

# EFECTO DE LA INFLUENCIA COMBINADA DE COLORANTES INTERCALADORES - SENSIBILIZADORES E IRRADIACIÓN DE LÁSERES ULTRAVIOLETA EN EL ADN DEL MAÍZ

*Jorge Acurio Saavedra, Alfonso Aréstegui Pezúa,  
Elena E. Madera Tupayachi, Julia G., Muñiz Durán y Elena E. Acurio S.*

127

## INTRODUCCIÓN

Los láseres son denominados nuevas fuentes de radiación óptica con una pequeña divergencia angular, alto grado de coherencia y mono cromatismo. Los diferentes tipos de láseres creados en la actualidad trabajan en regímenes continuos de impulso, suministran la generación de radiación en diferentes longitudes de onda en los diapasones espectrales (bandas) ultravioleta, visible e infrarrojos. En los últimos años, el desarrollo de la técnica de láseres despertó el interés para la interacción de radiaciones coherentes y monocromáticas con sistemas biológicos (Neidle, *et al.* 1984).

Se conocen diferentes aspectos sobre la acción biológica de la radiación con láseres; sin embargo, en dichos trabajos la atención prestada a los mecanismos de acción por la radiación láser (RL) hacia objetos biológicos es insuficiente. En este sentido, el objetivo del estudio fue interpretar brevemente los antecedentes que se tenían por bibliografía sobre la acción biológica de las radiaciones láser y poner en evidencia la probabilidad de formación de rupturas mono y bihebradas en el ADN del maíz, que pueden ser la causa de la acción mutagénica por la RL y colorantes intercaladores-sensibilizadores en plantas, mediante aislamiento y purificación del ADN, irradiación con láser, espectrofotometría de luz UV y visible y electroforesis en gel.

Se obtuvieron coleoptilos de maíz entre 3 y 4 cm de longitud y a partir de éstos se extrajeron y purificaron volúmenes de ADN correspondientes a 1,5 gr del material; posteriormente, se sometieron a RL las diferentes variantes en complejos ADN-colorante intercalante (8-Methoxypsoralen u

8-MOP, Acridone y 6-Mercapthopurina o 6-MP) y los respectivos casos de control. Luego de los datos obtenidos mediante pruebas de espectrofotometría y electroforesis se demostró que la variante en complejo ADN-6MP, no siendo un buen intercalador, alcanza un máximo efecto en la formación de rupturas mono y bihebradas frente a los complejos ADN-8MOP y ADN-Acridone en las mismas condiciones y concentraciones.

## OBJETIVOS:

- Inducir la formación de rupturas mono y bihebradas en el ADN del maíz, por acción combinada de colorantes intercaladores - sensibilizadores e irradiación de láseres ultravioleta.
- Poner en evidencia la probabilidad de formación de rupturas mono y bihebradas en el ADN del coleoptilo del maíz por efecto de la acción combinada de colorantes intercaladores-sensibilizadores e irradiación de láseres ultravioleta que pueden ser la causa de la acción mutagénica en plantas.

## HIPÓTESIS

La interacción de la RL con colorantes intercaladores-sensibilizadores presentan un impacto mutagénico en los sistemas biológicos, los cuales pueden ser evaluados por técnicas que permitan observar rupturas mono y bihebradas en el ADN.

## METODOLOGÍA

1. El aislamiento del ADN se realizó mediante el mini-método descrito por Lyhtenshtain y Draner, 1988.

2. La radiación se efectuó con ayuda del láser LGI-21.  
 Dosis de radiación  $3,6 \cdot 10^{-3}$  J.  
 Intensidad-densidad de radiación  $1,9 \cdot 10^8$  Wt/m.seg  
 Frecuencia 100 Hz.  
 Potencia del impulso 2,2 Wt.  
 Tiempo del impulso  $9 \cdot 10^{-9}$  seg.  
 Tiempo de radiación 30 min.
3. La preparación de los geles de agarosa y la corrida electroforética en condiciones nativas y denaturantes se realizó por protocolos universalmente admitidos (Maniatis et al, 1982).
4. La tinción del ADN en geles de agarosa, se realizó con el colorante fluorescente bromuro de etidio.
5. El fotografiado se efectuó en luz ultravioleta de paso (trans linker) y reflejado (cross linker). La película Polaroid TG PE57 o 667 (3000 unid eg ASA) posee mayor sensibilidad.
6. Preparación de buffer: para la electroforesis generalmente se emplean buffers (soluciones de amortiguación), que contengan Tris-acetato, Tris-borato o Tris-fosfato en concentraciones de 50 mM y con un pH de 7,5-7,8. Generalmente se prepara en forma de soluciones concentradas y se conserva a temperatura ambiente.
7. La espectrofotometría se realizó en el espectrofotómetro Specord UV VIS para la obtención de espectros de absorción y temperatura de fusión.

## RESULTADOS

El ADN es portador de la información genética, interactúa con muchos medicamentos, sustancias cancerígenas y mutagénicas, así también con diversos colorantes; la presencia de cuatro cromóforos heterocíclicos aromáticos alargados revela su característica particular (Chen; Benkovic 1983). Por cuanto el ADN juega un rol importante en los mecanismos de autoreplicación y expresión genética, su modificación por la interacción con dichos compuestos, ejerce un fuerte efecto sobre el metabolismo celular, la recombinación y grado de mutación (Waring 1981; Berman; Young, 1981). Todos estos aspectos mencionados anteriormente acerca de los efectos por la interacción con tales compuestos, despertaron gran interés para su creciente estudio, especialmente en los últimos

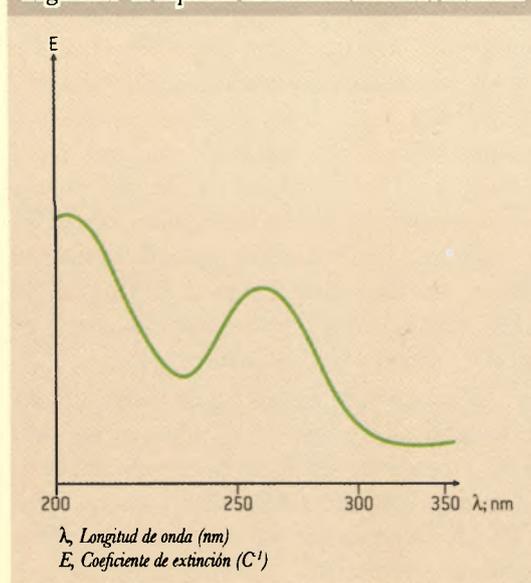
15 años. Se descubrió la probabilidad de su aplicación en la medicina y su amplia utilización en laboratorios de investigación sobre la estructura y funciones del ADN (Strachan; Read 2006).

En la actualidad, se sabe sobre los efectos mutagénicos y de recombinación por la RL (Volodin et al 1984; Burilkóv 1985). Sin embargo, la utilización de la RL, así como de otros mutágenos y recombinógenos conocidos, no permite aproximarse a la solución del problema principal de conocer el grado y espectro para generar variaciones genéticas. Entre ellos, la solución del último problema tendría gran importancia en la aceleración de los procesos de selección, el estudio de los mecanismos de recombinación genética y la generación de mutaciones.

En relación a este hecho, realizamos los trabajos de evaluación y revelación sobre la acción mutagénica y recombinogénica de la RL en combinación con los colorantes sensibilizadores que se intercalan entre los pares de bases nitrogenadas del ADN. La unión de los colorantes-sensibilizadores ocurre por la periferia de la molécula del ADN o mediante la intercalación entre los pares de las bases adyacentes sin la alteración del apareamiento de Watson y Crick.

La configuración estructural es normal; así también, la alteración en los nucleótidos de los ácidos nucleicos, se puede detectar y observar por las variaciones en los espectros de absorción ultravioleta (Fig 1). Estos espectros son muy sensibles a las variaciones en la composición química o en la configuración estructural espacial

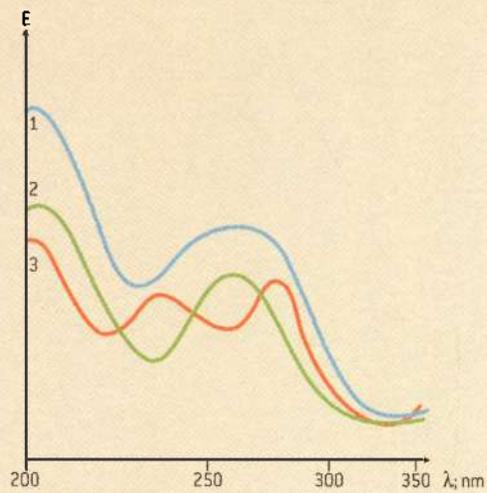
Figura N° 1: Espectro ultravioleta del ADN de Maíz.



de los nucleótidos y sus polímeros. Además, el espectro ultravioleta depende del estado eléctrico de las bases heterocíclicas y permite detectar las modificaciones químicas por los efectos de protonización o deprotonización de las bases nitrogenadas. En general, con la inserción de las moléculas aromáticas con un grosor de 3,4 Å, el esquema global del apilamiento aromático o fenólico (stacking) puede o no perturbarse. Sin embargo, para que la intercalación tenga lugar, los pares de bases deben abrirse y esto conlleva a la alteración en la geometría (curvatura) del armazón pentosa-fosfato y la alteración de la configuración regular espiralada, traduciéndose en una alteración de las propiedades físicas de la doble espiral con la inserción en ellos de los colorantes sensibilizadores que fácilmente se revela con ayuda de los espectros de absorción ultravioleta de las diferentes variantes en complejos (Figs. 2, 3). Si la intercalación no procede, entonces no se produce cambio en las propiedades físicas del ADN y como consecuencia no se alterará sus espectros de absorción ultravioleta (Fig. 4).

Uno de los parámetros que también caracteriza a la doble espiral es su temperatura de fusión  $T_m$  (temperatura melting). La formación del stacking se acompaña con la disminución de la absorción de luz ultravioleta (hipocromismo); por lo tanto, cuando se observa el espectro de absorción en esta zona es cómodo detectar la alteración y destrucción de la doble espiral del ADN (fig. 5); si incrementamos lentamente la temperatura

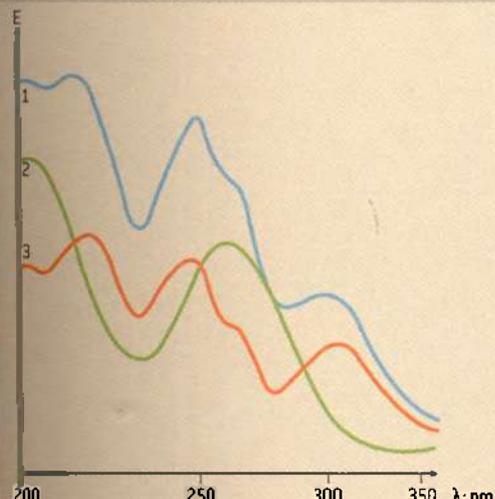
Figura N° 3: Espectro ultravioleta de variantes en complejo.



1. Complejo ADN-Acrídona
2. ADN de Maíz
3. Acrídona

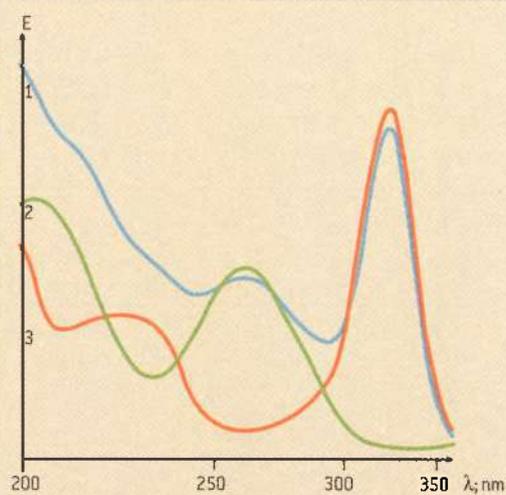
de la solución del ADN bi-hebrado, entonces a una determinada temperatura se observará un incremento brusco de la absorción, condicionado por la destrucción de la estructura espiralada. El punto medio de dicha conversión se denomina temperatura de fusión ( $T_m$ ). El incremento en longitud de la cadena elevará, por consiguiente, el peso molecular del ADN, la temperatura de fusión se acrecienta y la curva de fusión se mostrará más empinada, indicando un aumento en la cooperatividad (Pöbschke 1971:1989).

Figura N° 2: Espectro ultravioleta de variantes en complejo.



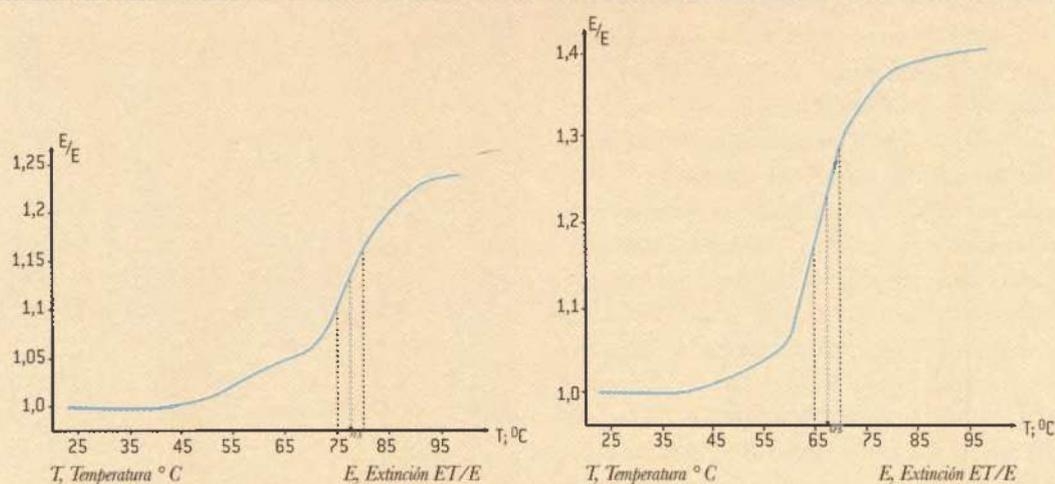
1. Complejo ADN-8MOP
2. ADN de Maíz
3. 8MOP

Figura N° 4: Espectro ultravioleta de variantes en complejo.



1. Complejo ADN-8MOP
2. ADN de Maíz
3. 8MOP

Figura Nº 5: Temperatura de fusión del ADN de Maíz.



La  $T_m$  del ADN bi-hebrado se acrecienta no solamente con el aumento de su longitud, sino con el incremento de la fuerza iónica de la solución, por el contenido del par G-C, con la intercalación en este de diferentes colorantes-sensibilizadores (Fig. 6). En caso de ausencia de intercalación la temperatura de fusión no prospera (Fig. 7).

Sin embargo, el efecto de los colorantes sensibilizadores no se limita a la intercalación en el ADN. Su principal prescripción sirve como intermediario en la transferencia de la energía agitada hacia el armazón pentosa-fosfato de los ácidos nucleicos. Por tal razón, la interacción colorante-ADN puede ocurrir y por la periferia de la molécula del ADN, por ejemplo, en la inserción

del colorante en el surco mayor del ADN bi-hebrado (Waring 1981; Berman; Young 1981).

La posibilidad de inducción de rupturas mono y bi-hebradas por efecto de irradiación láser en complejo ADN-colorante en el diapásom ultravioleta, fue demostrada todavía en los años de 1980 (Parjomenco et al, 1980). Las interrogantes sobre la inducción de rupturas mono y bi-hebradas utilizando diferentes colorantes en un aspecto comparativo, no se hicieron esperar, siendo el objetivo del presente trabajo.

La irradiación efectuada de los complejos ADN-colorante permitió demostrar los efectos de la acción de RL y colorantes-sensibilizadores sobre la molécula de alto peso molecular del ADN de

Figura Nº 6: Temperatura de fusión del complejo ADN-8MOP.

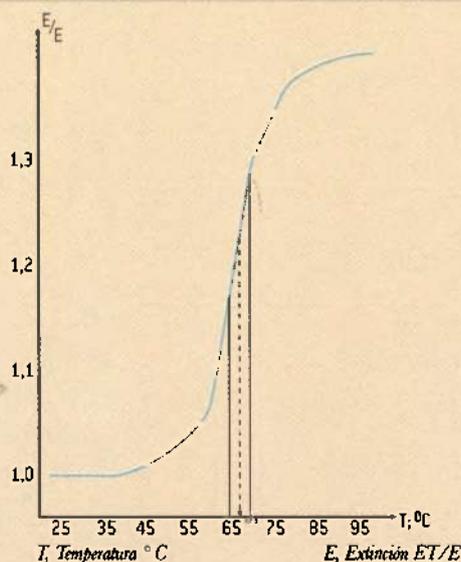
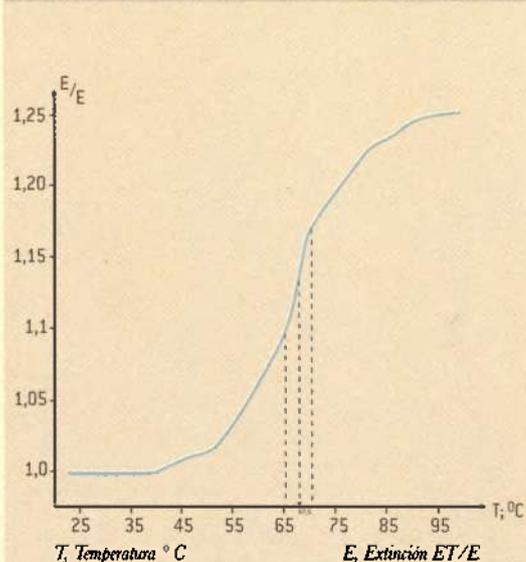
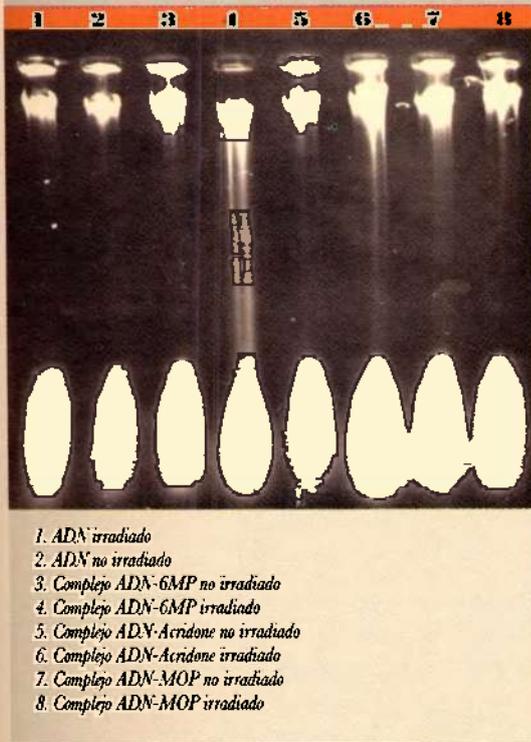


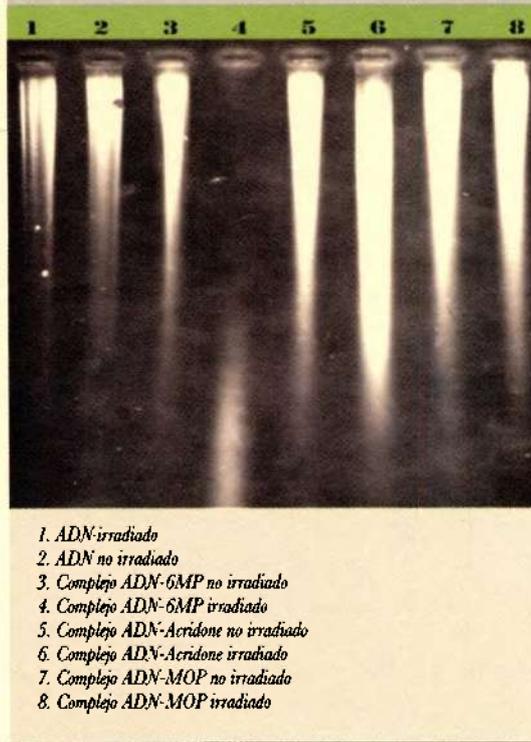
Figura Nº 7: Temperatura de fusión del complejo ADN-6MP.



**Figura N° 8:** Corrida electroforética del ADN de Maíz y variantes, en condiciones nativas.



**Figura N° 9:** Corrida electroforética del ADN de Maíz y variantes, en condiciones de desnaturalización.



coleoptilos del maíz (fig. 8, 9). Como se observa en los datos obtenidos por electroforesis, en caso de la acción combinada de RL y colorante, se alcanza un máximo efecto en la formación de rupturas mono y bi-hebradas, con esto el sensibilizador más efectivo resultó la 6-Mercapthopurina.

En la comparación de los espectros de absorción de la 6-Mercapthopurina (Fig. 4), 8-Methoxypsoralen y acridone, la diferencia es clara: el máximo de absorción de la 6-Mercapthopurina prácticamente yace en la región de emisión de láser, al mismo tiempo que los máximos de absorción del 8-Methoxypsoralen y Acridone están relativamente desplazados de la longitud de onda que fue utilizada. No siendo intercalador la 6-Mercapthopurina es denominado el mejor sensibilizador y a causa de ello conduce a la formación de un mayor número de rupturas mono y bi-hebradas de la molécula del ADN.

## CONCLUSIONES

1. Experimentalmente fue demostrada la posibilidad de formación de rupturas mono y bi-hebradas en la molécula de alto peso molecular del ADN del maíz, que puede ser utilizado posteriormente para el aumento del nivel y espectro de variación genética.
2. Con respecto a la acción combinada de RL y colorante sensibilizador se puede esperar la inducción de rupturas adicionales en el ADN cromosómico in vivo, los cuales son capaces de realizarse en los intercambios por translocación y crossing-over; así también, el surgimiento de diferentes mutaciones a nivel molecular en el ADN que conducen finalmente al incremento general de la frecuencia y el espectro de variación genética, siendo conocido como primera fuente de variación hereditaria de todas las formas de organismos vivos.

**BIBLIOGRAFÍA****BERMAN, H M; Young, D R.**

1981. "The interaction of intercalating drugs with nucleic acids." In: Annu. Rev. Biophys. Biolng. V-10, p. 87-114.

**BURILKÖV, V K.**

1985. *Efecto recombinante de la radiación láser*. Edit. Autoped.

**CHEN, J T; BENKOVIC, S J.**

1983. "Nucleic Acid. Res., vol-11, p. 3737-3751.

KLUG, W S; Cummings, M R; Spencer, Ch A.

2006. *Conceptos de Genética*. Editorial Pearson Educación S.A. España. 8a ed.

**MANIATIS, T; FRITSCH, E F; SAMBROOK, J.**

1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

**NEIDLE, S; ABRAHAM, Z.**

1984. "Structural and sequence-dependent aspects of drug intercalation into nucleic acids." CRC Crit Rev Biochem. V-17(1), p.73-121.

**PARJOMENCO, A I; Rautlan, S G; Shtockman, N I.**

1980. "Fotomodificación láser de macromoléculas y segregación del ADN." In: Rev. DAN. V-250, p. 225-228.

**PÖBSCHKE, D.**

1971. "Cooperative nonenzymic base recognition II. Thermodynamics of the helix coil transition of oligoadenylic and oligouridylic acids." In: Biopolymers. V-10, p. 1989-2013.

**STRACHAN, T; Read, A P.**

2006. *Genética humana*. Edit. Mc Graw Hill Interamericana editores S.A. 3a edición.

**VALODIN, V G; Mostovikóv, V A; Abramenco, B I; et al.**

1984. *Los láseres y la herencia vegetal*. Edit. Ciencia y técnica.

**WARING, M G.**

1981. "DNA modification and camer." In: Annu. Rev. Biochem V-50, p.159-192.