De acuerdo a los datos obtenidos, los residuos de guanina en d-TGT reaccionan cerca de 50 veces más rápido que en el caso del mismo residuo perteneciente al 2'-desoxinucleósido correspondiente ($k = 0.0112 \text{ h}^{-1}$). Esta diferencia tan significativa en las reactividades de los grupos guanina se debe al efecto de campo eléctrico de los grupos fosfato, presentes en el trinucleótido y ausentes en el caso del simple nucleósido.

Para una solución acuosa de pirrolidina a 0.5 M, utilizada en trabajos anteriores, se calculó un pH de 12.48 [Arredondo Vázquez, 2008], a 25°C. En estas condiciones de alta basicidad, casi la totalidad de los residuos guanina en la 2'-dGuo se encuentran desprotonizados, debido a que su pK_a es de 9.52 [Clauwaert y Stockx, 1968], pero estos mismos grupos tienen un pK_a diferente cuando están presentes en un entorno oligonu-

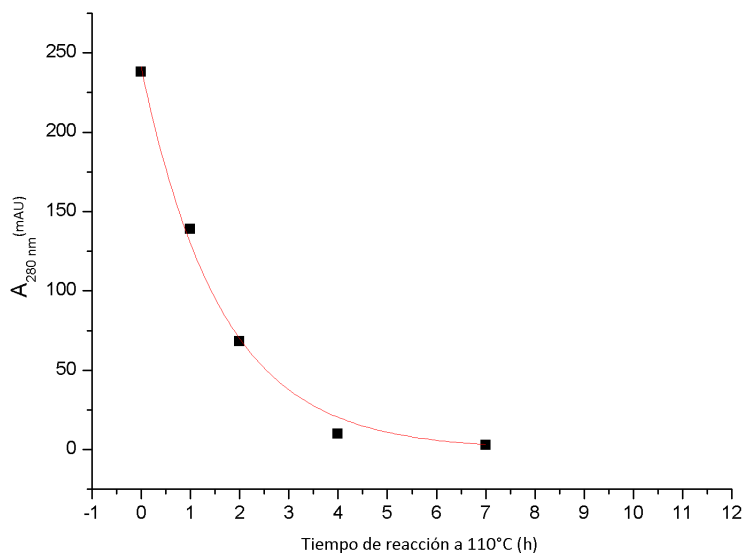


Figura 7.33: Cinética de la pirrolidinólisis de d-TGT, en solución acuosa, a 110°C

cleotídico; este pK_a fue experimentalmente determinado en 10.84 para el oligonucleótido d-AAAGAAA, a 25°C y baja fuerza iónica [Martínez Reyes, 2007]. Este recorrimiento de la constante de ionización a valores más altos permite que una mayor fracción de grupos guanina se encuentren sin desprotonizar, facilitando la susceptibilidad de estos al ataque nucleofílico promovido por la pirrolidina, y por lo tanto aumentando su reactividad.

Los datos numéricos presentados en el párrafo precedente se refieren a 25°C, pero las relaciones entre estos serán semejantes a la temperatura de interés en el presente trabajo (110°C), dado que todas las especies involucradas (ión de pirrolidinio, guanina) son formalmente ácidos del tipo N-H, con coeficientes de temperatura comparables para su constante de disociación.

7.10. Pirrolidinólisis de bases libres y 2-desoxirribosa

En el análisis cinético de la degradación de la 2'-dAdo se planteó la posibilidad de que uno de los productos principales de la reacción con pirrolidina sea la base libre adenina, que se formaría tras el rompimiento del enlace N-glicosídico. Es probable que esto mismo suceda para la 2'-dGuo, sin embargo, en el análisis cinético no se pudo determinar una banda atribuible a la base guanina. Esto probablemente se debe a la baja solubilidad de la base libre, guanina, en agua. De la misma forma, en las reacciones de los desoxinucleósidos de las pirimidinas, en particular la 2'-dCyd, existe la posibilidad de que la ruptura de este mismo enlace se produzca en la reacción. Si de hecho esto sucede, tanto la base libre correspondiente (observable en el intervalo de UV definido) como el azúcar 2-desoxirribosa serían los productos primarios en las reacciones.

El propósito del análisis cinético de la pirrolidinólisis de las bases libres o de la simple 2-desoxirribosa es, primero, determinar los tiempos de retención de los estándares para posteriormente realizar una comparación con los obtenidos en los cromatogramas resultantes de la degradación de los 2'-desoxinucleósidos. La coincidencia en estos tiempos sería una primera evidencia de la identidad de dicho compuesto; segundo, la formación de productos de esta reacción indicaría si algún producto resultante de la degradación de los desoxinucleósidos tiene como precursor a las moléculas modelo propuestas.

La degradación de la base adenina se llevó a cabo en condiciones similares a las usadas para los desoxinucleósidos: solución acuosa de adenina a 5 mM, pirrolidina a 500 mM, a 110°C, por diferentes tiempos de reacción. La Figura 7.34 muestra los perfiles cromatográficos del aminolisato resultante. En el cromatograma correspondiente a $t = 0$ h aparece una banda que eluye a 3.8 min, correspondiente al material inicial. Este tiempo coincide con el observado para el primer producto que se forma en la pirrolidinólisis de la 2'-dAdo, en las mismas condiciones (Figura 7.8). La comparación anterior y la similitud de los datos espectrales en UV de ambas bandas proponen que se trata del mismo compuesto. Después de 5 horas de reacción se observan los primeros productos en pequeña medida, indicando la estabilidad del compuesto en estas condiciones fuertemente básicas. La Figura 7.35, muestra el comportamiento cinético de la Ade, verificando su estabilidad

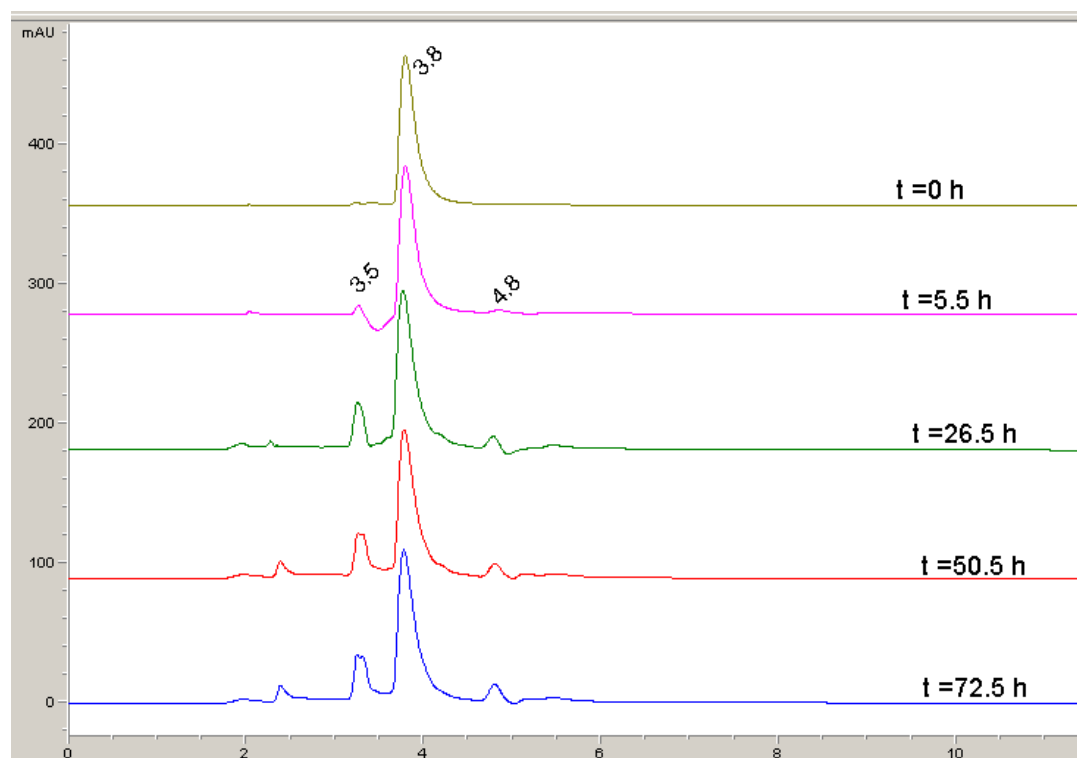


Figura 7.34: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de adenina tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

durante todos los tiempos de reacción ensayados. Esto coincide con los comentarios hechos para la degradación de la adenina en soluciones alcalinas a temperaturas elevadas [Jones y col., 1966]. El primero de estos productos, con un tiempo de retención de 3.5 min, tiene un espectro de absorbancia donde se pueden estimar gruesamente $\lambda_{max} \approx 242$ nm y $\lambda_{max} \approx 290$ nm (Figura 7.36).

Además, la presencia de una pequeña banda a 4.8 min indica otro de los productos; este compuesto tiene $\lambda_{max} \approx 277$ nm que sugiere que pueda tratarse de 4, 5, 6-triaminopirimidina, de acuerdo a los datos reportados por Mason y col. [1954] para este material en solución acuosa a pH 7.98. Estos resultados coinciden con los datos reportados para el tratamiento de adenina en soluciones alcalinas a altas temperaturas, donde se indica la formación de una pequeña cantidad de este mismo compuesto [Jones y col., 1966]. De hecho, es probable que este compuesto sea el que aparece en el mismo

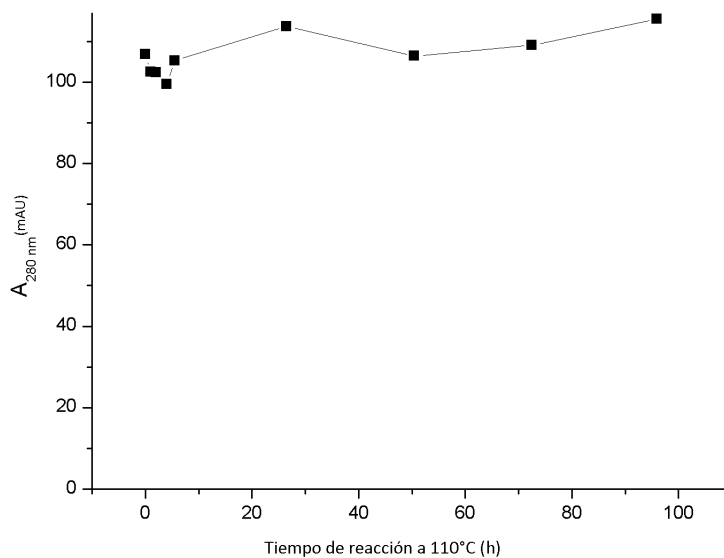


Figura 7.35: Cinética de la adenina en pirrolidinólisis a 110°C

tiempo de retención en el cromatograma resultante de la degradación de la 2'-dAdo, indicando que es un producto secundario que se forma mediante la reacción de la adenina, producto primario, con la pirrolidina en solución. Una vez más, se forma una banda con tiempo de elución en 5.5 min que absorbe a 237 nm, la cual ya había sido observada en todos y cada uno de los ensayos anteriores.

En el caso de la experimentación con la base libre guanina, debido a la escasa solubilidad de esta base en agua, la mezcla se preparó de la siguiente manera: se mezclaron 3.7 mg de guanina con 2.23 mL de agua y se agitó en el vortex; inmediatamente después, se pipetearon 1.5 mL de la suspensión hacia 1.5 mL de solución acuosa de pirrolidina a 1 M, obteniéndose una solución homogénea de guanina a 5 mM en pirrolidina acuosa a 500 mM. Los pasos restantes se realizaron de la misma forma que con los desoxinucleósidos. Los resultados se muestran en la Figura 7.37.

El hecho de que el cromatograma para $t = 0$ h muestre escasa señal propone que la guanina que estaría presente en la mezcla de reacción se pierde parcialmente o

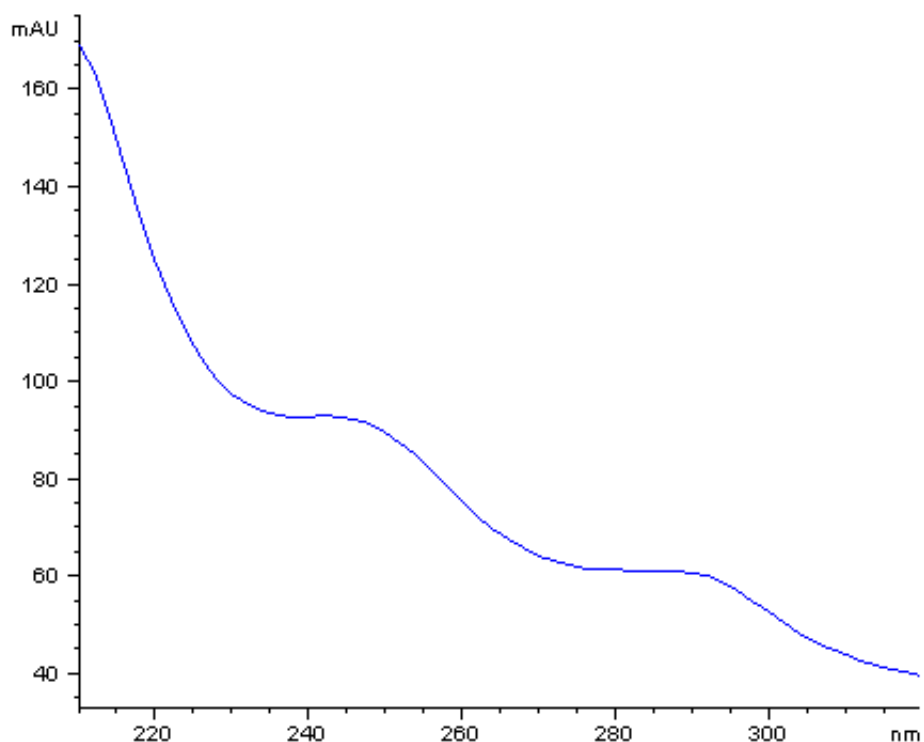


Figura 7.36: Espectro de absorción del producto que eluye a 3.5 min, tras 72.5 h de pirrolidinólisis de adenina

totalmente por adhesión al recipiente durante la manipulación que sigue a la reacción de aminólisis, cuando por evaporación de la amina se llegue a un estado de solvente acuoso aproximadamente neutral, condición en la que la guanina es prácticamente insoluble en agua.

En un tiempo de reacción de 0 h aparece una pequeña banda que eluye a 3.6 min, atribuible a la pequeña cantidad de guanina que se haya podido solubilizar (Figura 7.38 a). Sin embargo, se presenta un efecto extraño en el comportamiento de esta banda: con el avance de la reacción, aumenta la altura del pico que posiblemente sea algún compuesto que eluya a ese mismo tiempo. De hecho, el espectro de absorción de esta banda en tiempos tardíos de reacción, es completamente distinto al correspondiente en los tiempos cortos (no mostrado).

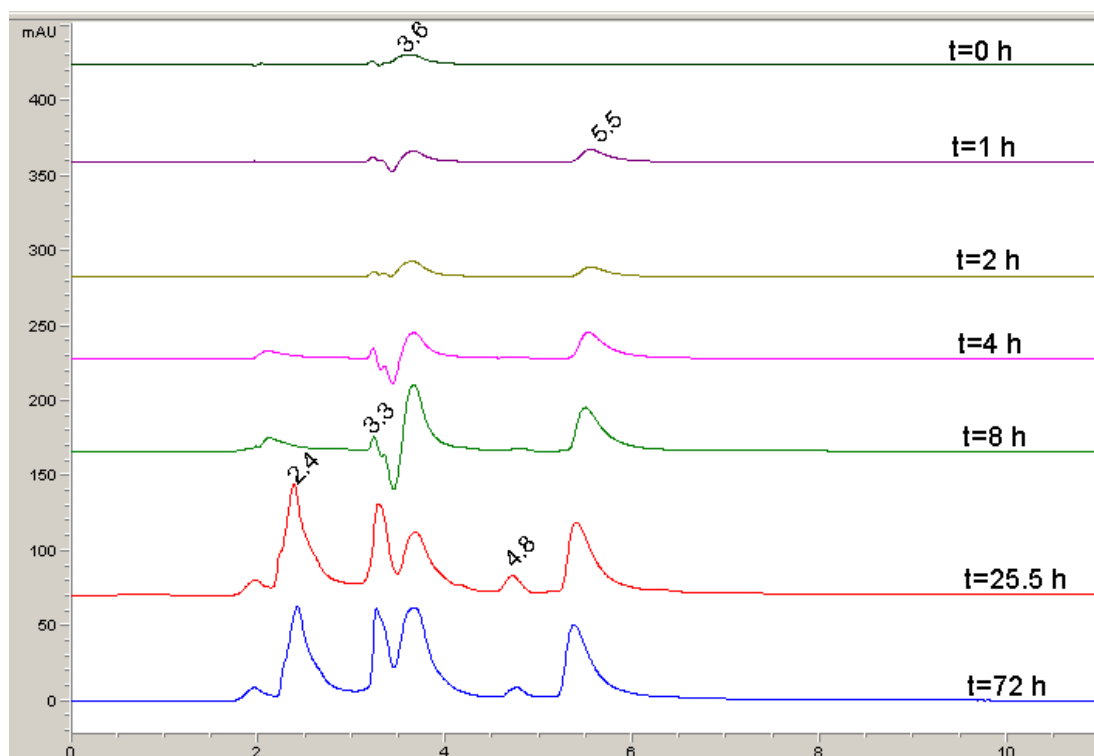


Figura 7.37: Perfiles cromatográficos, a 260 nm, de guanina tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

El espectro de absorción de la banda que eluye a 2.4 min es muy similar al de la guanina inicial (Figura 7.38 c) el cual pudiera representar el producto 2, 6-diamino-4-oxo-5-formamidopirimidina, que se forma tras la apertura del anillo imidazólico producido por el ataque de la pirrolidina. Los compuestos que eluyen a 3.3 min y 4.8 min son comunes en la degradación de ambas purinas. En el primer caso, los datos espectrales son $\lambda_{max} \approx 238$ nm y 285 nm, con los cuales no se puede estimar una identidad preliminar (Figura 7.38 b); en el otro caso, se observa una $\lambda_{max} \approx 277$ nm, es probable que se trate de algún derivado pirimídico. La banda que eluye a 5.5 min con $\lambda_{max} \approx 237$ nm, ya había sido observada en los demás experimentos de pirrolidinólisis.

Para la degradación de la base citosina se emplearon las mismas condiciones anteriores de reacción. La Figura 7.39 muestra la cinética de la degradación desde 0 h hasta 72 h de reacción. A un tiempo de retención de 4.3 min se puede apreciar la banda del

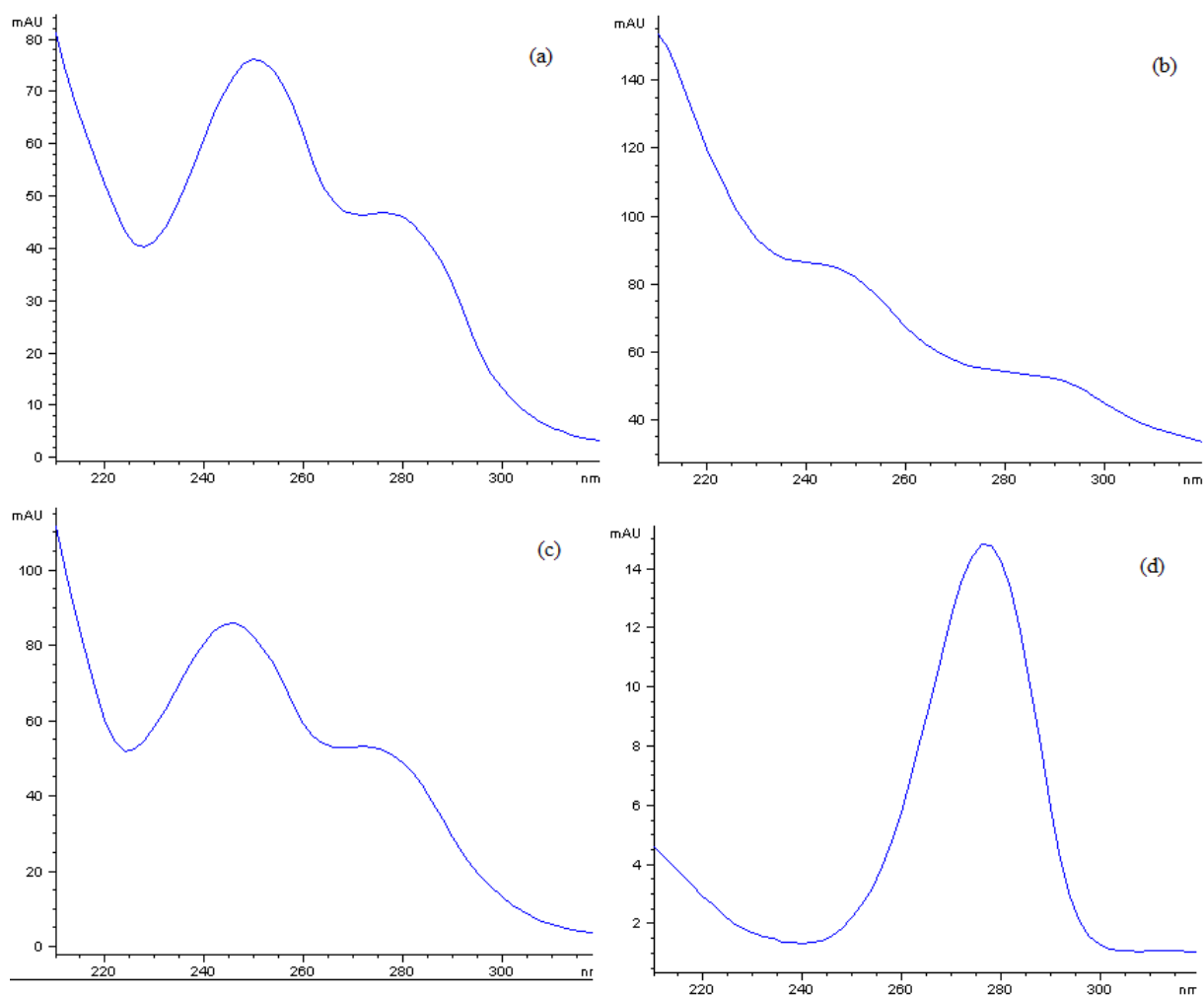


Figura 7.38: Espectros de absorción de los productos que eluyen en HPLC, tras 72 h de pirrolidinólisis de guanina. (a) 2.4 min, (b) 3.3 min, (c) 3.6 min, y (d) 4.8 min

material inicial, Cyt, con una $\lambda_{max} \approx 268$ nm. Además, se aprecia una serie de pequeñas bandas a 3.6 min, 4.0 min y 4.7 min; este último compuesto también se presentó en la degradación de las otras bases ensayadas, con una $\lambda_{max} \approx 277$ nm.

Continuando con la degradación aminolítica de moléculas modelo, se realizó la degradación con pirrolidina de la 2-desoxirribosa en condiciones similares, es decir, 2-desoxirribosa a 5 mM, amina a 500 mM, 110°C. La Figura 7.40 muestra los trazos cromatográficos, para A_{280} , de la mezcla de reacción tras diferentes tiempos de pirroli-

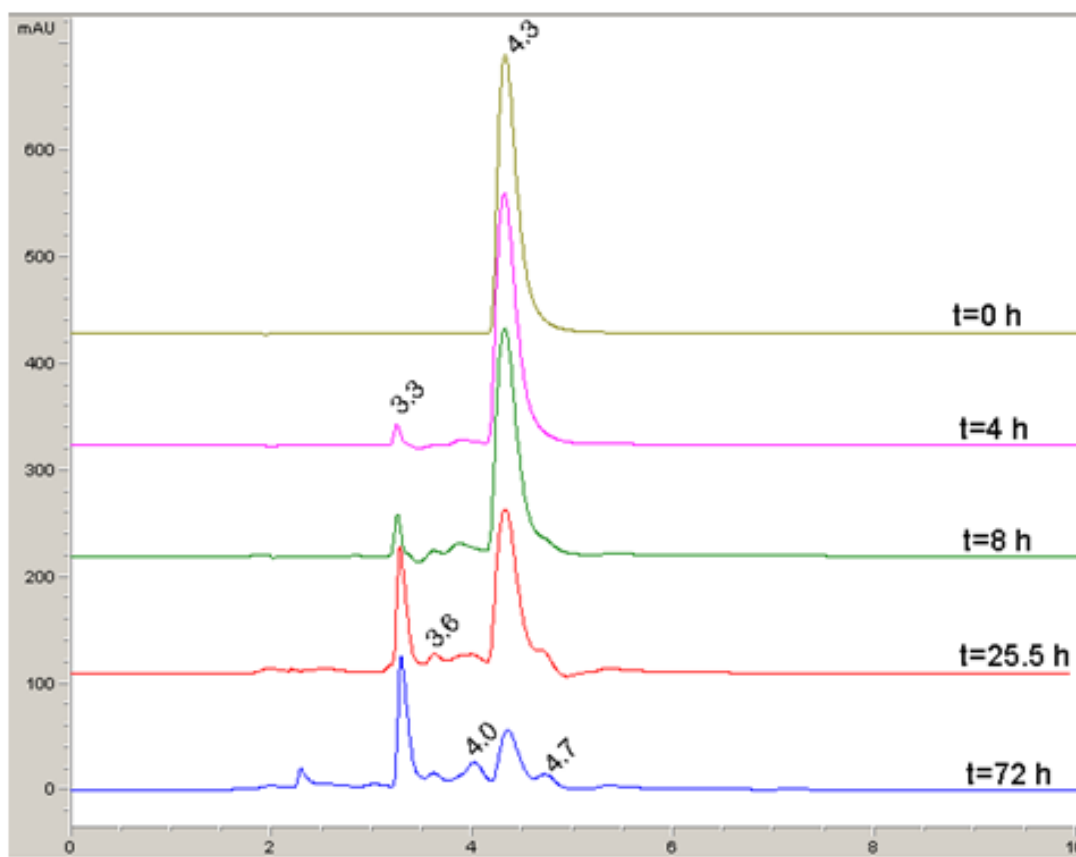


Figura 7.39: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de citosina tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

dinólisis a una concentración de muestra de 5 mM de 2-desoxirribosa inicial, es decir, en condiciones estequiométricamente comparables con las reacciones que se habían realizado con los nucleósidos. En la señal que corresponde a tiempo cero no se encuentra ninguna banda importante, inclusive para el azúcar inicial. Esto era de esperarse debido a que las sustancias iniciales de la mezcla prácticamente no absorben a 280 nm. La formación de productos de la reacción es evidente después de varias horas de reacción. Los datos espectrales de estos compuestos son para el material con tiempo de retención de 3.8 min: $\lambda_{max} \approx 235$ nm, 282 nm y $\lambda_{min} \approx 253$ nm; 4.8 min: $\lambda_{max} \approx 277$ nm; 3.2 min: este presenta hombros centrados aproximadamente a 247 nm y a 285 nm (Figura 7.41). Por su tiempo de retención, este último material podría interferir en la interpretación de los trazos cromatográficos para la degradación aminolítica de los nucleósidos, ante todo en

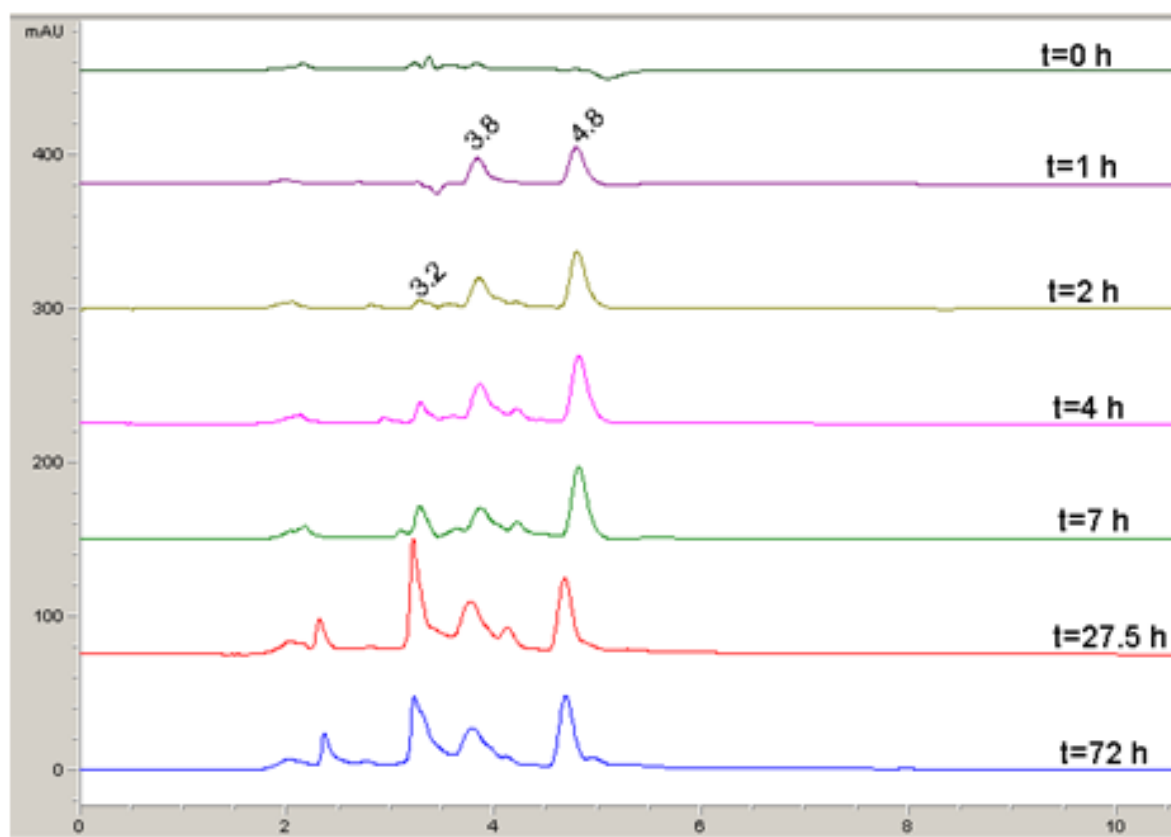


Figura 7.40: Perfiles cromatográficos, a 280 nm, de 2-desoxirribosa tras pirrolidinólisis por diferentes tiempos de reacción

sus etapas tardías. Este mismo problema también se da en el caso del producto resultante de la degradación de la 2-desoxirribosa que eluye a 3.8 min. Por ejemplo, la señal de este compuesto podría estar superpuesta con la banda observada para la supuesta adenina, producto de la degradación de 2'-dAdo, que eluye al mismo tiempo (Figura 7.8). En cambio, para los cromatogramas resultantes de 2'-dGuo y 2'-dCyd se puede observar la banda de este compuesto limpia y separada a un tiempo de elución de 3.97 min, para ambos casos (Figuras 7.12 y 7.16). Cabe considerar que los materiales con tiempos de retención de 3.2 min y 3.8 min en este experimento tienen valores de A_{280} módicos, y que en este experimento se comenzó con una concentración inicial de desoxirribosa de 5 mM, concentración que en las pirrolidinólisis de los nucleósidos en todo caso se daría

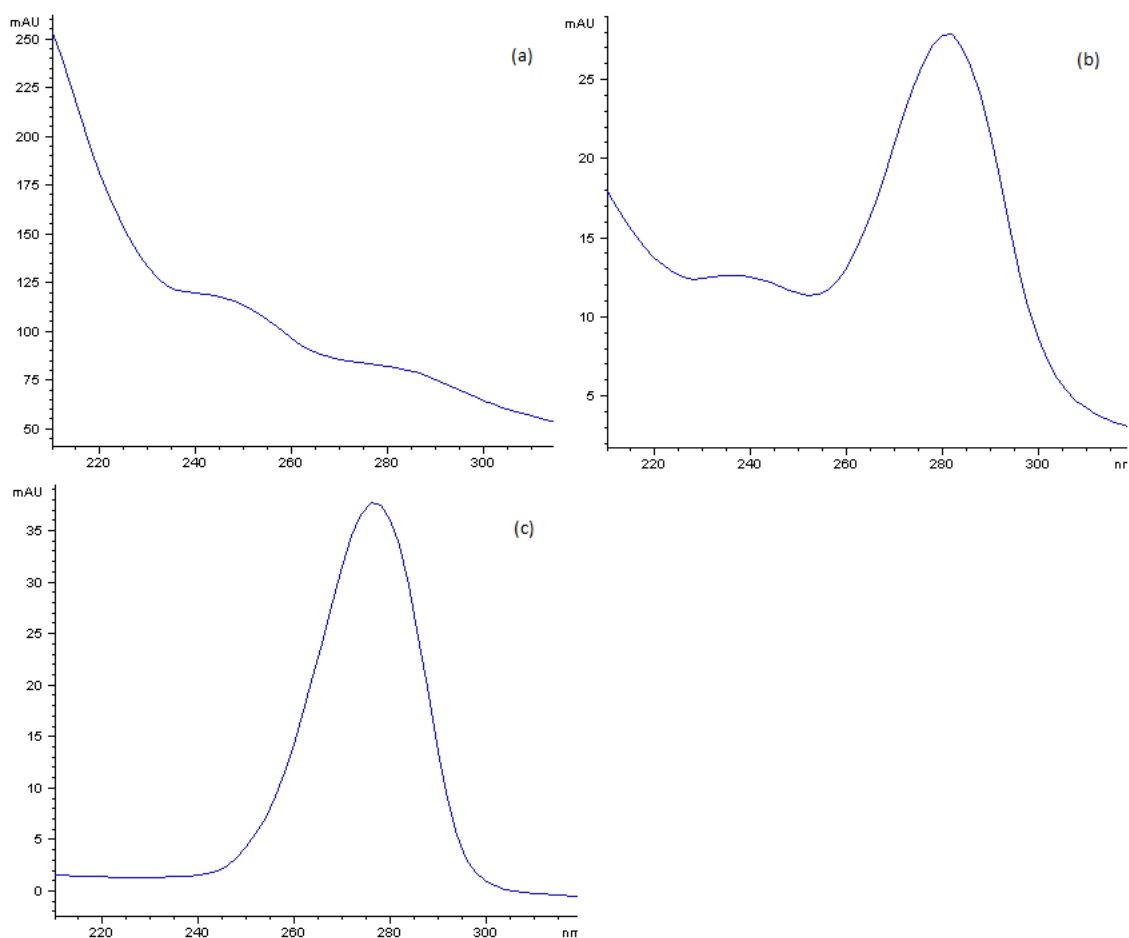


Figura 7.41: Espectros de absorción de los productos que eluyen tras 72 h de pirrolidinólisis de 2-desoxirribosa. (a) 3.2 min; (b) 3.8 min; (c) 4.8 min

sólo en las etapas tardías de la reacción, por lo que la interferencia de estos productos en la interpretación de las etapas tempranas de los ensayos con nucleósidos sería mínima. Finalmente, la banda que se aprecia a 4.8 min en la Figura 7.40 con una λ_{max} de 277 nm, se puede observar en todos los ensayos realizados para desoxinucleósidos. Es de interés notar la semejanza entre los trazos cromatográficos para $t = 27.5$ h y $t = 72$ h, indicando que en este ensayo la mezcla de reacción ya adquirió una composición relativamente estable a las 27.5 h.

Como fue mencionado anteriormente, en todos los casos de pirrolidinólisis de nucleósidos, bases y oligonucleótidos ensayados, se forma una banda con tiempo de elución mayor a 5 min, con $\lambda_{max} \approx 237$ nm. Tal material no aparece en este experimento (Figura 7.40) por lo que se deduce que no resulta de la pirrolidinólisis de la 2-desoxirribosa. Este experimento también excluye que tal material se forme por una reacción de la pirrolidina misma a alta temperatura, pues este proceso también debiera de haberse manifestado por una banda con $t > 5$ min en los perfiles cromatográficos de la Figura 7.40.

7.11. Identificación de productos de la reacción

Los perfiles cromatográficos de los aminolisatos obtenidos con los diferentes nucleósidos, evidencian la formación de una serie de distintos compuestos. La identificación de estos productos es de interés, puesto que podría ayudar a delinear los mecanismos de reacción específicos, que corresponden a la labilización inicial de las bases en el proceso de secuenciación del ADN por cercenamiento aminolítico. El orden en que aparecen estos productos en el transcurso de la aminólisis, es decir si se trata de productos primarios o secundarios, también puede ser informativo en cuanto al mecanismo de los procesos.

7.11.1. Identificación de los productos de la reacción de la 2'-dAdo con pirrolidina

En el perfil cromatográfico resultante de la aminólisis de la 2'-dAdo después de 53 h de tratamiento, se puede observar la presencia de tres productos principales, a saber: el primero de ellos eluye a 3.8 min, con $\lambda_{max} \approx 259$ nm y $\lambda_{min} \approx 226$ nm; el segundo a 4.7 min, con $\lambda_{max} \approx 277$ nm y $\lambda_{min} \approx 230$ nm; y el último compuesto a 5.2 min, con $\lambda_{max} \approx 237$ nm (Figura 7.42).

La Figura 7.8 muestra, para el trazo que corresponde a 4 h de reacción, el primer producto de la reacción. Con base en los datos obtenidos a partir del espectro de absorción y como se mencionó anteriormente, se ha sugerido que pueda tratarse de la base adenina. Partiendo de esta hipótesis, se preparó una mezcla (1:1, v/v) entre el aminolisato de la pirrolidinólisis de la 2'-dAdo tras 48 h y el estándar de la base adenina. En caso de que el

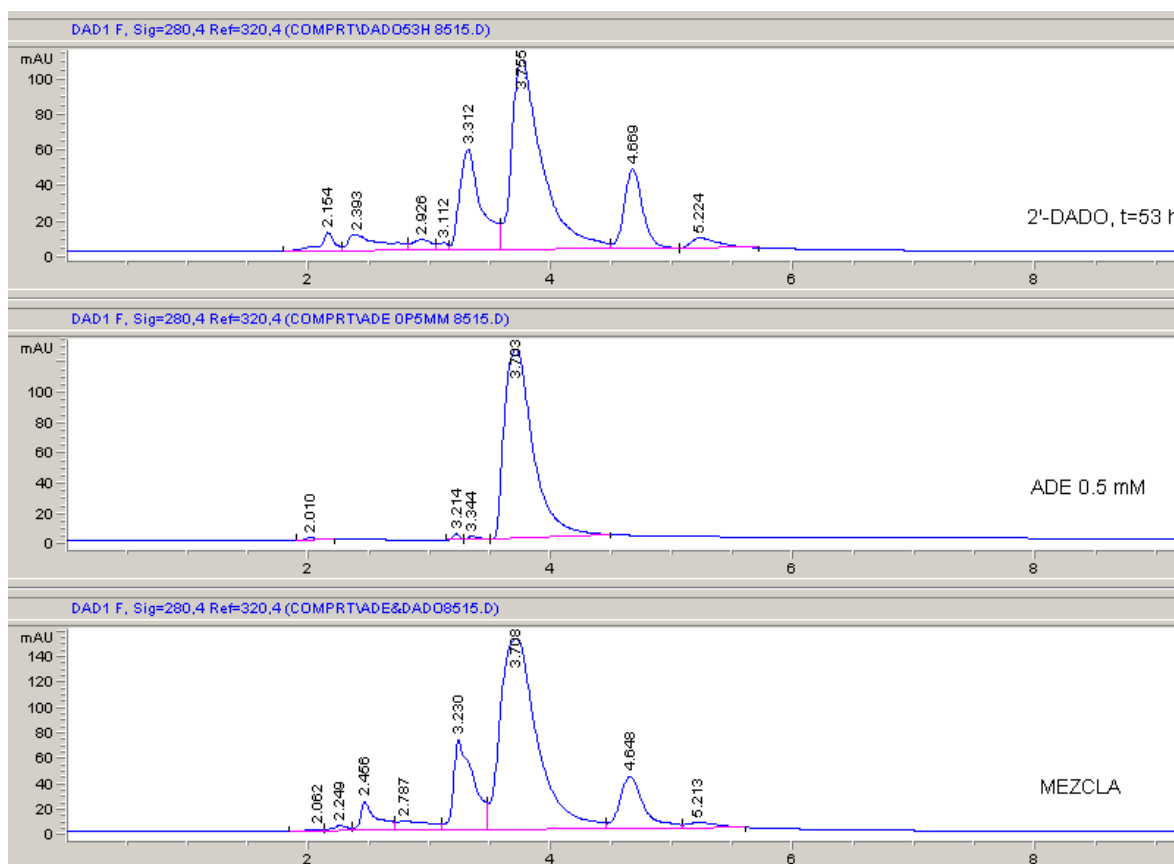


Figura 7.42: Comparación de tiempos de retención en la columna de la supuesta adenina con su estándar

producto bajo análisis y la adenina sean el mismo compuesto, ambos eluirán a un mismo tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 7.42.

En el perfil cromatográfico de la mezcla no se aprecia la aparición de ninguna nueva banda, y la banda interpretada como adenina no se ensancha, lo que indica que la banda a 3.7 min y la adenina comigran exactamente. El área de la banda con un tiempo de retención de 3.7 min en la mezcla mide 3167 mAU/min, lo que es similar a la suma de las bandas, 3721.4 mAU/min, que forman la adenina pura, 2013.8 mAU/min, y la banda de la supuesta adenina en el aminolisato, 1707.6 mAU/min. Entonces, se puede concluir que el producto es adenina, tomando como base la comparación por tiempos de retención.

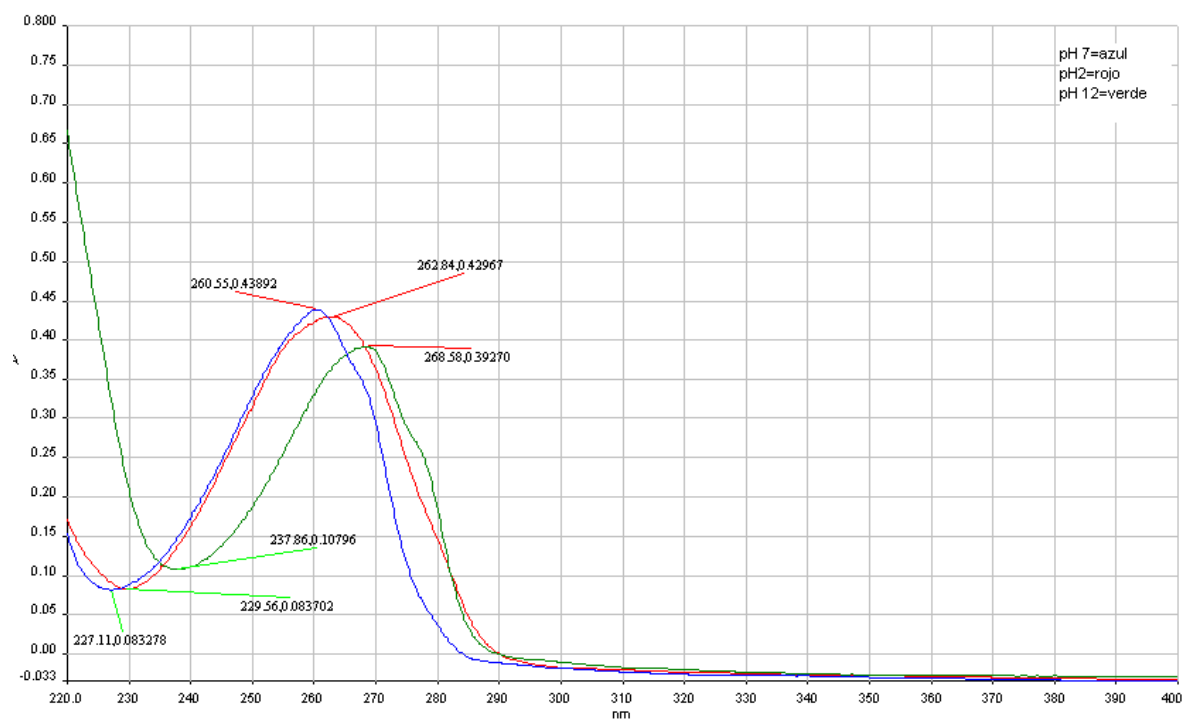


Figura 7.43: Espectros de absorción de la supuesta adenina en solución acuosa, a distintos valores de pH

Con el fin de contar con datos más contundentes acerca de la identidad de este producto, se llevó a cabo su análisis espectrofotométrico. Partiendo del aminolisato de 2'-dAdo por 48 h, el material que eluye entre 3.59 min y 4.1 min fue recolectado manualmente del HPLC, tras su paso por el detector de UV, realizándose esta operación varias veces hasta obtener una cantidad adecuada de material. Estas fracciones fueron combinadas y se dejaron secar a temperatura ambiente hasta que el solvente se evaporara por completo. El residuo resultante se disolvió en 780 μL de agua tridestilada y se colocó en una cubeta de cuarzo de 1.4 mL, de 1 cm de paso, para su análisis en el espectrofotómetro. Después, la solución se llevó a un $\text{pH} \approx 2$, añadiendo 8 μL de HCl 1 M, y se analizó bajo las mismas condiciones. Finalmente, se llevó la solución a pH 12 mediante la adición de 16 μL de NaOH 1 M, y se registró nuevamente el espectro de absorción (Figura 7.43).

Los datos espectrales obtenidos de esta manera se comparan en la Tabla 7.8 con los correspondientes datos obtenidos con una solución acuosa de adenina pura analizada de la misma manera, así como con los datos reportados en la literatura. La correspondencia entre estos valores confirma que el producto en cuestión es la base adenina. Por simple deducción, el otro producto primario es la 2-desoxirribosa, la cual no puede apreciarse en el intervalo de 220-320 nm porque carece de cromóforos que absorban fuertemente en esas longitudes de onda.

Tabla 7.8: Comparación de los datos espectrales de la supuesta adenina con datos reportados en la literatura

ANALITO	pH	λ_{max} (nm)	λ_{min} (nm)	A_{max}/A_{min}
Adenina	1-3	262.5	229	
	6-8	260.5	226	
Beaven y col., 1954	0.01 N-NaOH	269	237	
Adenina (estándar)	≈ 2	262.6	229.2	5.031
	≈ 7	260.6	226	5.131
	≈ 12	268.6	237.5	3.337
Adenina obtenida por pirrolidinólisis de 2'-dAdo	≈ 2	262.8	229.6	5.160
	≈ 7	260.6	227.1	5.271
	≈ 12	268.6	237.9	3.63

El principal mecanismo de reacción que se propone para la degradación de la 2'-dAdo en solución acuosa de pirrolidina 500 mM, de acuerdo a los resultados obtenidos se presenta en la Figura 7.44. La reacción inicia con el ataque nucleofílico inicial de la pirrolidina en la posición C-8 del grupo adenina, formándose un zwitterión, con carga positiva en el nitrógeno de la pirrolidina, y carga negativa en el N-7 del grupo adenina. En la figura este zwitterión se muestra entre corchetes por su naturaleza metaestable. Esta etapa es un paso importante en la reacción, como lo sugieren los resultados de la degradación de la 2'-dAdo en solventes acuoso-etanólicos. Protonación y desprotonación en las posiciones carga del zwitterión lleva a una forma electroneutral que entonces sufre

apertura del anillo imidazólico con formación de un ion enoamínico. La hidrólisis de este intermediario produce el nucleósido de la 4, 6-diamino-5-formamidopirimidina. Éste, a su vez, sufre ruptura del enlace glicosídico, probablemente con formación intermedia de la base de Schiff y luego la carbinolamina en la posición C-1 [Zoltewicz y col, 1970], produciéndose la base libre, 4, 6-diamino-5-formamidopirimidina. Ésta se puede reciclar en una reacción rápida, produciendo adenina [Garrett y Mehta, 1972]; otra posibilidad es la hidrólisis de la carboxamida, produciéndose 4, 5, 6-triaminopirimidina.

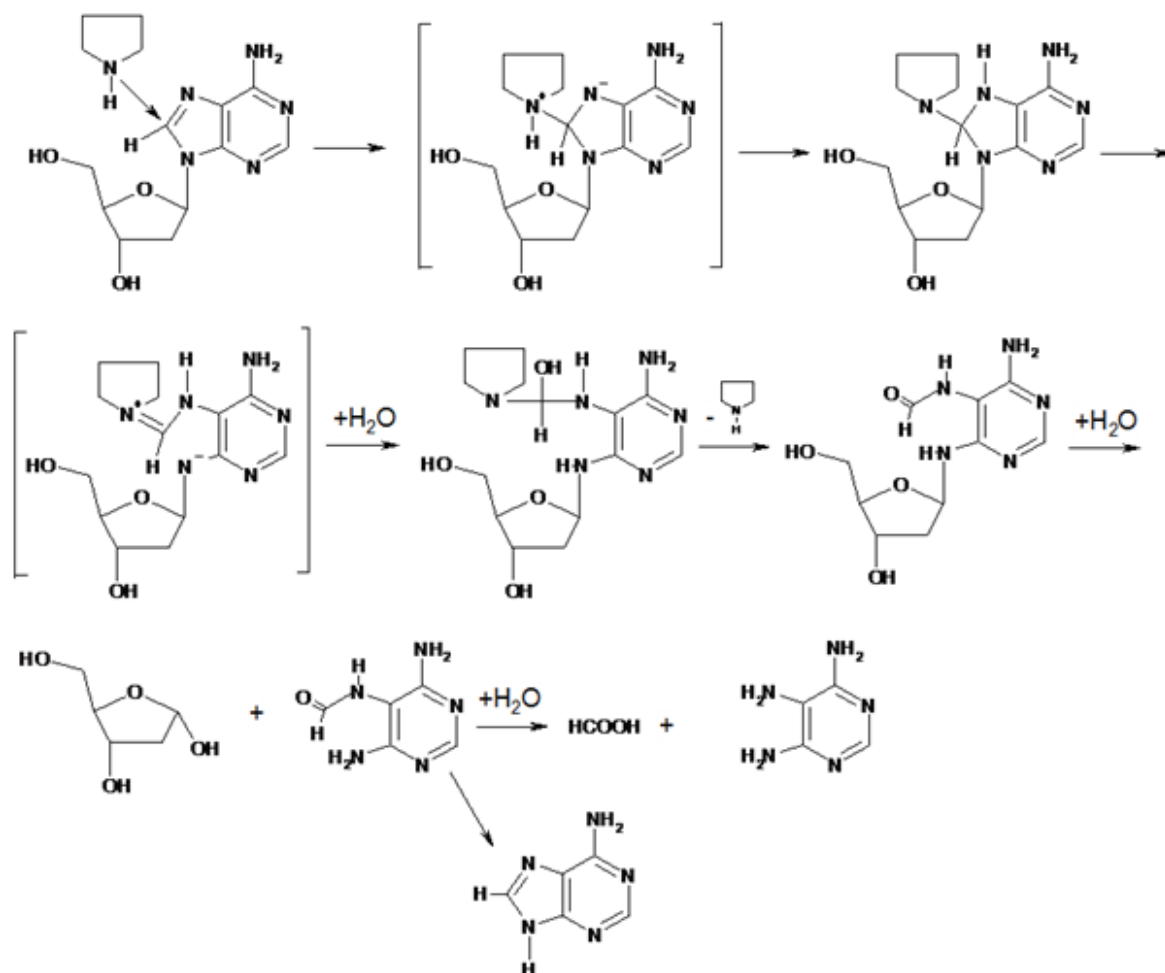


Figura 7.44: Mecanismo de reacción de la pirrolidinólisis de 2'-dAdo a 110°C

Para el caso de la degradación de la 2'-dGuo no se logró el aislamiento de los productos de la reacción con pirrolidina para su análisis espectrofotométrico, tal y como se realizó con la 2'-dAdo. Adicionalmente, los trazos cromatográficos observados para los aminolisatos no muestran los suficientes datos que permitan la identificación de los productos de la reacción y, por ende, no se puede elucidar un mecanismo de reacción con un grado de exactitud aceptable.

7.11.2. Identificación de los productos de la reacción de la 2'-dCyd con pirrolidina

En el análisis cinético de la degradación de la 2'-dCyd con pirrolidina se mencionó que el producto principal de la reacción pudiera ser la base uracilo o el nucleósido 2'-dUrd, por la similitud de sus valores de λ_{max} . Para poder identificar dicho material se llevó a cabo su aislamiento a partir del aminolisato tras 96 h de reacción, y se analizó en el espectrofotómetro en ambiente acuoso de la misma forma que en el caso de la supuesta adenina. Los resultados se muestran en la Figura 7.45.

Los datos espectrales obtenidos a partir del análisis espectrofotométrico del material en cuestión coinciden con los reportados en la literatura para el uracilo [Shugar y Fox, 1952], de manera numérica en la Tabla 7.9, y gráfica en la Figura 7.46. En este caso, en el ensayo del espectro en el ambiente básico sólo se llegó a un pH de aproximadamente 10, por lo que la comparación de los espectros se hace para estos valores de pH. Se nota que la curva de absorbancia para el caso básico del supuesto uracilo en la Figura 7.46 se asemeja a la curva publicada por Shugar y Fox [1952] para uracilo a pH 10. En particular vale comentar que el comportamiento del espectro documentado aquí para este material difiere sustancialmente del reportado para el nucleósido, 2'-dUrd [Fox y Shugar, 1952; Reichard, 1955], donde al pasar del medio acuoso neutral al básico, se reduce la absorbancia a λ_{max} por 25 % [Shugar y Fox, 1952] o 27 % [Reichard, 1955], sin corrimiento de λ_{max} . Numericamente, los resultados de estas mediciones espectrofotométricas están resumidas en la Tabla 7.9.

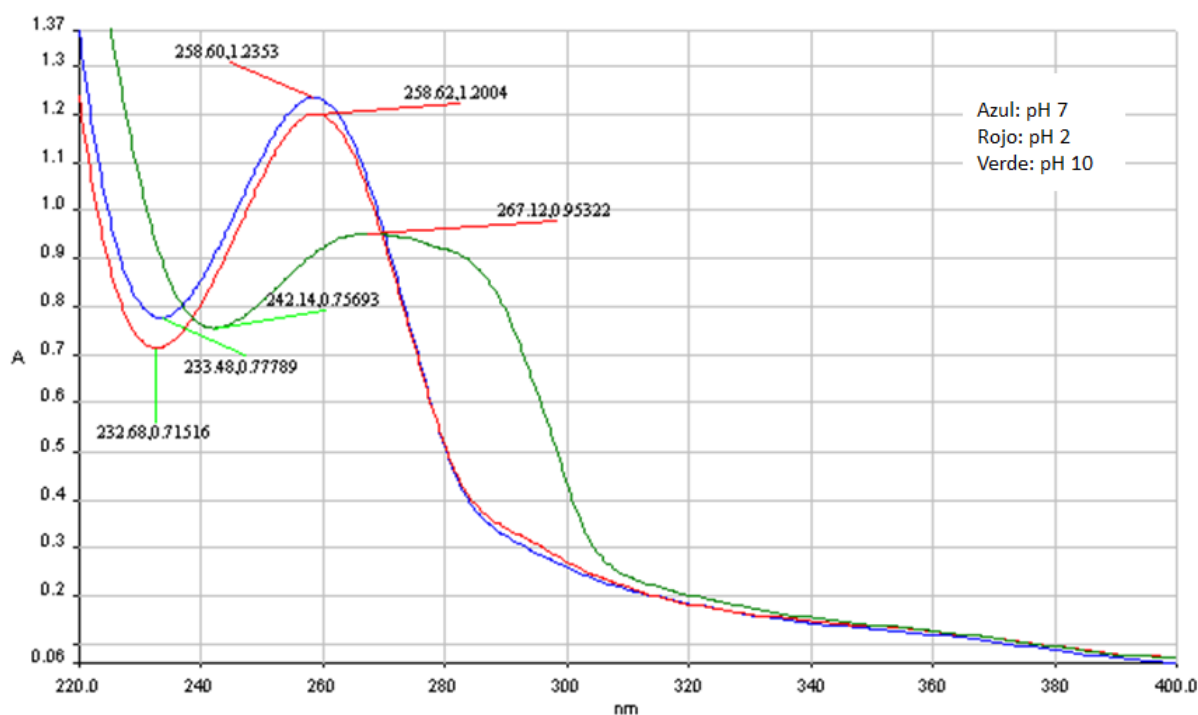


Figura 7.45: Espectros de absorción del supuesto uracilo en solución acuosa, a distintos valores de pH

Tabla 7.9: Comparación de los datos espectrales del supuesto uracilo con datos reportados en la literatura

ANALITO	pH	λ_{max} (nm)	λ_{min} (nm)	A_{max}/A_{min}
Uracilo	4.4-7.2	259.5		
Shugar y Fox, 1952	10.0	266		
Uracilo	≈ 7	258.7	227.58	41.58
(estándar)	≈ 10	266.89	238.36	2.85
Uracilo obtenido por	≈ 7	258.60	233.48	1.59
pirroldinólisis	≈ 10	267.12	242.14	1.25
de 2'-Cyd				

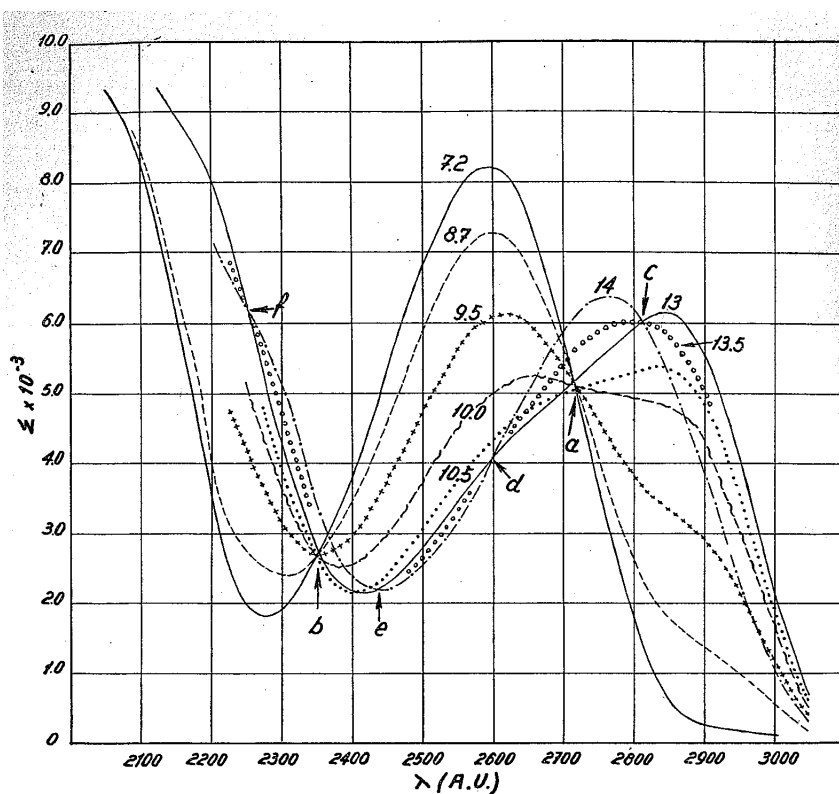


Figura 7.46: Espectros de absorción reportados para uracilo en solución acuosa [Shugar y Fox, 1952]

El análisis arriba descrito se refiere al material con tiempos de retención de 3.25 min, obtenido de la pirrolidinólisis de la 2'-dCyd por 96 h. En cambio, para los tiempos tempranos de la reacción, es posible que la banda observada consista exclusivamente o mayormente de 2'-dUrd, producida por la desaminación hidrolítica de la 2'-dCyd, como ya se había comentado y que a medida que el tiempo de reacción avanza este nucleósido reaccione con la pirrolidina y se libere la base libre, que eluye al mismo tiempo en la cromatografía. Para confirmar este supuesto se recomienda aislar el compuesto que eluye a 3.25 min tras 2 h de pirrolidinólisis de 2'-dCyd, y llevar a cabo el análisis espectrofotométrico en ambiente acuoso, como arriba descrito.

Capítulo 8

Conclusiones

En términos generales, el patrón de reactividad de las bases heterocíclicas en 2'-desoxinucleósidos tras pirrolidinólisis en solución acuosa, a 110°C, se ve reflejado en el reportado para oligodesoxirribonucleótidos en altas concentraciones de sal, en condiciones similares: $A > C > G \gg T$. Sin embargo, para algunos casos se observan diferencias significativas en la propensión de estos grupos para ser atacados por el agente nucleofílico. El grupo timina de la 2'-dThd reacciona por mucho más lento que lo reportado anteriormente para el mismo residuo en el entorno oligonucleotídico, y es probable que, en este último caso, la escisión de la cadena se haya producido por procesos de radiólisis derivados del marcaje radioisotópico en la terminal 5'. En el caso de la degradación de la 2'-dCyd, la tasa de reacción del grupo pirimídico es superior que en caso de los oligonucleótidos.

La influencia de las condiciones de reacción sobre la tasa de degradación de las bases heterocíclicas en varios 2'-desoxinucleósidos también fue examinada. Para el caso de la pirrolidinólisis de 2'-dAdo, la reducción de la constante dieléctrica del solvente causa una disminución significativa en la constante de velocidad, ya sea al emplear solventes acuoso-etanólicos o en concentraciones elevadas de pirrolidina, 1.5 M. También, la tasa de degradación de este nucleósido en las mismas condiciones tiene una fuerte dependencia de la temperatura, y la energía de activación calculada sugiere que el evento definitorio de la degradación es la ruptura del enlace glicosídico, en analogía con lo reportado para la

hidrólisis de este mismo compuesto en ambiente neutral. Una reducción de la basicidad de la amina hace que los grupos guanina en los nucleósidos sean más susceptibles al ataque nucleofílico al reducir la proporción de grupos desprotonizados, tal y como se observó en el entorno oligonucleotídico.

En lo que se refiere a los mecanismos de reacción en las condiciones mencionadas, se propone el mecanismo de la pirrolidinólisis de la 2'-dAdo, siendo la estabilización del zwitterión importante para la reacción, que demanda una mayor permisividad en el solvente. Los productos principales de esta reacción, se identifican como la adenina y algún derivado de la termólisis de la desoxirribosa. La degradación de la 2'-dCyd inicialmente procede por una desaminación hidrolítica produciendo a la 2'-dUrd, que a su vez reacciona con gran rapidez con la pirrolidina en solución para rendir la base libre uracilo. Lo anterior indica que en el corte en las posiciones C en oligodesoxirribonucleótidos se da una reacción de desaminación previa al corte producido por el ataque nucleofílico de la amina sobre la aglicona.

Capítulo 9

Recomendaciones

- Se sugiere estudiar la pirrolidinólisis del nucleósido 2'-desoxiguanosina usando un procedimiento que se asegure que se recojan todos los productos de la reacción para su análisis por HPLC (por ejemplo usando solventes alcohólicos para disolver los productos que no son acuosolubles).
- Se recomienda realizar ensayos con 2'-desoxiguanosina 3', 5'-bisfosfato para examinar el efecto que produce un mayor número de cargas negativas en los grupos fosfato sobre la reactividad del residuo de guanina.
- También resulta conveniente estudiar el comportamiento de los grupos adenina en oligonucleótidos de mayor tamaño, a saber, el pentámero d-TTATT y el heptámero d-TTTATTT. Los resultados obtenidos permitirían determinar el efecto del tamaño del oligómero en la reacción de la base adenina.
- Estudio de la reacción aminolítica de la 5'-metil-2'-desoxicitidina para una posible metodología de detección de posiciones C metiladas.

Bibliografía

- [Albert y Brown, 1954] Albert, A., y Brown, D.J. (1954). Purine studies. Part I. Stability to acid and alkali. Solubility. Ionization. Comparison with pteridines. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1954**:2060-2071.
- [Ambrose y Pless, 1985] Ambrose, B.J.B., y Pless, R.C. (1985). Analysis of DNA sequences using a single chemical cleavage procedure. *Biochemistry* **24**:6194-6200.
- [Ambrose, 1986] Ambrose, B.J.B. (1986). Chemical methods for the determination of DNA sequence in a single electrophoretic lane. Tesis de Doctorado, Ohio State University, E.U.A., página 118.
- [Ambrose y Pless, 1987] Ambrose, B.J.B., y Pless, R.C. (1987). DNA Sequencing Chemical Methods. *Methods in Enzymology* **152**:522-538.
- [Ambrose y col., 1988] Ambrose, B.J.B., Pless, R.C., y Ayers, M.E. (1988). Sequence analysis of end labeled DNA fragments by solvolysis in hot aqueous piperidine solutions. *Analytical Biochemistry* **169**:151-158.
- [Arredondo Vázquez, 2008] Arredondo Vázquez, M.G.(2008). Estudio de un método de secuenciación de oligonucleótidos por fragmentación química, analizable por MALDI-TOF. Tesis de Maestría, CICATA-IPN Querétaro.
- [Barrio y col., 1976] Barrio, J.R., Sattsangi, P.D., Gruber, B.A., Dammann, L.J., y Leonard, N.J. (1976). Species Responsible for the Fluorescence of 3, N⁴-Ethenocytidine. *Journal of the American Chemical Society* **98**:7408-7413.

- [Beaven y col., 1954] Beaven, G.H., Hall, D.M., Lesslie, M.S., Turner, E.E., y Bird, G.R. (1954). The relation between configuration and conjugation in diphenyl derivatives. Part III. The ultra-violet absorption spectra of some 2 : 2'-bridged compounds with meta-substituents. *Journal of the Chemical Society* **1954**:131-137.
- [Beaven y col., 1955] Beaven, G.H., Holiday, E.R., y Johnson, E.A. (1955). Optical properties of nucleic acids and their components. *The Nucleic Acids* **1**:493-553.
- [Cavalieri y col., 1948] Cavalieri, L.F., Bendich, A., Tinker, J.F., Bosworth Brown, G. (1948). Ultraviolet absorption spectra of purines, pyrimidines and triazolopyrimidines. *Journal of the American Chemical Society* **70**:3875-3880.
- [Cavalieri y Bendich, 1950] Cavalieri, L.F., y Bendich, A. (1948). The ultraviolet absorption spectra of pyrimidines and purines. *Journal of the American Chemical Society* **72**:2587-2594.
- [Cech, 1987] Cech, T.R. (1987). The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes. *Science* **236**:1532-1539.
- [Chastain y Tinoco Jr., 1991] Chastain, M., y Tinoco Jr., I. (1991). Structural Elements in RNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **41**:131-177.
- [Chen y Greider, 2005] Chen, J.L., y Greider, C.W. (2005). Functional analysis of the pseudoknot structure in human telomerase RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **102**:8080-8085.
- [Church y Gilbert, 1984] Church, G.M., y Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **81**:1991-1995.
- [Clauwaert y Stockx, 1968] Clauwaert, J., y Stockx, J. (1968). Interaction of polynucleotides and their components. I. Dissociation constants of the bases and their derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung B* **23**:25-30.
- [Cornish y Giedroc, 2009] Cornish, P.V., y Giedroc, D.P. (2009). Frameshifting RNA pseudoknots: structure and mechanism. *Virus Research* **139**:193-208.

- [Dahm, 2005] Dahm, R. (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* **278**:274-278.
- [Davis y Hogg, 1983] Davis, K.R., y Hogg, J.L. (1983). Transition state structures for the hydrolysis of cyclic and acyclic carboxylic and anhydrides. *Journal of Organic Chemistry* **48**:1041-1047.
- [Dirks y col., 2004] Dirks, R.M., Lin, M., Winfree, E., y Niles, A.P. (2004). Paradigms for computational nucleic acid design. *Nucleic Acids Research* **32**:1392-1403.
- [Doo-Byoung y col., 2002] Doo-Byoung, O., Yang-Gyun, K., y Rich, A. (2002). Z-DNA-binding proteins can act as potent effectors of gene expression in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **99**:16666-16671.
- [Drmanac y col., 1989] Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I., y Crkvenjakov, R. (1989). Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method. *Genomics* **4**:114-128.
- [Duh y col., 1988] Duh, J., Punzalan, R.R., y Pless, R.C. (1988) Reactivity of pyrimidine nucleosides under the conditions of the pyrimidine sequencing reactions of Maxam and Gilbert. *Analytical Biochemistry* **168**:231-238.
- [Everett y Landsman, 1954] Everett, D.H., y Landsman, D.A. (1954). A redetermination of the dissociation constant of the ammonium ion and the base strength of ammonia in water. *Transactions of the Faraday Society* **50**:1221-1229.
- [Ferraboli y col., 1993] Ferraboli, S., Negri, A., Di Mauro, E., y Barlati, S. (1993). One-Lane Chemical Sequencing of 3'-Fluorescent-Labeled DNA. *Analytical Biochemistry* **214**:566-570.
- [Finger y col., 2003] Finger, L.D., Trantirek, L., Johansson, C., y Feigon, J. (2003). Solution structures of stem-loop RNAs that bind to the two N-terminal RNA binding domains of nucleolin. *Nucleic Acids Research* **31**:6461-6472.

- [Fox y Shugar, 1952] Fox, J.J., y Shugar, D. (1952). Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. *Biochimica et Biophysica Acta* **9**:369-384.
- [Fung y col., 1989] Fung, S., Woo, S.L., Haugland, R.P., Menchen, S.M., y Connell, C.R. (1989). Method of detecting electrophoretically separated oligonucleotides. U.S. Patent 4,855,225.
- [Garrett y Mehta, 1972] Garrett, E.R., y Mehta, P.J. (1972). Solvolysis of Adenine Nucleosides. II. Effects of Sugars and Adenine Substituents on Alkaline Solvolyses. *Journal of the American Chemical Society* **94**:8542-8547.
- [Giedroc y Cornish, 2009] Giedroc, D.P., y Cornish, P.V. (2009). Frameshifting RNA pseudoknots: Structure and mechanism. *Virus Research* **139**:193-208.
- [González-Jasso y col., 2007] González-Jasso, E., Arredondo-Vázquez, G., Martínez, P., y Pless, R.C. (2007). Comparison of different amines for the one-lane sequence determination of 5'-end-labeled oligodeoxyribonucleotides by chemical cleavage. *Analytical Biochemistry* **369**:112-119.
- [Hecht y col., 1992] Hecht, S. S., Young-Sciame R., y Chung, F.L. (1992). Reaction of α -Acetoxy-N-nitrosopiperidine with Deoxyguanosine: Oxygen-Dependent Formation of 4-Oxo-2-pentenal and a 1, N²-Ethenodeoxyguanosine Adduct. *Chemical Research in Toxicology* **5**:706-712.
- [Hetzer y col., 1963] Hetzer, H.B., Bates, R.G., y Robinson, R.A. (1963). Dissociation constant of pyrrolidinium ion and related thermodynamic quantities from 0 to 50°C. *Journal of Physical Chemistry* **67**:1124-1127.
- [Iverson y Dervan, 1987] Iverson, B.L., y Dervan, P.B. (1987). Adenine specific DNA chemical sequencing reaction. *Nucleic Acids Research* **15**:7823-7830.
- [Jackson y Bartek, 2009] Jackson, S.P., y Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**:1071-1078.

- [Jones y col., 1966] Jones, A.S., Mian, A.M., y Walker, R.T. (1966). The action of alkali on some purines and their derivatives. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1966**:692-695.
- [Koch-Nolte y col., 2001] Koch-Nolte, F., Rothenburg, S., y Haag, F. (2001). DNA methylation and Z-DNA formation as mediators of quantitative differences in the expression of alleles. *Immunological Reviews* **184**:286-298.
- [Kornberg, 1980] Kornberg, A. (1980). *DNA Replication*. W. H. Freeman y Co. San Francisco. (pág. 659).
- [Kricka y Fortina, 2009] Kricka, L.J., y Fortina, P. (2009). Analytical Ancestry: 'Firsts' in Fluorescent Labeling of Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids. *Clinical Chemistry* **55**:670-683.
- [Lane y col., 2008] Lane, A.N., Chaires, J.B., Gray, R.D., y Trent, J.O. (2008). Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Research* **36**:5482-5515.
- [Levene, 1919] Levene, P.A. (1919). The structure of yeast nucleic acid. IV. Ammonia hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* **41**:415-424.
- [Mansour y Storer, 1997] Mansour, S.T., y Storer, R. (1997). Antiviral nucleosides. *Current Pharmaceutical Design* **169**:227-264.
- [Martínez Reyes, 2007] Martínez Reyes, J. (2007). Determinación de las constantes de ionización de las bases heterocíclicas del ADN en ambiente alcalino. Tesis de Maestría, CICATA-IPN Querétaro.
- [Mason, 1954] Mason, S.F. (1954). The Ultra-violet Absorption Spectral of Some Mono- and Poly-substituted Purines. *Journal of the American Chemical Society* **1954**:2071-2081.
- [Maxam y Gilbert, 1977] Maxam, A.M., y Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **74**:560-564.
- [Maxam y Gilbert, 1980] Maxam, A.M., y Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in Enzymology* **65**:499-560.

- [Mirkin y Frank-Kamenetskii, 1994] Mirkin, S.M., y Frank-Kamenetskii, M.D. (1994). H-DNA and Related Structures. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **23**:541-576.
- [Negri y col., 1991] Negri, A., Costanzo, G., y Di Mauro, E. (1991). A Single-Reaction Method for DNA Sequence Determination. *Analytical Biochemistry* **197**:389-395.
- [Negri y col., 1994] Negri, A., Ferraboli, S., Barlati, S., y Di Mauro, E. (1994). Chemical method for DNA sequence determination from the 5'-extremity on PCR amplified fragments. *Nucleic Acids Research* **22**:111-112.
- [Negri y col., 1996] Negri, A., Costanzo, G., Saladino, R., y Di Mauro, E. (1996). One-Step One-Lane Chemical DNA Sequencing by N-Methylformamide in the Presence of Metal Ions. *Biotechniques* **21**:910-917.
- [O'Connell y col., 1987] O'Connell, J.F., Nesnow, S., y Slaga, T.J. (1987). Initiation, promotion and complete carcinogenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine or ethylnitrosourea in the Sencar mouse skin tumorigenesis model. *Cancer Letters* **37**:301-310.
- [Oliver y col., 2000] Oliver, A.W., Bogdarina, I., Schroeder, E., Taylor, I.A., y Kneale, G.G. (2000). Preferential Binding of fd Gene 5 Protein to Tetraplex Nucleic Acid Structures. *Journal of Molecular Biology* **301**:575-584.
- [Ortoleva-Donnelly y col., 1998] Ortoleva-Donnelly, L., Ryder, R. P., Moncoeur, E., Szewczak, A.A., y Strobel S.A. (1998). A minor groove RNA triple helix within the catalytic core of a group I intron. *Nature Structural Biology* **5**:1037-1042.
- [Pabo y Sauer, 1984] Pabo, C.O., y Sauer, R.T. (1984). Protein-DNA Recognition. *Annual Review of Biochemistry* **53**:293-321.
- [Pearson y col., 1968] Pearson, R.G., Sobel, H., y Songstad, J. (1968). Nucleophilic reactivity constants toward methyl iodide and trans-[Pt(py)₂Cl₂]. *Journal of the American Chemical Society* **90**:319-326.

- [Petrosino y col., 2009] Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., y Versalovic, J. (2009). Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clinical Chemistry* **55**:856-866.
- [Pless y Bessman, 1983] Pless, R.C., y Bessman, M.J. (1983). Influence of Local Nucleotide Sequence on Substitution of 2-Aminopurine for Adenine during Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Vitro. *Biochemistry* **22**:4905-4915.
- [Ponnuswamy y Gromiha, 1994] Ponnuswamy, P.K., y Gromiha, M.M. (1994). On the Conformational Stability of Oligonucleotide Duplexes and tRNA Molecules. *Journal of Theoretical Biology* **169**:419-432.
- [Ratsep y Pless, 1988] Ratsep, P.C., y Pless, R.C. (1988). Hydrolysis of 2-aminopurine deoxyribonucleoside in neutral solution. *Journal of Organic Chemistry* **53**:3241-3246.
- [Rehmann y col., 2007] Rehmann, H., Wittinghofer, A., y Bos, J.H. (2007). Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**:63-73.
- [Reichard, 1955] Reichard, P. (1955). Utilization of Deoxyuridine and 5-Methyluridine for the Biosynthesis of Thymine by the Rat. *Acta Chemica Scandinavica* **9**:1275-1285.
- [Ronaghi y col., 1996] Ronaghi, M., Karamohamed, S., Petterson, B., Uhlén, M., y Nyrén, P. (1996). Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Releasing. *Analytical Biochemistry* **242**:84-89.
- [Ronaghi y col., 1998] Ronaghi, M., Uhlén, M., y Nyrén, P. (1998). A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate Detection. *Science* **281**:363-365.
- [Rothemund, 2006] Rothemund, P.W.K. (2006). Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **440**:297-302.
- [Rubin y Schmid, 1980] Rubin, C.M., y Schmid, C.W. (1980.) Pyrimidine-specific chemical reactions useful for DNA sequencing. *Nucleic Acids Research* **8**:4613-4619.

- [Saladino y col., 1996] Saladino, R., Mincione, E., Crestini, R., Negri, R., Di Mauro, E., y Costanzo, G. (1996). Mechanism of Degradation of Purine Nucleosides by Formamide. Implications for Chemical DNA Sequencing Procedures. *Journal of the American Chemical Society* **118**:5615-5619.
- [Saladino y col., 1997] Saladino, R., Crestini, R., Mincione, E., Costanzo, G., Di Mauro, E., y Negri, R. (1997). Mechanism of degradation of 2'-deoxycytidine by formamide: implications for chemical DNA sequencing procedures. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **5**:2041-2048.
- [Sanger y col., 1977] Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **74**:5463-5468.
- [Seeman, 2007] Seeman, N.C. (2007). An Overview of Structural DNA Nanotechnology. *Molecular Biotechnology* **37**:246-257.
- [Sczepanski y col., 2008] Sczepanski, J.T., Jacobs, A.C., y Greenberg, M.M. (2008). Self-promoted DNA interstrand cross-link formation by an abasic site. *Journal of the American Chemical Society* **130**:9646-9647.
- [Shugar y Fox., 1952] Shugar, D., y Fox, J.J. (1952). Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. I. Pyrimidines. *Biochimica et Biophysica Acta* **9**:199-207.
- [Simoncsits y Török, 1982] Simoncsits, A., y Török, I. (1982). A photoinduced cleavage of DNA useful for determining T residues. *Nucleic Acids Research* **10**:7959-7964.
- [Slotkin y Martienssen, 2007] Slotkin, R.K., y Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Review Genetics* **8**:272-285.
- [Smith y col., 1985] Smith, L.M., Fung, S., Hunkapiller, M.W., Hunkapiller, T.J., y Hood, L.E. (1985). The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: Synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Research* **13**:2399-2412.

- [Sundaralingam y Wahl, 1999] Sundaralingam, M., y Wahl, M.C. (1999). Crystal structures of A-DNA duplexes. *Biopolymers* **44**:45-63.
- [Sverdlov y Kalinina, 1983] Sverdlov, E.D., y Kalinina, N.F. (1983). Interaction of DNA and hydrogen peroxide. A method of localizing pyrimidine bases in DNA. *Bioorganicheskaya Khimiya* **9**:1696-1698.
- [Testoff y Pless, 1991] Testoff, M.A., y Pless, R.C. (1991). Sequence analysis of end-labeled DNA fragments by solvolysis in aqueous solutions of different amines. *Analytical Biochemistry* **197**:316-320.
- [Trantirek y col., 2003] Trantirek, L., Johansson, C., Finger, L.D., y Feigon, J. (2003). Solution structures of stem-loop RNAs that bind to the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin. *Nucleic Acids Research* **31**:6461-6472.
- [Uliana y col., 1971] Uliana, R., Créac'h, P. V., y Ducastaing, A. (1971). Quelques aspects de la radiodénaturation de l'acide désoxiribonucleique (ADN). *Biochimie* **53**:461-468.
- [Watson y Crick, 1953] Watson, J.D., y Crick, F.H.C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**:737-738.
- [Yershov y col., 1996] Yershov, G., Barsky, V., Belgovskiy, A., Kirillov, E., Kreindlin, E., Ivanov, I., Parinov, S., Guschin, D., Drobishev, A., Dubiley, S., y Mirzabekov, A. (1996). DNA analysis and diagnostics. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **93**:4913-4918.
- [Zoltewicz y col., 1970] Zoltewicz, J.J., Clark, D.F., Sharpless, T.W., y Grahe, G. (1970). Kinetics and Mechanism of the Acid-Catalyzed Hydrolysis of Some Purine Nucleosides. *Journal of the American Chemical Society* **92**:1741-1750.
- Figura 2.2 *Fuente:* <http://en.wikipedia.org/w/index.php?oldid=365263398> *Licencia:* Dominio Público.
- Figura 2.5 *Fuente:* [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:A-DNA, B-DNA and Z-DNA.png](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png) *Licencia:* GNU Free Documentation License *Autor:* Original uploader was Richard Wheeler (Zephyris) at en.wikipedia.