

DESAMINACIÓN HIDROLÍTICA DEL ISÓMERO TRANS *axial-axial* DE LA 5,6-DIHIIDROXICITOSINA EN MEDIO PROTÓNICO. ESTUDIO TEÓRICO.

Pila Andrea N., Profeta Mariela I., Romero Jorge M., Jorge Nelly L., Grand Andre A.*

Laboratorio de Investigaciones en Tecnología Ambiental, FACENA, Universidad Nacional del Nordeste, Campus Universitario, Avda. Libertad 5460, 3400 Corrientes.

*Département de Recherche Fondamentale Sur la Matière Condensée, UMR CEA-UJF E3, CEA-Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054, Grenoble cedex 9, France

email: nelly.jorge@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La amina exocíclica de bases nitrogenadas puede ser hidrolizada en condiciones fisiológicas de pH y temperatura. La citosina y la 5-metilcitosina, son sensibles a esta modificación química, dando lugar a la formación de los respectivos uracilo y timina. La estructura de doble hélice del DNA tiene una tendencia a proteger a sus bases contra la desaminación. Así, mientras la vida media de residuos de citosina a pH = 7.4 y T = 37 ° C es de unos 200 años, en el DNA de doble cadena se eleva a 30.000 años. Cabe señalar que la mutación de un residuo de 5-metilcitosina a timina, y la mutación asociada con una adenina- guanina en la cadena complementaria es por lejos la mutación más frecuente en los cánceres humanos, por lo que es una lesión importante a ser estudiada.

El presente estudio tiene como objetivo contribuir con el conocimiento de los mecanismos de desaminación hidrolítica de la 5,6-dihidroxicitosina, a través de modelos computacionales, comparándose con la desaminación de la citosina.

MÉTODOS

Todos los cálculos se realizaron utilizando el paquete de Gaussian03 a nivel de teoría DFT, con el funcional híbrido B3LYP y la base triple zeta 6-311G (d, p). Las funciones de polarización se incluyeron debido a la necesidad de describir correctamente los enlaces de hidrógeno. Sin embargo, dado el hecho de que todos los sistemas son neutrales o cargados positivamente, se decidió no añadir funciones difusas. Como primer paso, las geometrías de los sistemas moleculares de interés han sido optimizadas en el vacío. Después de la optimización completa, los diferentes puntos estacionarios se caracterizaron, ya sea como mínimos o estados de transición, mediante el cálculo de las frecuencias de vibración dentro de la aproximación armónica en el mismo nivel de la teoría. Se extrajeron los datos térmicos para obtener las diferentes funciones termodinámicas de la reacción y los parámetros de activación correspondientes a 298,15 K y 1 atm.

Los cálculos de la energía se realizaron en las geometrías optimizadas tomando un modelo continuo polarizado en el formalismo de la ecuación integral (IEF-PCM), con ϵ = constante dieléctrica 78,39 con el fin de simular el efecto global de un entorno polar. La cavidad fue modificada por defecto mediante la adición de esferas individuales en todos los átomos de hidrógeno enlazados a átomos de nitrógeno y oxígeno, utilizando la palabra clave SPHEREONH.

Los caminos de reacción en el vacío se caracterizaron en el mismo nivel de la teoría mediante la realización de cálculos de coordenadas de reacción intrínseca (IRC), esto se hizo, para asegurarse de que las estructuras de transición, están conectados a los reactivos y productos apropiados.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La molécula de reactivo 5,6-OHCYTR optimizada sin restricción, presenta interacciones electrostáticas con dos moléculas de agua, los enlaces de hidrógeno estabilizan al complejo molecular (Figura 1). La primera etapa del mecanismo de reacción puede ser descrita por una primera hidrogenación del N3, deshidrogenación del N4 del complejo molecular 5,6-OHCYTR, a través de un estado de transición 5,6-OHCYTTS1, ayudado por dos moléculas de agua dando un intermediario 5,6-OHCYTIR1 (Figura1). Este intermediario muestra una coplanaridad con el anillo de pirimidina, lo cual no es real. Para la etapa siguiente, la molécula de agua atacante tiene que venir de una dirección perpendicular al plano definido por el anillo de pirimidina. En consecuencia, la optimización del complejo molecular intermediario 5,6-OHCYTIR1, se logró mediante la aplicación de restricciones a fin de imponer una orientación correcta relativa de las tres moléculas que forman el complejo.

La etapa siguiente del mecanismo es la adición nucleofílica de una molécula de agua sobre el átomo de carbono 4 del 5,6-OHCYTIR1 con la ayuda de la segunda molécula de agua. Esto da lugar a un intermediario 5,6-OHCYTIR2 a través del estado de transición 5,6-OHCYTTS2. Este paso elemental implica, pues, un mecanismo concertado de 6 centros: N3, H7a, O7, H8a, O8 y C4. Las distancias características de las estructuras en la etapa elemental o sea en la adición nucleofílica se dan en la figura 2. El grupo amino exocíclico de la 5,6-OHCYTIR2 es protonado a través de una transferencia de protones para formar el complejo molecular 5,6-OHCYTIR3. El enlace C4-N4 se rompe a través del estado de transición 5,6-OHCYTTS3, que incluye también una transferencia de protones simultánea del grupo hidroxilo en C4 a NH_3^+ , formando de esta manera una molécula de timina que interactúa con una molécula de agua y un catión amonio (Figura 3). En la Figura 4 se muestra la evolución de la energía libre a lo largo del camino de reacción, en el solvente acuoso

En la Tabla 1 se reportan las energías relativas y las energías libres calculadas en el vacío y las energías libres calculadas en el solvente acuoso, para los diferentes puntos estacionarios del mecanismo propuesto.

En el mecanismo propuesto, la adición nucleofílica sobre el C4 es el paso determinante de la velocidad de reacción, tanto en el vacío, como en disolución acuosa. En el vacío, la adición nucleofílica sobre el carbono C4 de 5,6-OHCYTR es $\Delta G^\ddagger_{\text{vacío}, 5,6\text{-OHCYTTS2}} = 125.21 \text{ kJ/mol}$ y en solución acuosa, $\Delta G^\ddagger_{\text{aq}, 5,6\text{-OHCYTTS2}} = 124.97 \text{ kJ/mol}$.

Tabla 1. Energías relativas, energías libres en el vacío y energías libres relativas en solvente agua para los puntos estacionarios del camino de reacción. Todos los valores están en kJ/mol.

Sistema	ΔE_{vac}	ΔG_{vac}	ΔG_{aq}
5,6-OHCYT_R + H ⁺	0.0	0.0	0.0
5,6-OHCYT_TS1 + H ⁺	51.59	49.87	56.29
5,6-OHCYT_IR1 + H ⁺	8.15	10.73	0.58
5,6-OHCYT_TS2 + H ⁺	117.50	125.21	124.97
5,6-OHCYT_IR2 + H ⁺	-22.24	-15.56	0.07
5,6-OHCYT_IR3	-961.19	-953.03	-49.36

5,6- OHCYT_TS3	-924.74	-925.13	7.72
5,6- OHCYT_P	-1032.46	-1034.34	-132.84

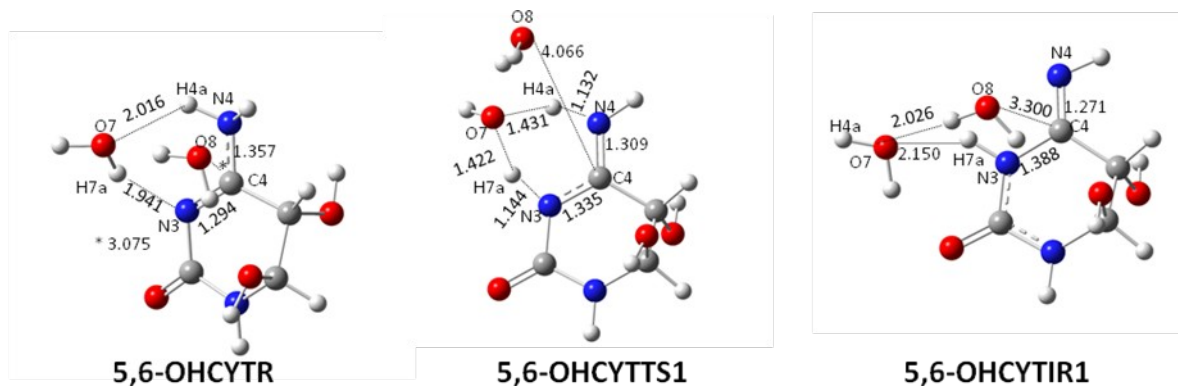


Figura 1. Primera etapa de la desaminación

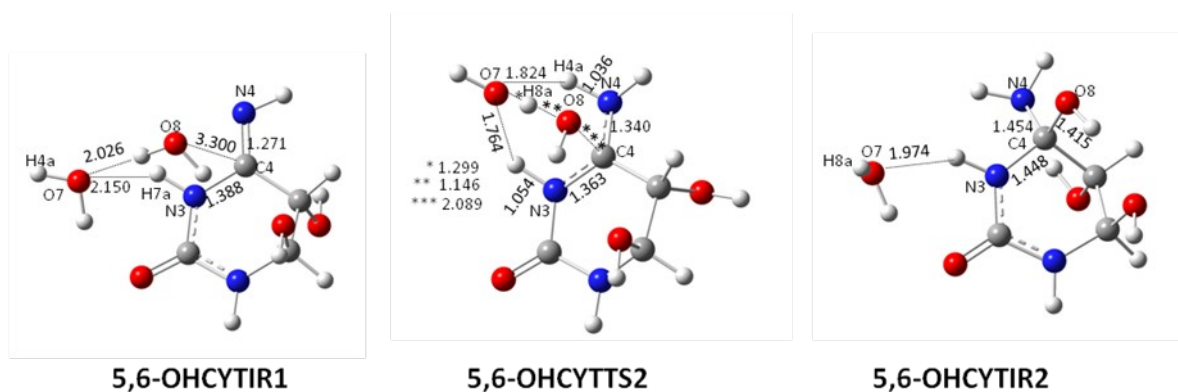


Figura 2. Segunda etapa de la desaminación y determinante de la velocidad de la reacción.

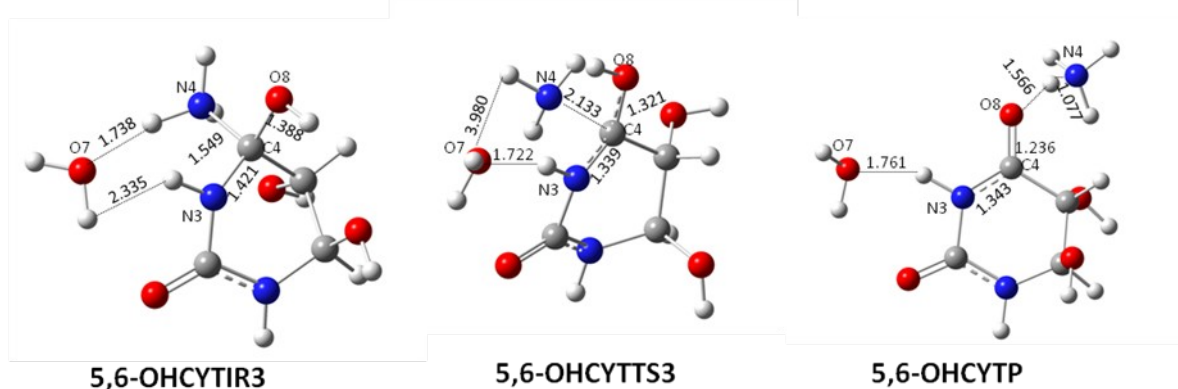


Figura 3. Tercera etapa de la desaminación

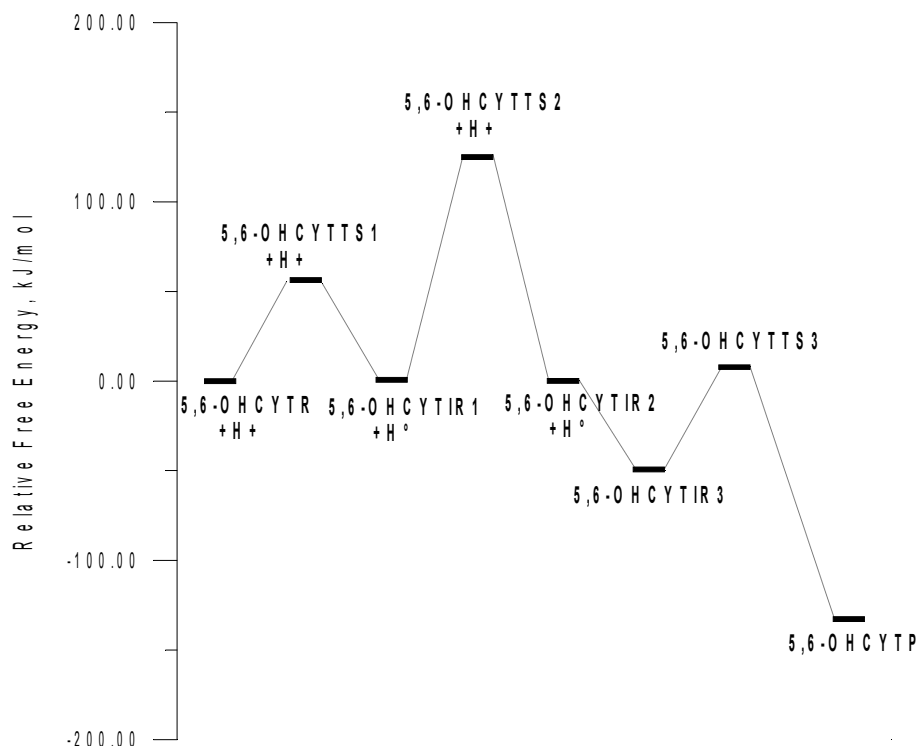


Figura 4. Evolución de la energía libre para la formación del 5,6-OHCYTP en el estado fundamental

CONCLUSIONES

El mecanismo para la reacción de desaminación de la 5,6-dihidroxicitosina con H_2O en un medio prótico se investigó con la metodología DFT utilizando el funcional B3LYP y la base 6-311G (d,p). Se encontró un mecanismo de cuatro etapas en las que la molécula neutra 5,6-dihidroxicitosina es directamente atacada por un dímero de agua, formando el grupo imino. El intermediario resultante sufre una adición nucleofílica y el producto de esta segunda etapa, se protona para permitir la eliminación de un catión de amonio. Este camino lleva a la formación de la timina en interacción con un catión de amonio y una molécula de agua. Esta vía de reacción explica la desaminación espontánea de la 5,6-dihidroxicitosina en un medio prótico a pH neutro.

La adición nucleofílica sobre el carbono 4, es la etapa determinante de la velocidad de reacción y se asocia con la energía libre de activación en la solución acuosa de 125,0 kJ / mol. Este último valor es más bajo en 10 kJ/mol que el valor de la energía libre de activación en solución acuosa de la citosina, con lo que se concluye que este derivado de la citosina se desamina más rápidamente que la citosina.

BIBLIOGRAFIA

- Liu, S. B. *Acta Physico-Chimica Sinica* **2009**, 25, 590-600.
- Gazquez, J. L. *J. Mex. Chem. Soc.* **2008**, 52, 3-10.
- Ayers, P. W.; Anderson, J. S. M.; Bartolotti, L. J. *Int. J. Quantum. Chem.* **2005**, 101, 520-534.
- Chattaraj, P. K.; Sarkar, U.; Roy, D. R. *Chem. Rev.* 2006, 106, 2065-2091.
- Labet, V.; Morell, C.; Cadet, J.; Eriksson, L.A., Grand, A. *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 2524-2533
- Douki, T.; Cadet, J. *J Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1992, 15, 199-213.