





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**"ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN  
QUELATOS MIXTOS DE COBRE (II) CON ADN"**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. YESHENIA MARGARITA FIGUEROA DE PAZ

DRA. LENA RUIZ AZUARA

FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, 19 DE JUNIO DEL 2017



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**"ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE COMPUESTOS DE  
COORDINACIÓN QUELATOS MIXTOS DE COBRE (II) CON ADN"**

**TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**Q. YESHENIA MARGARITA FIGUEROA DE PAZ**



Ciudad de México, 19 de junio de 2017



*Dedicado a  
mi familia,*

# Dedicatorias

No es sorpresa que siempre en las dedicatorias coloque sus nombre, ya que sin ustedes yo no estaría cumpliendo mis metas que sé que me llevarán a cumplir mis sueños. Sueños que ustedes no han dejado de alentar ni un solo día a pesar de que no lo entiendan del todo bien. Gracias por hacer de mi la persona que soy, por su amor y apoyo incondicional pero sobre todo, gracias por nunca dejar de creer en mí. Gracias Norma y Marcelo. Gracias Abuelitos. Con amor, cariño y admiración; “su científica loca”.

Como siempre les digo: no es fácil ser la hermana mayor, por que cada uno decide lo que está bien y lo que está mal, aun así quiero decir con estas palabras, que es por ustedes Pouleth y Sugeyli que todo lo que hago es especialmente por y para ustedes. Y aunque no suelo decirles esto, nunca olviden que “las Amo”.

A la persona por la cual guardo los recuerdos más sublimes en mi memoria, y que pese a todo nunca ha soltado mi mano, gracias Alan.

# Agradecimientos

A la Dra. Lena Ruiz Azuara, por la dirección de esta tesis, su apoyo incondicional, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, pero sobre todo, por ser un gran ejemplo a seguir en todos los aspectos.

A los proyectos PAPIIT IN 218013, CONACYT 179119 y PAIP 5000-9047 por el apoyo económico.

A CONACYT por la beca otorgada en el periodo 2015-2 - 2017-1 con número de becario 589195.

A la M. en C. Silvia Graciela Dávila Manzanilla por el apoyo técnico en el planteamiento de los experimentos pero sobre todo, por brindarme su amistad y por las largas pláticas que siempre necesité por lo menos una vez por semana.

Al M. en C. Adrián Espinoza Guillén por el apoyo técnico en el laboratorio, tu amistad y confianza.

A la M. en C. Zenayda Aguilar Jiménez por el apoyo brindado en la revisión de la escritura de la tesis, en especial por su amistad y esas pláticas con pizcas filosóficas.

Al Dr. Jorge Humberto Serment Guerrero por su apoyo, amistad y consejos, pero sobre todo por el conocimiento brindado para que este trabajo fuese mejor. También por permitirme realizar algunas pruebas que me permitieron plantear los experimentos de UV-vis, esto en laboratorios del departamento de Biología en Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ).



A los integrantes del laboratorio 210, por sus sugerencias e interés hacia mi trabajo.

Quiero agradecer de forma especial a todas las personas que conocí durante la maestría, es por ustedes que pasé momentos gratos que me han ayudado a crecer tanto profesionalmente como personalmente. Quisiera colocar los nombres de cada persona a las que en este párrafo me he referido, sin embargo, mi experiencia escribiendo no es buena y son pocas las palabras que conozco para expresarles a cada uno lo agradecida que estoy por su apoyo, ayuda y por hacer llevadera mi estancia en este lugar.

# Índice general

<b>Dedicatorias</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>iii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>vii</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Cáncer . . . . .	1
1.1.1. Estadística de la incidencia del cáncer . . . . .	1
1.1.2. Tratamientos contra el cáncer . . . . .	3
1.1.3. Quimioterapia . . . . .	4
1.1.3.1. Compuestos Orgánicos . . . . .	4
1.1.3.2. Compuestos Inorgánicos . . . . .	5
1.1.3.2.1. Mecanismo de acción del cisplatino . . . . .	7
1.1.3.3. Compuestos de cobre con actividad antitumoral . . . . .	9
<b>2. Antecedentes</b>	<b>11</b>
2.1. Diseño racional de fármacos . . . . .	11
2.2. Modos de interacción de fármacos con ADN . . . . .	12
2.2.1. Interacciones covalentes con la doble hélice del ADN . . . . .	13
2.2.2. Interacciones no covalente con la doble hélice del ADN . . . . .	13
2.2.2.1. Intercalación clásica . . . . .	13
2.2.2.2. Interacción en los surcos menor y mayor . . . . .	15
2.3. Electroforesis en gel . . . . .	17
2.4. Espectroscopía electrónica de UV-vis . . . . .	17
2.5. Casiopeínas como agentes antineoplásicos . . . . .	18
2.5.1. Relación cuantitativa de estructura-actividad (QSAR) . . . . .	19
2.5.2. Mecanismos de acción . . . . .	22
2.5.3. Estudios teóricos . . . . .	24
2.6. Hipótesis . . . . .	28
2.7. Objetivos . . . . .	29
<b>3. Metodología</b>	<b>30</b>
3.1. Síntesis y caracterización . . . . .	30
3.2. Tratamiento del plásmido . . . . .	31
3.3. Preparación del gel de agarosa . . . . .	32
3.4. Evaluación de la interacción de las casiopeínas con el ADN mediante electroforesis en gel . . . . .	32

3.5. Evaluación de la interacción de las casiopeínas con ADN mediante espectroscopía de UV-Vis . . . . .	33
<b>4. Resultados</b>	<b>34</b>
4.1. Síntesis y caracterización de casiopeínas . . . . .	34
4.2. Interacción de las casiopeínas con ADN mediante electroforesis en gel de agarosa . . . . .	36
4.2.1. Interacción de casiopeínas [Cu(bipi)(acac)]NO <sub>3</sub> con ADN . . . . .	36
4.2.2. Interacción de casiopeínas [Cu(fen)(acac)]NO <sub>3</sub> con ADN . . . . .	38
4.2.3. Interacción de casiopeínas [Cu(fen)(gly)]NO <sub>3</sub> con ADN . . . . .	42
4.3. Estudio del modo de interacción de las casiopeínas con ADN mediante espectroscopía de UV-Vis. . . . .	48
4.3.1. Interacción entre ADN y cisplatino . . . . .	49
4.3.2. Interacción entre ADN y bromuro de etidio . . . . .	51
4.3.3. Interacción entre ADN y netropsina . . . . .	52
4.3.4. Interacción entre ADN con casiopeínas . . . . .	54
<b>5. Discusión de resultados</b>	<b>67</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>71</b>
<b>7. Gráficas de los espectros de infrarrojo de las casiopeínas</b>	<b>82</b>
<b>8. Gráficas de los espectros de absorción electrónica en la región de UV-vis de la interacción de las casiopeínas con ADN</b>	<b>102</b>

# Abreviaturas

acac	acetilacetato
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosín trifosfato
CI50	Concentración inhibitoria 50
CRM	Cadena Respiratoria Mitocondrial
E1/2	Potencial de media onda
ERO	Especie reactiva de oxígeno
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
gly	glicinato
HCT-15	adenocarcinoma colon rectal
HeLa	adenocarcinoma de cérvix
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
MCF-7	adenocarcinoma mamario
MFA	Microscopía de Fuerza Atómica
mARN	ácido ribonucleico mensajero
mtADN	ácido desoxirribonucleico mitochondrial
N-N	diimina aromática
N-O	$\alpha$ -aminoacidato
OMS	Organización Mundial de la Salud
O-O	ligante bidentado donador de oxígeno
p.b	pares de bases
PDB	Banco de datos de proteínas
QSAR	Relación estructura-actividad biológica
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SiHa	carcinoma de células escamosas de cérvix
SOD	superóxidodismutasa

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Cáncer

Cáncer es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades relacionadas en las que se observa un proceso descontrolado en la división de las células del cuerpo. En todos los tipos de cáncer, algunas de las células del cuerpo comienzan a dividirse sin detenerse y estos pueden diseminarse a tejidos cercanos y pueden formar masas que se llaman tumores. [1].

Muchos tipos de cáncer forman tumores sólidos, los cuales son masas de tejido. Los cánceres de la sangre, como las leucemias, en general no forman tumores sólidos. Existen tumores que se pueden extender a los tejidos cercanos o los pueden invadir. Además, al crecer estos tumores, algunas células cancerosas pueden desprenderse y moverse a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y formar nuevos tumores lejos del tumor original. [1].

#### 1.1.1. Estadística de la incidencia del cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muertes a nivel mundial (figura 1.1). En 2012, las enfermedades no transmisibles causaron más de 68 % de las muertes en el mundo, lo que representa un aumento por comparación con el 60 % registrado en el año 2000. Las cuatro entidades nosológicas principales de este grupo son las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y las neumopatías crónicas. Las enfermedades transmisibles, maternas, perinatales y relacionadas con la nutrición causaron en conjunto un 23 % de las muertes en el mundo, y los traumatismos, un 9 % [3].

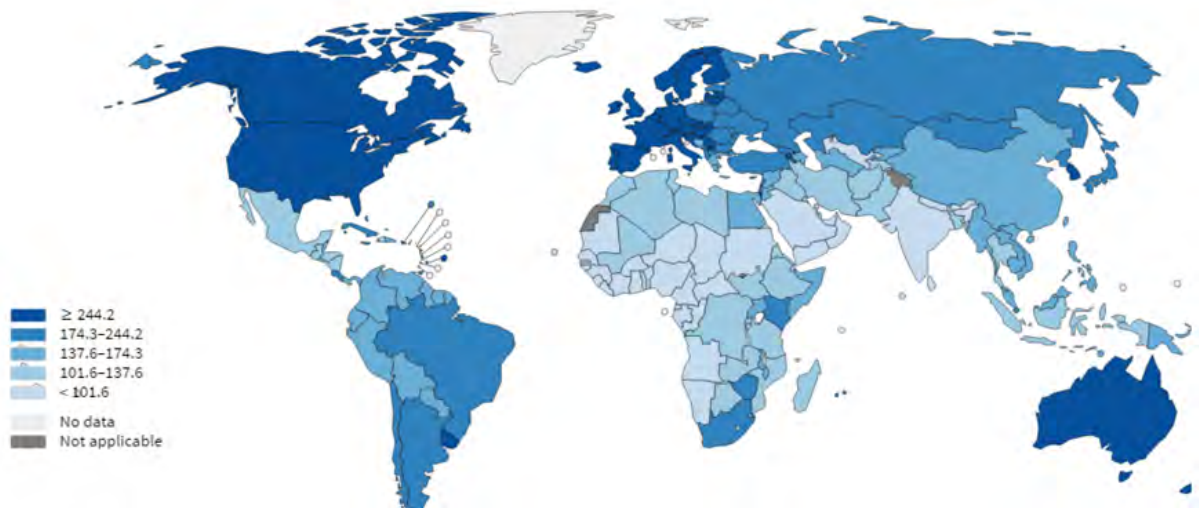


Figura 1.1: Estimado de la incidencia de cáncer a nivel mundial en el 2012 (tasa por 100 000) [2].

En la figura 1.2, se muestra la incidencia y mortalidad causada por distintos tipos de cáncer, tanto en hombres como en mujeres, a nivel mundial reportado en 2012. Se puede observar que los cánceres que se presentan con mayor incidencia son el de pecho, próstata, pulmón, colon rectal, cérvico uterino y estómago.

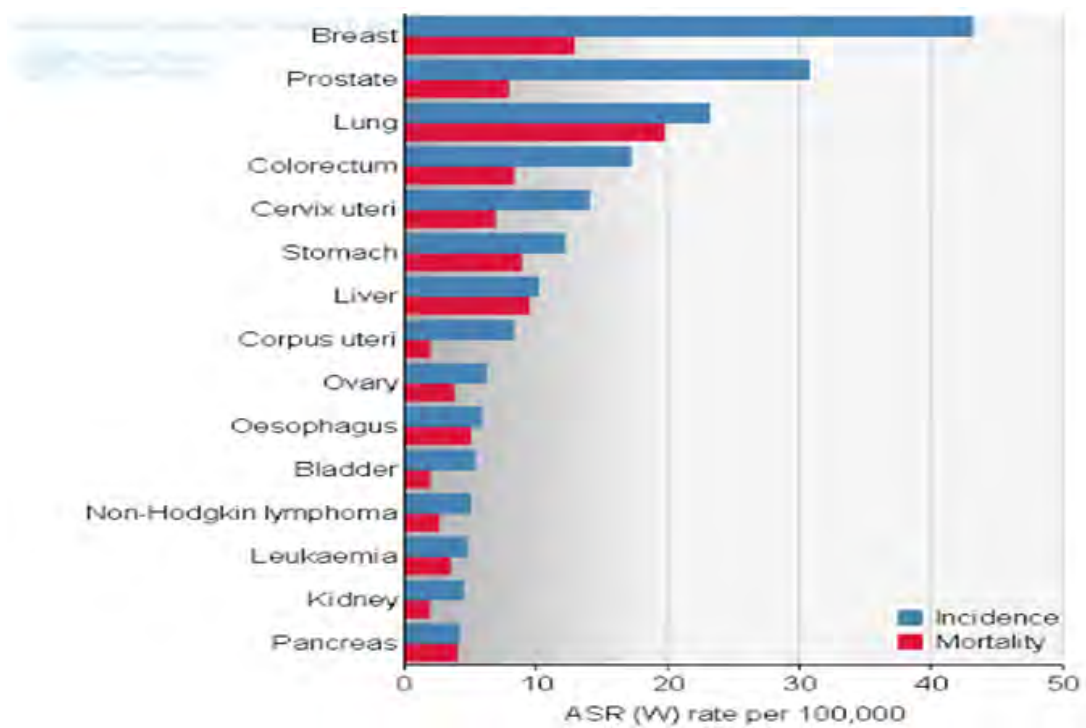


Figura 1.2: Estimado de la incidencia y mortalidad de cáncer a nivel mundial [4].

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó datos de la mortalidad en México en 2015, donde el panorama es similar a las estadísticas presentadas a nivel mundial. En México el cáncer, es la tercera causa de mortalidad tanto en hombres como en mujeres, presentándose en ese año un total de 79,514 muertes por esta enfermedad, del cual, un 48.92 % fue por cáncer de próstata, tráquea, bronquios y pulmón esto en hombres y un 51.08 % de muertes a causa de cáncer de mama, cuello de útero, hígado y vías biliares intrahepática en las mujeres [5].

### 1.1.2. Tratamientos contra el cáncer

Expuesto lo anterior, y en busca de prevenir y combatir esta patología se han desarrollado distintas metodologías para el tratamiento del cáncer, entre las más utilizadas se encuentran: la radioterapia, cirugía y la quimioterapia. Estos tratamientos pueden emplearse de manera independiente o pueden combinarse según el tipo de cáncer (localización del tumor) o según la carcinogénesis (desarrollo del tumor). A continuación se describe de manera breve cada tratamiento mencionado.

**CIRUGÍA:** es la forma más antigua de tratamiento de cáncer y de la más exitosa en el tratamiento de tumores sólidos, no debe existir metástasis, esto para lograr retirar por completo o en mayor parte el tumor del paciente, aumentando un buen margen de seguridad alrededor del tumor [6].

**RADIOTERAPIA:** este tratamiento hace uso de radiación ionizante (en general, lo más utilizado son fotones de alta energía como rayos X o protones). Se trata de dar dosis altas de estas radiaciones a células cancerosas y evitar que se propaguen. En la actualidad se ha comenzado a implementar una fuente de protones, ya que estos pueden liberar toda su energía en un espacio de tiempo muy concreto con lo que se puede reducir el daño a células sanas [6].

**QUIMIOTERAPIA:** es la administración de medicamentos para el tratamiento de una enfermedad. Por lo general, para el cáncer se utilizan fármacos que puedan ser citotóxicos, citostáticos y antineoplásicos [7, 8]; lo anterior, con el fin de matar, detener o disminuir el crecimiento acelerado de células anormales, con el objetivo de curar o tratar el cáncer, aunque la selección de este tratamiento y de los medicamentos depende de la carcinogénesis del tumor.

### 1.1.3. Quimioterapia

Debido a los resultados obtenidos con la quimioterapia, este es uno de los tratamientos más utilizados hoy en día contra el cáncer [8]; sin embargo, muchos de los fármacos, presentan efectos adversos; por lo que de forma paralela, ha aumentado la búsqueda, diseño y generación de moléculas que sirvan para el tratamiento de estas patologías, de manera que se aumente la actividad biológica de estos frente al cáncer y disminuir sus efectos tóxicos.

Los quimioterapéuticos se pueden clasificar en varias categorías que puede ser: en función de su mecanismo de acción, su estructura química, su sitio de acción o por cómo afectan a las células malignas [7,9,10]. En 2003, un grupo de investigadores propusieron una clasificación según la diana terapéutica donde el fármaco va a ejercer su función [11]; por su lado, otro grupo en 2006, proponen una clasificación basado en mecanismos biológicos celulares [12].

En cuanto a su clasificación por estructuras químicas, ésta puede ser en: compuestos orgánicos e inorgánicos.

#### 1.1.3.1. Compuestos Orgánicos

Los primeros fármacos aplicados para el tratamiento de esta enfermedad fueron compuestos orgánicos, tal como la actinomicina D y la daunorrubicina (figura 1.3). La actinomicina D, fue el primer antibiótico descubierto en 1940 con propiedades anticancerígenas frente a sarcomas, tumores de Wilms, cáncer de células germinales y melanomas. La daunorrubicina, fue el primer antibiótico de familia de las antraciclinas, que fue aislada de la especie *Streptomyces* (1950) y se encontró que eran activos contra el cáncer tales como neuroblastomas y leucemia mieloide (aguda y crónica). La aparición de esos compuestos y en búsqueda de su modo de acción, condujo además a la aparición de varios antibióticos antraciclínicos tales como doxorrubicina, idarubicina y pirarubicina (figura 1.3); a los cuales se les realizaron estudios para elucidar su mecanismo de acción y se propuso que estas acridinas y antraciclinas tenían interacción con ácidos nucleicos [13]. Sin embargo estos fármacos son altamente tóxicos y provocan daño al material genético, ya que no son selectivas.



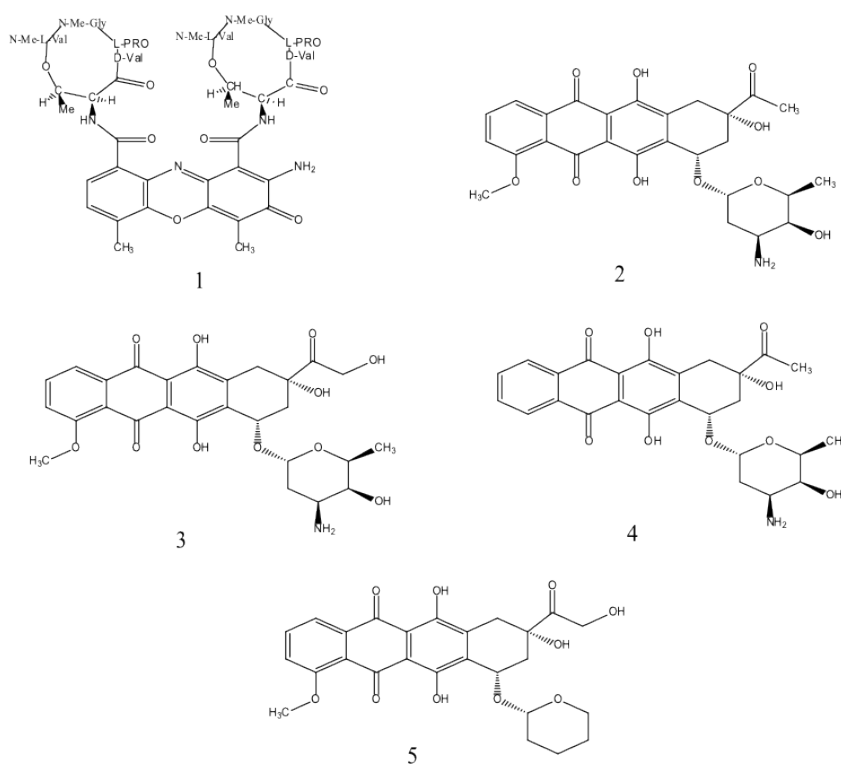


Figura 1.3: Estructura de los compuestos orgánicos, 1) actinomicina D, 2) daunorrubicina, 3) doxorubicina, 4) idarrubicina y 5) pirarubicina.

### 1.1.3.2. Compuestos Inorgánicos

El uso de compuestos inorgánicos para el tratamiento del cáncer ha mostrado ser otra buena alternativa. En 1965 Barnett Rosenberg [14] estudió los efectos sobre la aplicación de corriente eléctrica en cultivos bacterianos; observaron que se producía una inhibición en el crecimiento de un cultivo de *Escherichia Coli* pero este no era debido a la corriente eléctrica aplicada sino a un compuesto de platino disuelto que se generaba *in situ* en el medio de cultivo, que fue identificado como Cis-platino (cis-diclorodiamminoplatinoII), el cual ha mostrado ser efectivo en el tratamiento contra cáncer avanzado de colon [15], pulmón [16], ovario y de testículos [17], por lo que el platino es el primer elemento metálico cuyo complejo se convirtió en el primer compuesto inorgánico de uso clínico frente a esta enfermedad. Es por lo anterior, que se ha realizado la búsqueda de nuevos compuestos que contengan en su estructura metales como átomo central. De este modo se han sintetizado varios compuestos inorgánicos; dentro de los que se encuentran compuestos que incluyen metales tales como: Ga, Sn, Ti, Fe, Cu, Zn, Ru, Pd, Pt y Au.

Estudios *in vivo* e *in vitro* de compuestos inorgánicos han mostrado que éstos, son efectivos para su uso como quimioterapéuticos, por lo que actualmente algunos se en-

cuentran en fase clínica, como por ejemplo; malonato de galio (III), titanoceno, NAMI-A (figura 1.4). El malonato de Galio (III) fue el primer compuesto de galio que entro en fase clínica, éste se administra de forma oral y ha mostrado actividad en cáncer de próstata, mieloma, linfoma, cáncer de vejiga además de que contribuye considerablemente a la reducción de la degradación de los huesos en la artritis reumatoide. El titanoceno, es un compuesto que contiene titanio como átomo central, cuenta con dos cloruros en posición cis-, es una molécula neutra, y es un agente antineoplásico. Se encuentra en fase clínica 1, además no presenta nefrotoxicidad ni mielotoxicidad. El tercero, es un compuesto de rutenio (III) que presenta actividad contra metástasis de pulmón en tumores sólidos pero es ineficaz en la reducción de tumores primarios [15].

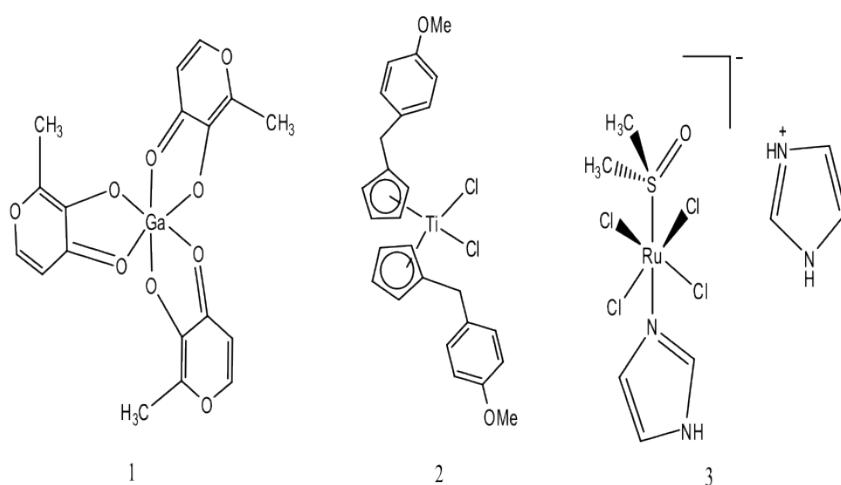


Figura 1.4: Estructura de los compuestos inorgánicos, 1) malonato de galio (III), 2) titanoceno, 3) NAMI-A.

Como se mencionó con anterioridad, el cisplatino es de los compuestos más usados en clínica. Sin embargo, pese a su alta efectividad frente a diversos tumores, se sabe que también causa daño a células normales, lo que conlleva a efectos adversos en el organismo como mielosupresión, nefrotoxicidad, neuropatías periféricas y ototoxicidad [9]. Pese a lo anterior, el cisplatino abrió un nuevo comienzo para el diseño de fármacos antitumorales basados en compuestos inorgánicos; lo que comenzó con la búsqueda de análogos del cisplatino para mejorar las propiedades de éste y disminuir los efectos adversos. Como consecuencia surgió la segunda generación con el carboplatino que presenta una menor toxicidad y que estructuralmente intercambiaron los dos ligantes cloruros en posición cis por un ligante bidentado dicarboxílico (figura 1.5) y una tercera generación con nedaplatino, oxaliplatino, lobaplatino y heptaplatino que ya fueron aprobados para uso clínico en Japón, Francia, China y Corea del sur, respectivamente.

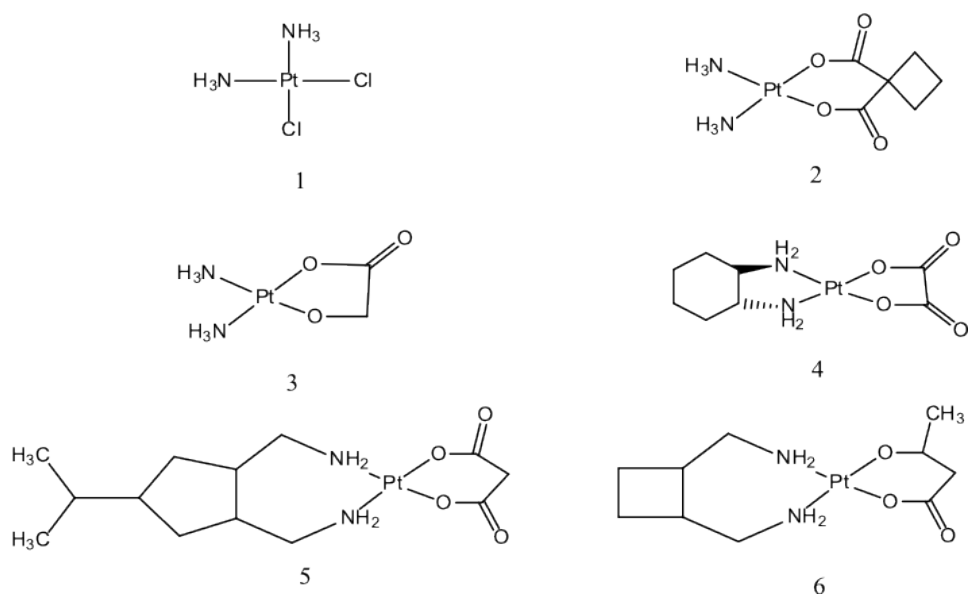


Figura 1.5: Estructura de análogos del cisplatino, 1) cisplatino, 2) carboplatino, 3) nedaplatino, 4) oxaliplatino, 5) lobaplatino, 6) heptaplatino.

### 1.1.3.2.1. Mecanismo de acción del cisplatino

Después del descubrimiento de las propiedades anticancerígenas que presentaba el cisplatino, varias investigaciones fueron surgiendo para encontrar el mecanismo de acción que enciende este efecto. El cisplatino es administrado por vía intravenosa. El compuesto neutro se difunde a través de la membrana celular, la concentración más baja de cloruro dentro de la célula ( $\sim 2\text{-}30$  mM) conduce a la formación de complejos mono- o diaqua-diaminoplatino (II) (figura 1.6); estas especies reaccionan fácilmente con el ADN, ARN y proteínas [18]. No obstante, se ha definido que el ADN es el blanco biológico del cisplatino en las células [19, 20].

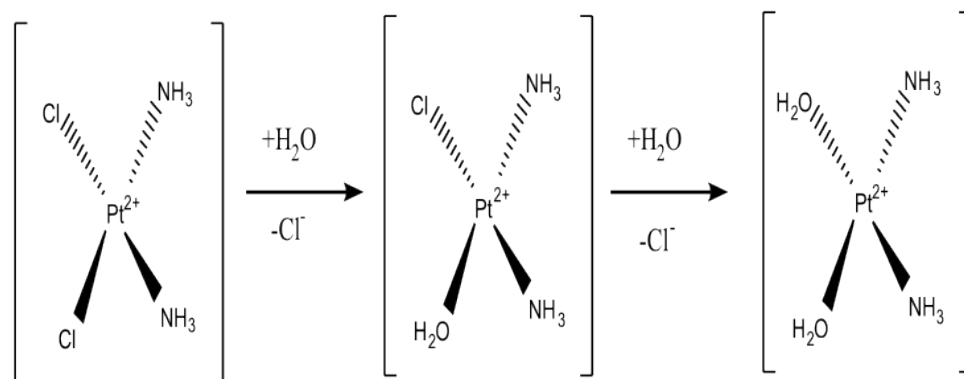


Figura 1.6: Sustitución de los ligantes cloruros por moléculas de agua en el cisplatino.

Las moléculas de cisplatino mono- o di-sustituidas por moléculas de agua pueden ser sustituidas por nucleófilos más fuertes como N-donadores, que están presentes en las bases púricas y pirimidínicas del ADN. El platino entonces, se une covalentemente al átomo de Nitrógeno 7 de los nucleótidos, en especial, al N7 de la guanina [21]. Mencionado lo anterior, se investigaron detalles de las interacciones de unión para caracterizar los tipos de aductos Cisplatino-ADN, dentro de los que se presentan 5 tipos de unión que pueden ser: aductos bifuncionales que implican entrecruzamiento intra- o inter-cadenas, aductos monofuncionales y entrecruzamientos de proteína-ADN (figura 1.7). Los principales aductos fueron los enlaces cruzados 1,2-intracadena que implican bases adyacentes, con  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{d}(\text{GpG})]$  (cis-GG) que comprende 47-50 % de los aductos formados y  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{d}(\text{ApG})]$  (cis-AG) que comprende otro 23-28 % [22]. Estos aductos han sido estudiados por varias técnicas bioquímicas y biofísicas como: electroforesis en gel [23], microscopía de fuerza atómica [24, 25], RMN [26] y cristalografía de rayos X [27].

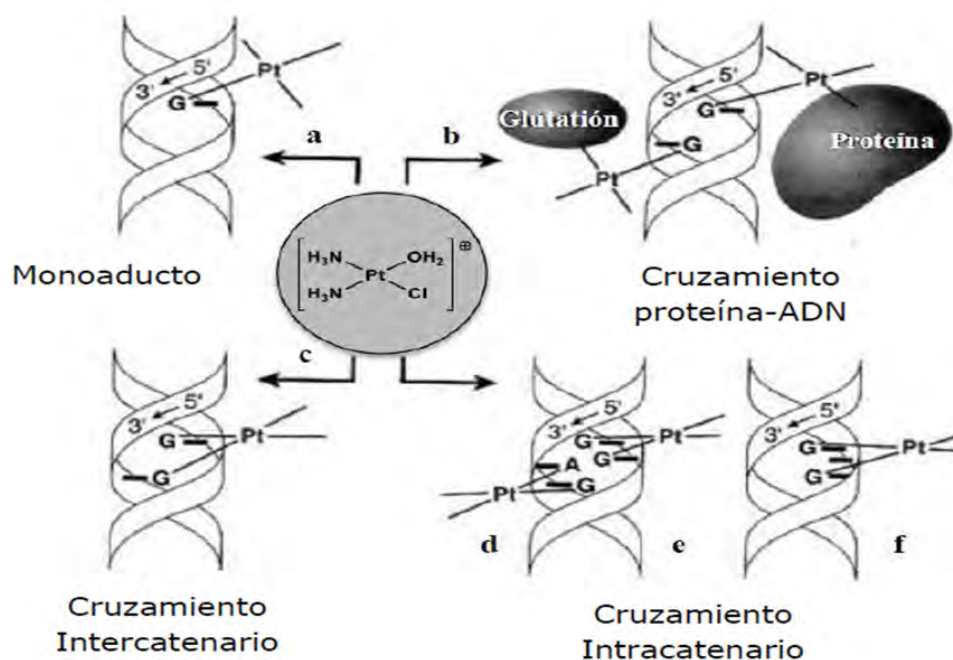


Figura 1.7: Representación de los modos de unión del cisplatino con el ADN.

### 1.1.3.3. Compuestos de cobre con actividad antitumoral

A pesar del gran éxito del cisplatino en la clínica, los efectos adversos que produce y la resistencia tumoral intrínseca o adquirida, limitan el uso del fármaco; esto ha conducido al diseño de nuevos y más eficaces medicamentos de platino e incluso una amplia gama de familias de compuestos que contienen dentro de su estructura átomos metálicos, que pretenden mejorar la terapia actual.

En razón a lo expuesto, la estructura del cisplatino se ha tomado como modelo para generar nuevos compuesto de coordinación que contengan metales esenciales, ya que por sí mismos, son necesarios para el buen funcionamiento del metabolismo de los seres vivos. Los metales más utilizados en el diseño de nuevos compuestos de coordinación son por ejemplo: hierro, cobalto, níquel, zinc, paladio, oro, rutenio, cobre entre otros [28].

El diseño y desarrollo de compuestos de coordinación de cobre (II), surgieron de implementar un metal esencial dada su presencia en el organismo y ligantes que pudieran modificar las propiedades redox del metal. Estos compuestos están registrados y patentados bajo el nombre de Casiopeínas<sup>®</sup> [29–31]. Estos compuestos tienen una actividad antineoplásica, que las han colocado como una nueva alternativa para ser utilizado como agentes quimioterapéuticos. La casiopeína III-ia [Cu(4,4'-bipiridina)(1,10-fenantrolina)]NO<sub>3</sub> se encuentra en fase clínica I en México.

Las casiopeínas<sup>®</sup> son los compuestos de coordinación más representativos de cobre con potencial antitumoral [32], ya que han mostrado actividad biológica sobre una gran cantidad de tumores tanto in vitro, así como in vivo [33]. La fórmula general de estos compuestos de coordinación puede ser [Cu(N-N)(N-O)]NO<sub>3</sub> o [Cu(N-N)(O-O)]NO<sub>3</sub>, donde N-N corresponde a bipyridinas o fenantrolinas sustituidas; N-O corresponde a  $\alpha$ -aminoacidato o péptidos, mientras que O-O corresponde a acetilacetato o salicilaldehidato (figura 1.8). El primer ligante, lo componen moléculas diminas que son donadores de nitrógeno (N-N) que pueden presentar diferentes sustituyentes; y un segundo ligante como aminoácidos (N-O) lo que hace que tengan una baja toxicidad o donadores de oxígeno (O-O) que tienen afinidad por el cobre.

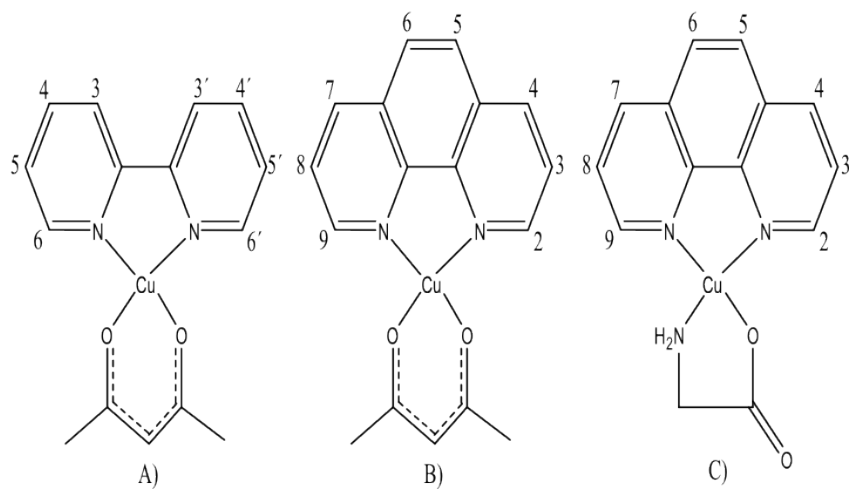


Figura 1.8: Estructuras de la familia de casiopeínas. A) Cu[(2,2'-bipiridina)(acetilacetionato)]NO<sub>3</sub>, B) Cu[(1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]NO<sub>3</sub> y C) Cu[(1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub>.

# Capítulo 2

## Antecedentes

La mayoría de los fármacos aludidos con anterioridad contienen blancos terapéuticos específicos que les otorga la actividad antitumoral. En general, los quimioterapéuticos actúan a nivel de ADN en las células tumorales, mientras que los anticuerpos monoclonales y las pequeñas moléculas interactúan con las proteínas, ya sea en las células tumorales o en otros elementos. Los oligonucleótidos antisentido son los principales fármacos dirigidos contra el mRNA [11].

### 2.1. Diseño racional de fármacos

El diseño racional de fármacos es una herramienta útil en el desarrollo actual de nuevos medicamentos, contribuyendo a un aumento de las posibilidades de éxito y reduciendo costos. Sin embargo, uno de los aspectos importantes en el diseño de nuevos fármacos es buscar un compuesto efectivo que además pueda tener selectividad contra las células cancerígenas y así minimizar los efectos tóxicos en el paciente.

Muchos fármacos ejercen su acción debido a su interacción con una macromolécula presente en el organismo [11]. En el diseño racional de fármacos, una de las estrategias utilizadas es conocer el sitio de acción (biomolécula con la que interactúa un ligando), debido a que la estructura tridimensional de muchas macromoléculas se conocen experimentalmente [34, 35]. Así, conociendo la diana terapéutica o la base biológica de una enfermedad es posible el diseño de una molécula, utilizando un mecanismo de aproximación al proceso patológico, ya que, con esto podemos definir las características que requiere tener la molécula nueva para que pueda interactuar con el sitio de acción de la biomolécula responsable, de tal forma que modifique y se modifique así mismo la patología [36].

El diseño y síntesis de diversos compuestos de coordinación que contienen metales en su estructura, y que son utilizados como agentes quimioterapéuticos, abrió camino hacia una nueva investigación acerca de la interacción de moléculas pequeñas con el ADN, estos estudios condujeron a la búsqueda de los posibles modos de interacción de moléculas nuevas con ADN.

## 2.2. Modos de interacción de fármacos con ADN

Se ha visto que el ADN es un blanco vulnerable para la acción de los fármacos citotóxicos destinados a bloquear la multiplicación de células cancerosas; por lo que se han realizado diversos estudios con el fin de conocer la interacción entre el fármaco y el ADN.

Los fármacos pueden interactuar con el ADN de varias formas, pueden ser intercalantes, formar enlaces covalentes, interactuar con los surcos o romper la propia hélice, este último puede interferir con proteínas relacionadas con el ADN o modificando la expresión de genes específicos (figura 2.1). La mayoría de los agentes anticancerígenos actúan con uno de estos mecanismos de acción.

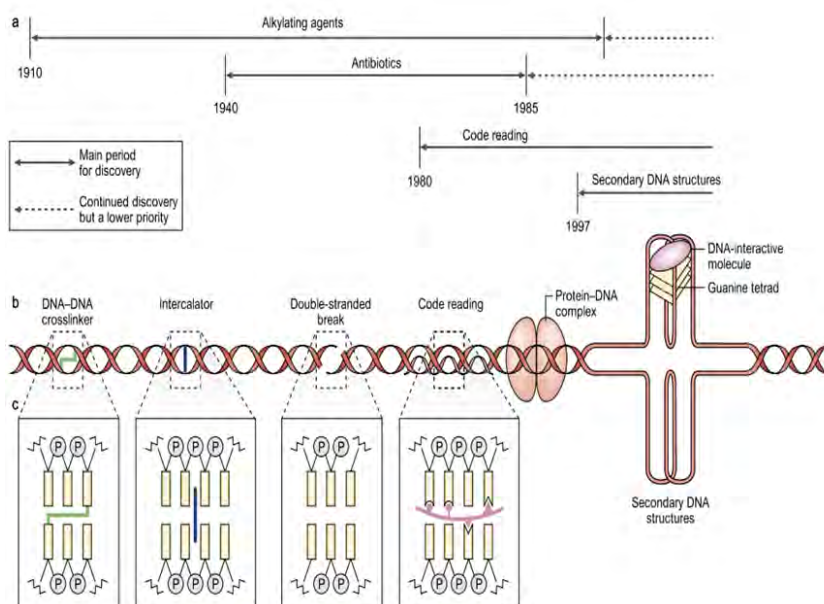


Figura 2.1: Clases de agentes que pueden interactuar con ADN y sus interacciones moleculares con ADN. [37]



### 2.2.1. Interacciones covalentes con la doble hélice del ADN

Las interacciones covalentes se dan por a alquilación del ADN. Un agente alquilante une grupos alquilo a las bases que compone el ADN, usualmente estos reaccionan con el N-7 de guanina y N-3 de adenina. Por lo tanto, el emparejamiento de bases del ADN es inhibido y esto lleva a la codificación errónea del ADN.

Esa interacción también resulta en la alteración del ADN y conlleva a la fragmentación mediante enzimas de reparación, en sus intentos de reemplazar las bases alquiladas. También, los alquilantes pueden formar enlaces cruzados con distintas hebras del ADN lo que provoca una reticulación y esta a su vez, evita que el ADN se separe para su síntesis o transcripción. Se puede provocar el emparejamiento erróneo de los nucleótidos que conducen a mutaciones. Ejemplos de estos alquilantes son las  $\beta$ -haloalquilaminas (mostazas nitrogenadas) y el cisplatino [38].

### 2.2.2. Interacciones no covalente con la doble hélice del ADN

El interés por comprender cómo interactúan moléculas o fármacos con el ADN, se ha convertido en un área de investigación muy activa y una característica importante en la farmacología, ya que tienen un rol importante en la optimización del diseño de moléculas o fármacos más eficientes y más específicos hacia las células que se quieren tratar; además, con menores efectos secundarios. Esta interacción al mismo tiempo de tener importancia en la actividad terapéutica, tiene también consecuencias sobre la toxicidad y la genotoxicidad de los compuestos.

#### 2.2.2.1. Intercalación clásica

La intercalación de moléculas pequeñas en la hélice del ADN se refiere, a la inserción de la parte cromófora de una molécula que se apila entre las pares de bases adyacentes del ADN. Este concepto fue expuesto primero por Lerman en 1961 para explicar la unión de aminoacridinas al ADN. Su estudio radicó en analizar los cambios del coeficiente de sedimentación (disminución) y cambios en la viscosidad (aumento). Además, observó que el ADN al ser expuesto con colorantes como acridina, proflavina o naranja de acridina, dan como resultado un alargamiento de la cadena de ADN [39].

Numerosos estudios físicos y químicos han proporcionado información confiable sobre los requerimientos estructurales que debe contener una molécula para que pueda intercalarse. Una característica que se destaca es, poseer una parte planar que cubra una superficie mínima de 28 Å (ligantes que tienen de 3 a 4 anillos). En la intercalación se observan principalmente, interacciones electrostáticas, de Van der Waals y fuerzas hidrofóbicas entre la molécula intercalada y el ADN [40].

Entre los criterios aceptados para proponer que se lleva a cabo la intercalación, son los siguientes [41]:

- La doble hélice del ADN se alarga debido a que el fármaco se inserta entre las pares de bases que conforman a la molécula de ADN. Esta extensión se ha corroborado mediante microscopias electrónicas y de fuerza atómica [24, 41, 42].
- La interacción del fármaco con el ADN conduce al desenrollamiento local de la doble cadena. Se ha visto que a medida de que aumente la unión del fármaco intercalante, la forma superenrollada negativa (giro a la derecha) comienza a perderse, hasta llegar a una forma circular natural que luego comienza a enrollarse nuevamente pero hacia el lado contrario (superenrollado positivo), figura 2.2. Este comportamiento es posible evaluarlo siguiendo los cambios en el coeficiente de sedimentación [43], viscosidad o movilidad en geles [43–48].
- La parte cromófora aromática del fármaco debe ser paralela a las pares de bases, (aparentemente más o menos perpendiculares al eje de la hélice), estos estudios pueden ser medidos mediante dicroísmo circular. [49].

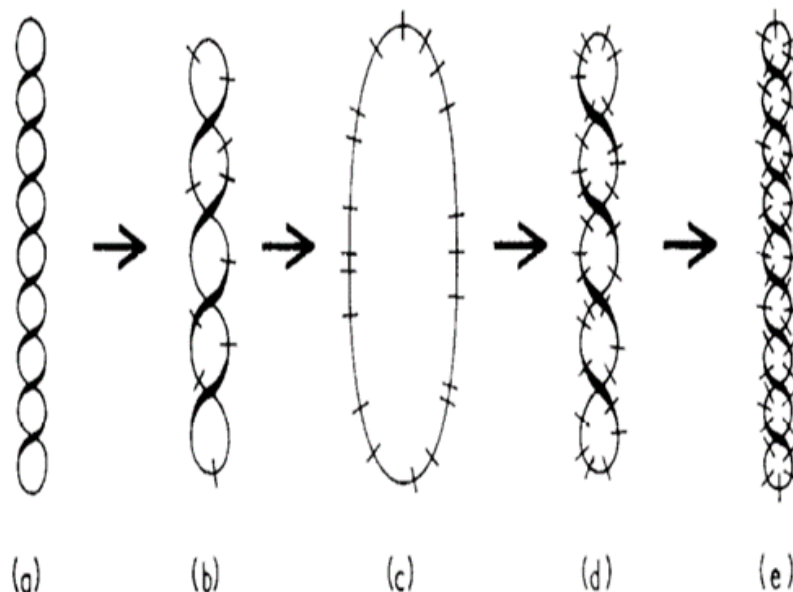


Figura 2.2: Representación de la eliminación de la tensión, saturación y regreso a la forma superenrollada del ADN. (a) ADN superenrollado, (b) las moléculas o fármacos son insertados aleatoriamente entre las pares de bases conduciendo a un desenrollamiento parcial, (c) ADN circular debido al desenrollamiento total de la cadena, (d) y (e) regreso hacia la forma superenrollada opuesta (positivo). [43]

Los intercaladores generalmente causan una distorsión más significativa de las conformaciones naturales del ADN, un factor que contribuye a la disrupción de la unión a proteínas. Otras consecuencias de este tipo de interacciones son la inhibición de enzimas, como la ADN polimerasa, RNA polimerasa y nucleasas, dando como resultado la inhibición de la replicación. De igual forma, se puede presentar mutagenicidad y daño al ADN como rupturas en las cadenas [50].

#### 2.2.2.2. Interacción en los surcos menor y mayor

La principal diferencia entre el surco menor y el surco mayor, es el promedio del ancho de cada surco, con un valor de 6.0 y 11.6 Å respectivamente (figura 2.3). Debido a esta diferencia dimensional, los surcos son los principales sitios para la unión de muchas proteínas que interactúan con el ADN. Este tipo de interacción se da principalmente entre moléculas que tienen una parte planar aromática y una parte no aromática (cadena lateral) [51].

El mecanismo de unión se puede dividir en al menos dos partes. Primero, el agente de unión al surco sufre una transferencia hidrófoba desde el medio hasta el surco menor del

ADN de doble cadena. Si el aglutinante del surco está cargado positivamente, este evento será acompañado por la liberación de contraiones condensados que rodean al ADN. Una vez en el surco menor, pueden comenzar a formar interacciones moleculares específicas, electrostáticas, atracción de Van der Waals y formación de enlaces de hidrógeno [52]

La formación de cualquier complejo bimolecular contiene una contribución de energía libre desfavorable que resulta de la pérdida de grados de libertad de rotación y de traslación, ya que dos reactantes forman un único complejo. Se espera que la contribución favorable del proceso de transferencia hidrofóbica a la energía libre sea grande y pueda equilibrar en gran medida la pérdida entrópica. Contribuciones favorables más pequeñas, provienen de la contribución del polielectrolito, que surge de la liberación del contraión y de la formación de las diversas interacciones moleculares no covalentes [52].

Se han realizado estudios para comprender la interacción de moléculas neutras y cargadas positivamente con los surcos. Se ha visto que estas moléculas son específicas a algunas secuencias como es el caso de la netropsina y la distamicina, que presentan preferencia por los pares de bases adenina-timina. Por otra parte, la unión al surco menor suele implicar mayor afinidad de unión y mayor especificidad de secuencias que la unión de un intercalador [52, 53].

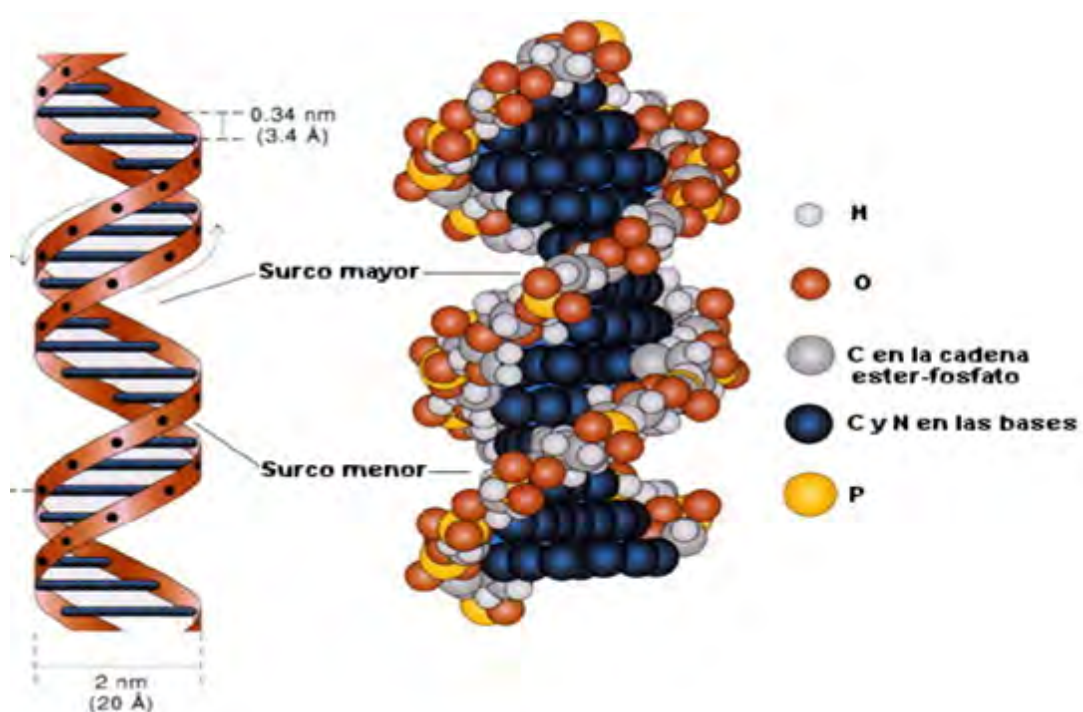


Figura 2.3: Imagen del surco menor y mayor del ADN.

Los agentes antitumorales que se dirigen al ADN, son algunos de los agentes más eficaces en el uso clínico y han producido aumentos significativos en la supervivencia de pacientes con cáncer cuando se usan en combinación con fármacos que actúan mediante diferentes mecanismos de acción. En consecuencia, se ha dedicado mucho esfuerzo a encontrar agentes que sean más selectivos. Es por eso que diversos estudios se centran en la identificación de blancos moleculares específicos para el cáncer, con el fin de producir una nueva generación de nuevas moléculas para terapias menos tóxicas.

Dentro de las técnicas utilizadas para estudiar la intercalación o interacción en los surcos de moléculas o fármacos con ADN son: electroforesis y espectroscopía UV-vis.

### **2.3. Electroforesis en gel**

Es un método utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Se lleva a cabo debido a la migración de partículas cargadas a través de un campo eléctrico fijo, la migración depende tanto de la carga, como del tamaño de la partícula que se emplea. La carga negativa del ADN y el ARN puede ser sometida a un campo eléctrico, lo que hará que estos se muevan en dirección al ánodo. Si se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero, como la agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más rápido en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño y de sus isoformas. Una disminución de la forma superenrollada que conduzca al aumento de la forma circular, es indicador de una interacción de tipo intercalativa entre el ADN y moléculas pequeñas [38–42].

### **2.4. Espectroscopía electrónica de UV-vis**

La espectroscopia de absorción UV-visible es una técnica empleada para detectar la interacción de moléculas pequeñas con ADN. Dicha interacción y la estabilidad del ADN se estudia analizando los cambios en las medidas de los máximos de absorción UV-visible de la molécula, fármaco o de las moléculas de ADN. Se ha asumido que la magnitud de estos desplazamientos podría interpretarse como un indicador de la fuerza de interacción entre la estructura del ADN y moléculas o fármacos [54, 55].

Dos características principales de los espectros del ADN son los efectos "hipercrómico y efecto hipocrómico" que surgen debido a un cambio en su estructura de la doble hélice [56]. Cualquier cambio en la conformación y estructura del ADN que ocurre por la unión de una molécula pequeña o fármaco se traduce en cambios en su comportamiento espectral. En la interacción con pequeñas moléculas, cualquier desestabilización de la estructura del ADN conduce al hipercromismo, mientras que el hipocromismo se origina de la estabilización de la estructura secundaria del ADN ya sea por efectos electrostáticos o la intercalación de pequeñas moléculas [57, 58].

En general, los espectros de absorción de las moléculas pequeñas muestran un efecto hipocrómico (disminución de la absorbancia) sobre la intercalación en la doble hélice de ADN, debido a que el modo intercalativo implica una interacción de apilamiento entre el cromóforo aromático de una molécula y el par de bases de ADN [58]. En el caso de moléculas que puedan estarse uniendo al surco, o a la superficie externa del ADN, se observa normalmente un efecto hipercromico, ya que, refleja los cambios correspondientes del ADN en su conformación y estructura después de que se produce la interacción complejo-ADN. El efecto hipercrómico es entonces, el aumento de la absorbancia del ADN tras la desnaturalización. Además, el efecto hipercrómico surge principalmente debido a la presencia de cationes cargados que se unen al ADN por atracción electrostática al grupo fosfato del esqueleto del ADN y causando así una contracción y daño global a la estructura secundaria del ADN [59].

## 2.5. Casiopeínas como agentes antineoplásicos

Las Casiopeínas<sup>®</sup> fueron diseñadas tomando en cuenta diferentes factores que pueden incrementar su actividad y disminuir su toxicidad. El cobre por su parte, tiene un mecanismo de eliminación natural, lo que lo hace un metal candidato a presentar una menor toxicidad; una característica más del cobre es que puede presentar el estado de oxidación 2+ y 1+ permitiéndole ser partícipes en reacciones redox tipo Fenton, que conduzca una generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), los cuales, inducen apoptosis provocando a su vez la peroxidación lipídica de la membrana celular, que a su vez disminuye la fluidez de la membrana e inactiva el enlace entre las enzimas estructurales y la membrana, ocasionando la pérdida de la integridad celular [60]. De forma paralela, los ligantes coordinados a cobre, modulan las propiedades redox del metal; presentan diferentes grados de hidrofobicidad y sus anillos aromáticos fusionados les permiten tener interacciones de intercalación con el ADN [61, 62].

Se han realizado estudios de la interacción del ADN con compuestos de coordinación que contienen fenantrolina como ligante. En 1992 J. K. Barton y colaboradores, reportaron que para el compuesto bis (9,10-diiminafenantroquinona)(2,2'-bipiridil) de rodio (III), se observó una intercalación con el ADN, esto mediante microscopía de efecto túnel (STM, por sus siglas en inglés), dicha propuesta de intercalación fue debido a que se presentó un aumento y hubo cambios de ángulos de la doble hélice de los oligonucleótidos implementados [62]. En 1997, este mismo grupo reportó compuestos de rutenio y rodio con fenantrolina, y propusieron que se llevaba a cabo una intercalación, esto debido a que mediante espectroscopía UV-visible, se observó una disminución y un desplazamiento en la banda de absorción, debida a la transferencia de carga metal-ligante en el espectro electrónico en la región ultravioleta (efecto hipocrómico), que es un comportamiento característico de la intercalación [63].

Los ligantes, sustituyentes y el cobre como centro metálico, hacen que las Casiopeínas sean citotóxicas [64], la cual puede estar relacionada con la actividad antitumoral [65,66]. La actividad que presentan las casiopeínas pueden estar mediadas por varios mecanismos; como: toxicidad mitocondrial [67], generación de ROS [68] e interacción directa con el ADN a través de la intercalación [68,69].

### 2.5.1. Relación cuantitativa de estructura-actividad (QSAR)

Se han sintetizado más de 100 casiopeínas las cuales fueron agrupadas en diez familias debido a la gran cantidad de variantes estructurales que se pueden generar, ya que los ligantes diiminas pueden presentar distintos sustituyentes, así mismo, el cambio en el ligante secundario, lo que en conjunto genera una amplia gama de posibilidades estructurales para este modelo de compuestos, quienes presentaran diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas. Pueden presentar diferentes geometrías siendo la cuadrada plana ó pirámide de base cuadrada distorsionada las más comunes, ésta última, dada la presencia de una molécula de disolvente en posición apical; sin embargo, también pueden presentar geometría octaédrica distorsionada como la casiopeína II-Gly ( $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$ ) (figura 2.4) que tiene las posiciones axiales ocupadas por una molécula de disolvente (usualmente agua) y por el ión nitrato [70].



Figura 2.4: Estructura cristalina de Casiopeína II-gly  $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10\text{-fenantrolina)}(\text{glicinato})]\text{NO}_3$ . [70]

Bravo-Gómez realizó un estudio cuantitativo de la relación estructura actividad biológica de un conjunto de 21 casiopeínas (tabla 2.1), seleccionadas de forma que se mantuviera constante la mayor parte de la estructura  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$ , esta serie presenta un ligante secundario simétrico, por lo cual no existe la posibilidad de isómeros estructurales. Estos compuestos incluyen la 2,2'-bipiridina o 1,10-fenantrolina como ligantes primarios lo que les permitió evaluar la influencia tanto de los sustituyentes como del tipo de imina. El segundo grupo de compuestos  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{gly})]\text{NO}_3$ , comparten la fenantrolina como primer ligante y glicinato como ligante secundario para analizar la influencia que tiene el cambio de ligante secundario.



Tabla 2.1: Casiopeínas estudiadas para generar el QSAR.

No. Grupo bipyridina	Clave del compuesto	Sustituyentes	Ligante secundario
1	CasIII-Da	H	Acetilacetato
2	CasIII-ia	4,4'-dimetil	Acetilacetato
<b>Grupo fenantrolina</b>			
3	CasIII-Ba	H	Acetilacetato
4	Cas-4a-Mea	4-metil	Acetilacetato
5	Cas-5a-Mea	5-metil	Acetilacetato
6	CasIII-Ea	4,7-dimetil	Acetilacetato
7	CasIII-La	5,6-dimetil	Acetilacetato
8	CasIII-Ma	3,4,7,8-tetrametil	Acetilacetato
9	Cas-5-Fenil	5-fenil	Acetilacetato
10	CasIII-Ha	4,7-difenil	Acetilacetato
11	CasIII-5a-Cl	5-cloro	Acetilacetato
12	CasIII-5a-NO <sub>2</sub> a	5-Nitro	Acetilacetato
13	CasVII-gly	H	Glicinato
14	Cas-4-Megly	4-metil	Glicinato
15	Cas-5-Megly	5-metil	Glicinato
16	CasII-gly	4,7-dimetil	Glicinato
17	CasVI-gly	5,6-dimetil	Glicinato
18	CasVII-gly	3,4,7,8-tetrametil	Glicinato
19	CasI-gly	4,7-difenil	Glicinato
20	Cas-5-Clgly	5-cloro	Glicinato
21	CasV-NO <sub>2</sub> -gly	5-Nitro	Glicinato

Realizaron dos análisis principales: (1) el estudio de la influencia de los sustituyentes en el ligante diimina sobre las propiedades fisicoquímicas como el potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) y su relación con la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) o la concentración mínima inhibitoria ( $CI_{50}$ ) en varias líneas celulares tumorales como: HeLa (cáncer cervico), SiHa (cervico; células escamosas), MCF-7 (cáncer de mama) y HCT-7 (células de cáncer colon rectal) y (2) el estudio de la influencia del ligante secundario cuando se cambia acetilacetato (acac) por glicinato (gly). Los resultados mostraron que la presencia de los anillos de la fenantrolina es necesaria para aumentar la actividad biológica respecto a los que contenían bipyridina como ligante. El cambio del ligante secundario (de acac a gly) tiene menor influencia sobre la actividad biológica que los cambios en el ligando de diimina.

Además, se observó que existía una relación lineal entre la  $CI_{50}$  y el potencial de media onda. Estos efectos pueden deberse a la modificación de ciertas propiedades fisicoquímicas de los complejos como por ejemplo el comportamiento redox del centro metálico, la estabilidad de la unión de los ligantes secundarios o la liposolubilidad del complejo que son aportados por los sustituyentes y ligantes de las casiopeínas.

Dada la actividad antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* que han presentado las casiopeínas, se ha tratado de evidenciar los posibles mecanismos de acción, los cuales son presentados a continuación.

### 2.5.2. Mecanismos de acción

Entre los mecanismos de acción propuestos para las casiopeínas se encuentran:

1. Generación de especies reactivas de oxígeno [68–73] con la oxidación del ADN y la degradación del ADN [74]. Diversos ensayos experimentales muestran que cuando se administra un agente reductor como ácido ascórbico o  $\beta$ -mercaptoetanol la degradación de ADN es más eficiente. En otros ensayos, se encontró que las casiopeínas pueden utilizar al glutatión reducido como fuente de electrones para catalizar la reacción tipo Fenton. De este modo, el glutatión contribuye en la reducción de  $Cu^{2+}$  a  $Cu^{+1}$ ; con lo que se propicia la generación de especies reactivas de oxígeno tales como radicales hidroxilos ( $\cdot OH$ ) conluciendo a un daño mitocondrial (figura 2.5) [75].

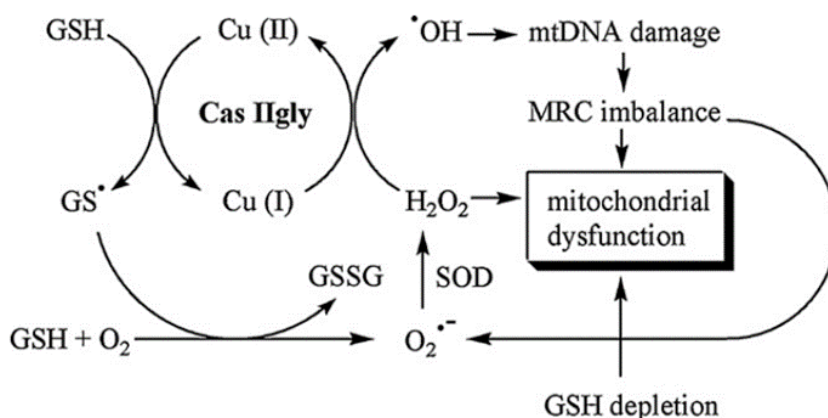


Figura 2.5: Mecanismo de acción propuesto para la Casiopeína IIgly. Glutatión (GSH), ADN mitocondrial (mtADN), cadena respiratoria mitocondrial (MCR), superóxido dismutasa (SOD). [75].

2. Toxicidad mitocondrial; se ha observado que los compuestos afectan varios sitios mitocondriales, provocando la inhibición de la respiración y la síntesis de ATP, lo que podría comprometer los procesos dependientes de la energía, como la duplicación celular [67].
3. Daño del ADN a través de la interacción directa con Casiopeínas<sup>®</sup> que puede ser por un mecanismo intercalativo o no intercalante junto con un daño oxidativo [74–76].

Con el fin de mejorar la comprensión del modo de interacción molecular de las Casiopeínas<sup>®</sup> con el ADN, han realizado diversos estudios experimentales utilizando técnicas como; electroforesis en gel [68,69], dicroísmo circular [73], microscopia de fuerza atómica [73], ensayo cometa [74] y fluorescencia [76]. Como resultado global de estos experimentos se puede observar que las casiopeínas sí interaccionan con ADN, y esta interacción es más favorable y evidente cuando se da en presencia de algún agente reductor, ya sea, endógeno o exógeno. Las constantes de asociación entre los compuestos de coordinación y ADN-TB sugieren que existe una fuerte interacción entre ellos que oscila entre  $3.11$  y  $7.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  [77]. Además, se ha observado que las casiopeínas pueden atravesar el núcleo de las células y mantener una interacción con el material genético conduciendo a la degradación de éste y llevándolo a una muerte por apoptosis [74].

Tovar y colaboradores en 2011 obtuvieron un cristal de la casiopeína III-ia con el aminoácido adenina [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina(acetilacetonato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>(adenina)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O] (Figura 2.6) donde se observó la interacción intermolecular que puede suceder entre el compuesto ternario de cobre (II) y adenina. El modo de unión que predomina en es una interacción de apilamiento tipo  $\pi - \pi^*$  entre los ligantes de la casiopeína<sup>®</sup> y dos moléculas de adeninas [78].

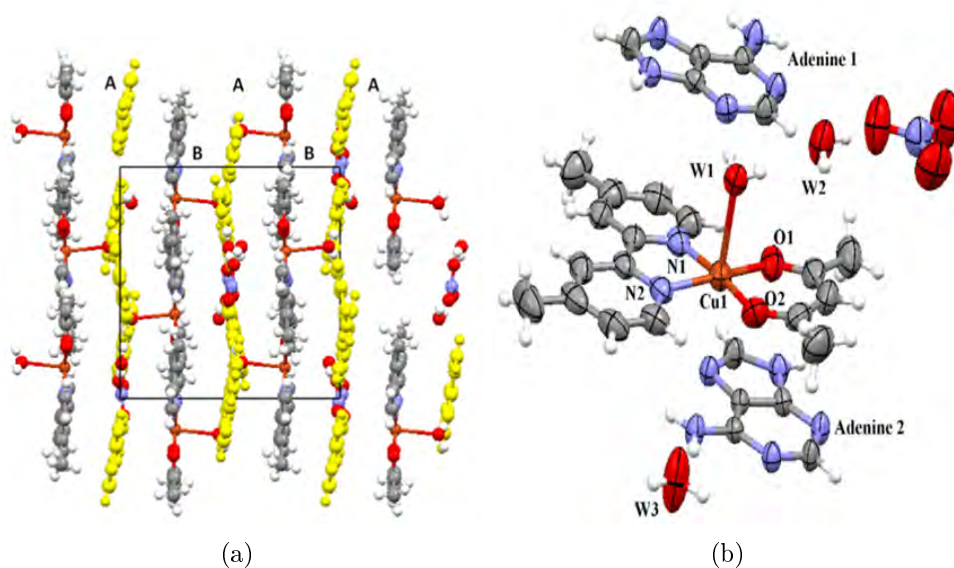


Figura 2.6: (a) Empaquetamiento del cristal; (A) moléculas de casiopeína III-ia, (B) moléculas de adenina. (b) aducto entre la casiopeína y dos moléculas de adenina. [78].

Si bien se han realizado aproximaciones del modo de interacción de los compuestos de cobre con el ADN, aún se desconoce, experimentalmente, si los compuestos sufren realmente una intercalación entre los pares de bases del ADN. No obstante, se cuenta con distintos estudios teóricos donde el objetivo principal fue elucidar los modos de unión o de interacción que estos compuestos de coordinación presentan con el ADN.

### 2.5.3. Estudios teóricos

En 2011 Galindo y colaboradores [79], realizaron un estudio teórico donde buscó analizar cómo se lleva a cabo la interacción entre las 21 casiopeínas estudiadas en el QSAR y los pares de bases adenina, timina, guanina y citosina, para este estudio tomaron como referencia los datos cristalográficos de la interacción de la casiopeína<sup>®</sup> III-ia y adenina [78]. Los cálculos fueron realizados mediante la obtención de propiedades de densidad electrónica. Este estudio arrojó que la estabilización de los aductos formados entre los

pares de bases y las casiopeínas se debe a la deficiencia electrónica del ligante diimina que es compensada por la transferencia de electrones de la adenina por interacciones  $\pi - \pi$ , mientras que el cobre pierde densidad electrónica que es ganada por el átomo de oxígeno de una molécula de agua (Figura 2.7). Por otro lado, obtuvieron que la afinidad de las casiopeínas por las bases del ADN tiene el siguiente orden  $C > G > A \approx T$ .

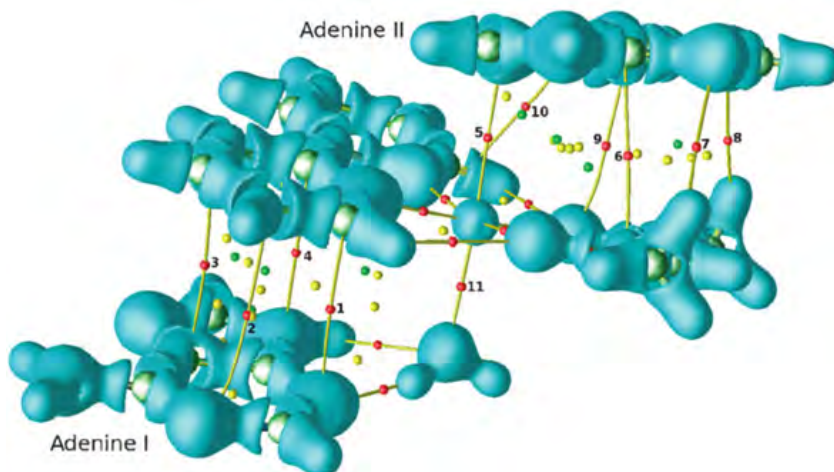


Figura 2.7: Grafico molecular de la interacción de apilamiento entre las Casiopeína III-ia  $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipiridina)}(\text{acetilacetionato})]\text{NO}_3$  y adenina. [79]

En 2012, Galindo [80] mediante optimizaciones de geometrías, seguidas por un análisis topológico de la densidad electrónica de 21 casiopeínas (tabla 2.1), permitieron definir las interacciones específicas dentro del sitio de reconocimiento. Se observó que las casiopeínas tienen preferencia por el surco menor debido a que la afinidad del cobre por los grupos fosfato que impide la inserción adicional de los ligantes de la casiopeína dentro de la cadena de ADN. Se analizó la densidad electrónica de los ligantes y se observó que esta disminuye y aumenta en el metal. Una coordinación subsiguiente de un grupo fosfato dentro de una posición axial del átomo de cobre produce una transferencia de electrones al centro metálico que compensa la deficiencia electrónica de los ligantes, al mismo tiempo que la desoxirribosa dona densidad electrónica por los átomos de hidrógeno y oxígeno axiales al ligante diimínico (figura 2.8).

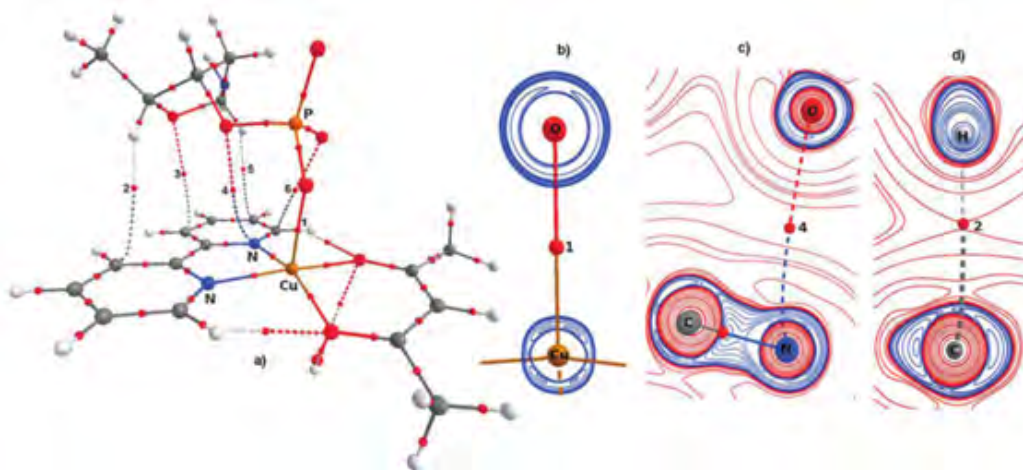


Figura 2.8: Gráfico molecular de la interacción de desoxirribosa-fosfato-casiopéina<sup>®</sup>. Mapa de contorno de interacciones donador-aceptor (b)  $O_3PO-Cu$ , (c)  $O \cdots \pi$  y (d)  $C-H \cdots \pi$ . [80]

En 2015 [81], realizaron una dinámica molecular (DM) con las 21 casiopéinas que fueron estudiadas en el QSAR (tabla 2.1), debido a que se tienen datos electrónicos teóricos por los estudios antes aludidos. Donde utilizaron 10  $\mu s$  de tiempo de simulación y ADN dodecámero (figura 2.9), este último tomado de la base de datos de proteína (PDB, por sus siglas en inglés). A continuación, se describe cada una de los tipos de interacción que se obtuvieron de la dinámica mencionada.

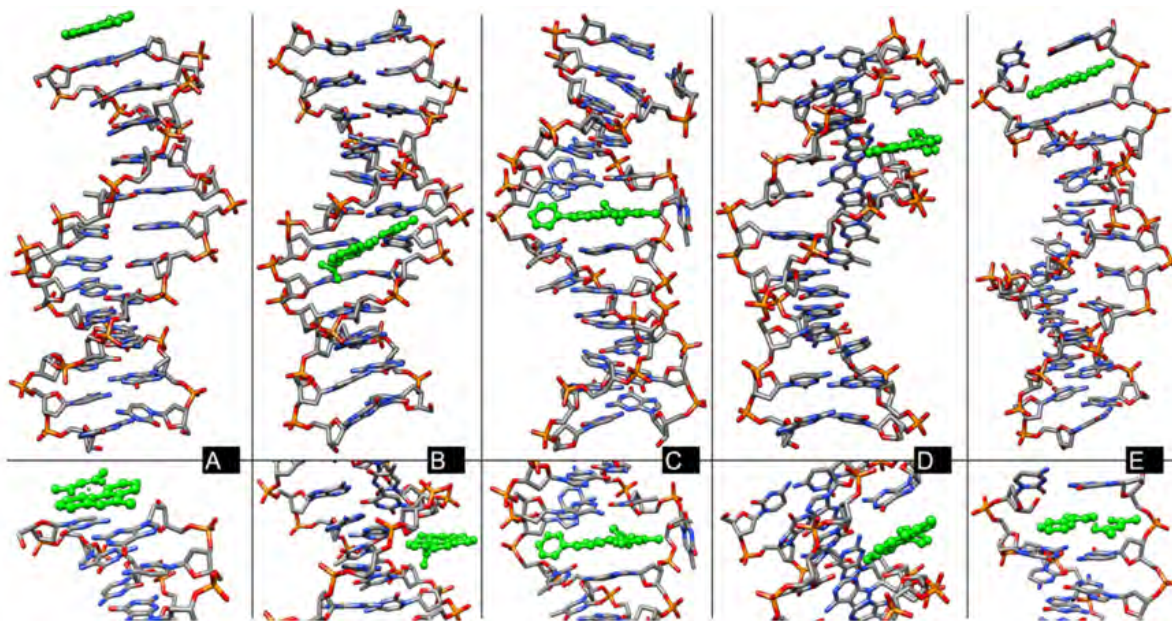


Figura 2.9: Tipos de interacción entre las casiopéinas y ADN, como resultados de la dinámica molecular [81].

Los resultados arrojados por la dinámica molecular, sugiere que el modo de interacción A, es el que se presenta para la mayoría de las casiopeínas (15 compuestos), sin embargo, este modo de interacción no es el más estable (energéticamente no favorecido); esta interacción sucede por el apilamiento de las casiopeínas con los pares de bases finales del ADN. Al contrario, el modo de interacción B, es el energéticamente más favorecido, y corresponde a una interacción en el surco menor. Por otro lado el tipo de interacción C, resultó en la apertura de pares de bases en el surco menor seguido de la intercalación del complejo. La interacción de tipo D, también se da en el surco menor pero aquí, uno de los nucleótidos terminales forma una interacción de apilamiento con el compuesto de coordinación de cobre (II). Por último, también puede darse una intercalación cerca de los pares de bases finales de la cadena de ADN (interacción E).

Dados los resultados obtenidos a partir de los estudios teóricos, es de interés elucidar experimentalmente los modos de interacción molecular entre los 21 compuestos de coordinación mixtos de cobre (II) (Casiopeínas<sup>®</sup>) y ADN.

## 2.6. Hipótesis

Los sustituyentes de ligante primario (imina) y la naturaleza del ligante secundario (gly, acac) de las casiopeínas influirán en la interacción que éstas tienen con el ADN, lo que puede permitir tener una clasificación según su modo de interacción molecular; ya sea por intercalación o interacción en los surcos.



## 2.7. Objetivos

### GENERAL

Evaluar la interacción de 21 casiopeínas con ADN plásmidico (PBR322) y evaluar su modo de unión molecular.

### PARTICULARES

- Sintetizar y caracterizar las Casiopeínas de acuerdo a la síntesis de las patentes.
- Evaluar la interacción de los compuestos con el plásmido mediante electroforesis en gel y clasificar los tipos de interacción.
- Evaluar la interacción de los compuestos con el plásmido y determinar los modos de unión molecular a partir de espectroscopia electrónica de UV-visible.
- Determinar si existe una correlación entre los resultados experimentales y los resultados teóricos de la dinámica molecular.

# Capítulo 3

## Metodología

### 3.1. Síntesis y caracterización

De las 21 casiopeínas a evaluar, fueron sintetizados un total de 10 compuestos de coordinación de acuerdo con la metodología reportada [29–31]. Los otros 11 compuestos, se encontraban sintetizado, empero, fueron purificados. A los 21 compuestos, se le realizaron estudios de infrarrojo y análisis elemental.

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en el equipo Nicolet AVATAR 320 FT-IR en un intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de IR son presentados en el anexo A.

El análisis elemental de cada Casiopeína se llevó a cabo determinando el porcentaje de carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, empleando un analizador elemental EAGER 200; todos estos análisis se realizaron en la Unidad de Servicios de apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

En la tabla (3.1), se presentan los 21 compuestos que fueron sintetizados y caracterizados. Se les asignaron claves para facilitar el análisis y comprensión del trabajo.

Tabla 3.1: Casiopeínas sinterizadas y purificadas para el uso en este trabajo.

No. Grupo bipyridina	Sustituyentes	Ligante secundario	Clave del compuesto
1	H	Acetilacetato	CasIII-Da
2	4,4'-dimetil	Acetilacetato	CasIII-ia
<b>Grupo fenantrolina</b>			
3	H	Acetilacetato	CasIII-Ba
4	4-metil	Acetilacetato	Cas-4a-Mea
5	5-metil	Acetilacetato	Cas-5a-Mea
6	4,7-dimetil	Acetilacetato	CasIII-Ea
7	5,6-dimetil	Acetilacetato	CasIII-La
8	3,4,7,8-tetrametil	Acetilacetato	CasIII-Ma
9	5-fenil	Acetilacetato	Cas-5-Fenil
10	4,7-difenil	Acetilacetato	CasIII-Ha
11	5-cloro	Acetilacetato	CasIII-5a-Cla
12	5-Nitro	Acetilacetato	CasIII-5a-NO <sub>2</sub> a
13	H	Glicinato	CasVII-gly
14	4-metil	Glicinato	Cas-4-Megly
15	5-metil	Glicinato	Cas-5-Megly
16	4,7-dimetil	Glicinato	CasII-gly
17	5,6-dimetil	Glicinato	CasVI-gly
18	3,4,7,8-tetrametil	Glicinato	CasVIII-gly
19	4,7-difenil	Glicinato	CasI-gly
20	5-cloro	Glicinato	Cas-5-Clgly
21	5-Nitro	Glicinato	CasV-NO <sub>2</sub> -gly

## 3.2. Tratamiento del plásmido

Para realizar el estudio de electroforesis, se trabajó con ADN plasmídico PBR322 de *E. coli* RRI (adquirido en Sigma-Aldrich). Se trata de un ADN de doble cadena (ds, por sus siglas en inglés) y presenta dos isoformas, ADN superenrollado y circular, su peso molecular es  $2.9 \times 10^6$  Dalton y contiene 4,363 pares de bases. El plásmido fue suspendido con 1ml de agua estéril; posteriormente, se cuantificó espectroscópicamente suponiendo que 1 unidad de Absorbancia a 260 nm equivale a  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Además se empleó la relación de absorbancia de UV a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) y se obtuvo el valor de 1.81, lo cual confirma que el plásmido estaba libre de proteínas. [54]

### 3.3. Preparación del gel de agarosa

El buffer de corrida TBE 1X (Tris, ácido bórico, EDTA) y el buffer de carga se prepararon de acuerdo a lo descrito en la literatura [54]. La concentración de agarosa para todos los geles fue de 1.0 %, se colocó 0.5 g de agarosa grado electroforético en 50 ml de TBE 0.5X, se calentó hasta la disolución completa de la agarosa, se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos, y se añadió 5 $\mu$ L de bromuro de etidio (de concentración 10 mg/mL). Se agitó hasta la disolución, se vertió el gel en una cámara electroforética previamente limpia y acondicionada con un peine de 8 pozos. Posterior a la solidificación del gel (aproximadamente 30 minutos), se retiró el peine y se cubrió el gel con buffer de TBE 0.5X.

### 3.4. Evaluación de la interacción de las casiopeínas con el ADN mediante electroforesis en gel

Los experimentos de interacción entre las Casiopeínas-ADN se realizaron incubando 300 ng de plasmido PBR322 en ausencia o presencia de diferentes concentración de casiopeínas a un volumen de reacción final de 20  $\mu$ L, por un tiempo de incubación de 30 minutos y 20 horas a 37 °C. [73] Las concentraciones de Casiopeínas empleadas para este estudio fueron 2 mM, 1 mM, 500, 100, 50, 25 y 10  $\mu$ M; por lo que para la preparación de estas disoluciones se tenía como stock una disolución de 6 mM de compuesto. A continuación se presenta un esquema de la preparación para cada carril (figura 3.1) y un esquema de la metodología que se llevó acabo para el montaje de las muestras (figura 7.1).

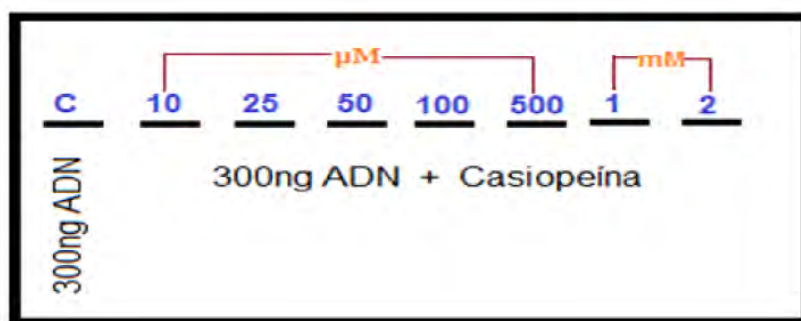


Figura 3.1: Preparación de cada carril, en cada pozo se coloca 10 $\mu$ L de ADN-Casiopeína + 1 $\mu$ L de buffer de carga en cada pozo.

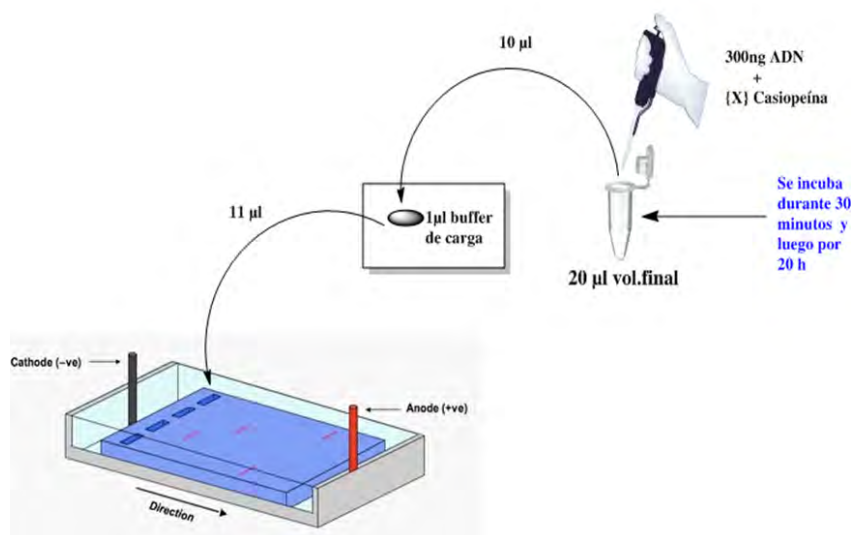


Figura 3.2: Esquema de la metodología que se llevó a cabo para el montaje de las muestras.

El tiempo de corrida del gel fue de 2 h 20 minutos, con una corriente constante de 90 Volts. Los ácidos nucleicos se visualizaron utilizando un transiluminador de UV.

### 3.5. Evaluación de la interacción de las casiopeínas con ADN mediante espectroscopía de UV-Vis

La espectroscopía UV-Visible fue usada para evaluar los modos de interacción molecular que se pueden dar entre las Casiopeínas® y el ADN, a una misma concentración y diferentes tiempos de incubación a 37 °C. Para llevar a cabo este estudio, se prepararon soluciones a las siguientes concentraciones: 20 ng/µL de ADN + 35 µM de Casiopeína con un volumen final de 100 µL. Una vez obtenida la mezcla, se determinó su espectro electrónico de UV-vis a 0, 5, 10, 20, 40, 80 y 120 minutos a 37 °C de incubación. El análisis se llevó a cabo utilizando un equipo de ultravioleta-visible marca Genesys 10S ThermoScientific de 180 a 700 nm empleando una microcelda de cuarzo de 0.050 mL.

La metodología anterior fue aplicada para estudiar la interacción entre ADN-cisplatino (alquilante [20, 24]), Bromuro de etidio (intercalador [34, 82]) y Netropsina (surco menor [83]), que se tendrán como controles positivos.

# Capítulo 4

## Resultados

### 4.1. Síntesis y caracterización de casiopeínas

En la tabla 4.1, se muestran los resultados de análisis elemental (A.E.), esto nos permitió sugerir la fórmula mínima y el peso molecular de las 21 casiopeína que se estudiarán en este trabajo.

Tabla 4.1: Conjunto de casiopeínas sinterizadas y purificadas para el uso en este trabajo.

No. Grupo bipiridina	Clave del compuesto	Sustituyentes	Ligante secundario	°A.E (%C, %H, %N)	P.M (g/mol)	Formula condensada
1	CasIII-Da	H	Acetilacetato	48.85;3.77;10.94 (47.3;3.96;11.03)	380.84	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> Cu
2	CasIII-ia	4,4'-dimetil	Acetilacetato	47.52;4.78;10.3 (46.81;4.97;10.91)	408.89	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> Cu
<b>Grupo fenantrolina</b>						
3	CasIII-Ba	H	Acetilacetato	47.01;4.03;10.03 (48.05;4.5;9.88)	422.87	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> CuH <sub>2</sub> O
4*	Cas-4a-Ma	4-metil	Acetilacetato	48.80;4.25;10.14 (49.48;4.38;9.61)	436.9	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> CuH <sub>2</sub> O
5*	Cas-5a-Ma	5-metil	Acetilacetato	49.02;4.45;9.85 (49.48;4.34;9.61)	436.9	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> CuH <sub>2</sub> O
6*	CasIII-Ea	4,7-dimetil	Acetilacetato	48.69;4.35;9.173 (50.6;4.69;9.31)	450.93	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> CuH <sub>2</sub> O
7	CasIII-La	5,6-dimetil	Acetilacetato	48.367;4.67;9.02 (48.66;4.94;8.96)	468.94	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> Cu2H <sub>2</sub> O
8	CasIII-Ma	3,4,7,8- tetrametil	Acetilacetato	52.68;5.32;8.84 (52.65;5.26;8.77)	478.98	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> CuH <sub>2</sub> O
9	Cas5-Fenil	5-fenil	Acetilacetato	56.715;3.49;8.685 (57.43;3.98;8.73)	480.96	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> Cu
10	CasIII-Ha	4,7-difenil	Acetilacetato	60.88;4.42;7.24 (60.46;4.54;7.29)	575.07	C <sub>29</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> CuH <sub>2</sub> O
11*	CasIII-5a-Cl	5-cloro	Acetilacetato	43.68;3.44;9.05 (44.64;3.52;9.18)	457.32	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> CuClH <sub>2</sub> O
12*	CasIII-5a-NO <sub>2</sub> a	5-Nitro	Acetilacetato	44.7;3.23;12.07 (45.38;3.13;12.45)	449.86	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> Cu
13*	CasVII-gly	H	Glicinato	43.01;3.22;14.25 (42.26;3.54;14.08)	397.83	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> CuH <sub>2</sub> O
14*	Cas-4-Megly	4-metil	Glicinato	43.01;3.68;13.63 (43.74;3.91;13.6)	411.85	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> CuH <sub>2</sub> O
15*	Cas-5-Megly	5-metil	Glicinato	42.01;3.88;13.63 (43.74;3.91;13.6)	411.85	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> CuH <sub>2</sub> O
16	CasII-gly	4,7-dimetil	Glicinato	43.07;4.32;12.92 (43.29;4.54;12.62)	443.89	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> Cu2H <sub>2</sub> O
17	CasVI-gly	5,6-dimetil	Glicinato	43.75;4.35;12.92 (45.12;4.26;13.15)	425.88	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> CuH <sub>2</sub> O
18	CasVIII-gly	3,4,7,8- tetrametil	Glicinato	43.75;4.35;12.92 (45.12;4.26;13.15)	425.88	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> Cu
19	CasI-gly	4,7-difenil	Glicinato	52.51;3.86;9.75 (56.77;4.03;10.18)	550.02	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> CuH <sub>2</sub> O
20*	Cas-5-Cl-gly	5-cloro	Glicinato	36.89;3.077;13.067 (38.89;3.03;12.96)	432.27	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> CuClH <sub>2</sub> O
21	CasV-NO <sub>2</sub> a-gly	5-Nitro	Glicinato	35.12;3.03;15.13 (37.97;2.95;15.81)	442.82	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> CuH <sub>2</sub> O

°Datos del análisis elemental experimental (datos calculados).

\* Casiopeínas que fueron sintetizadas y purificadas.

## 4.2. Interacción de las casiopeínas con ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

Los ensayos de electroforesis en gel, permiten visualizar los cortes al ADN que pueden ser provocados por la interacción de moléculas pequeñas con los fosfatos presentes en el esqueleto del ADN; además, una disminución en la intensidad de la banda de ADN superenrollado con el subsecuente aumento en la intensidad de la banda de ADN circular, es indicativo de una interacción de intercalación. Con este enfoque, se estudió la interacción de 20 casiopeínas con ADN (PBR322 *E. coli*).

### 4.2.1. Interacción de casiopeínas [Cu(bipi)(acac)]NO<sub>3</sub> con ADN

Se analizaron los geles de electroforesis según los ligantes primarios y secundarios de cada Casiopeína. Se comenzó analizando los compuestos de cobre que contienen biperidina y acetilacetonato como ligantes.

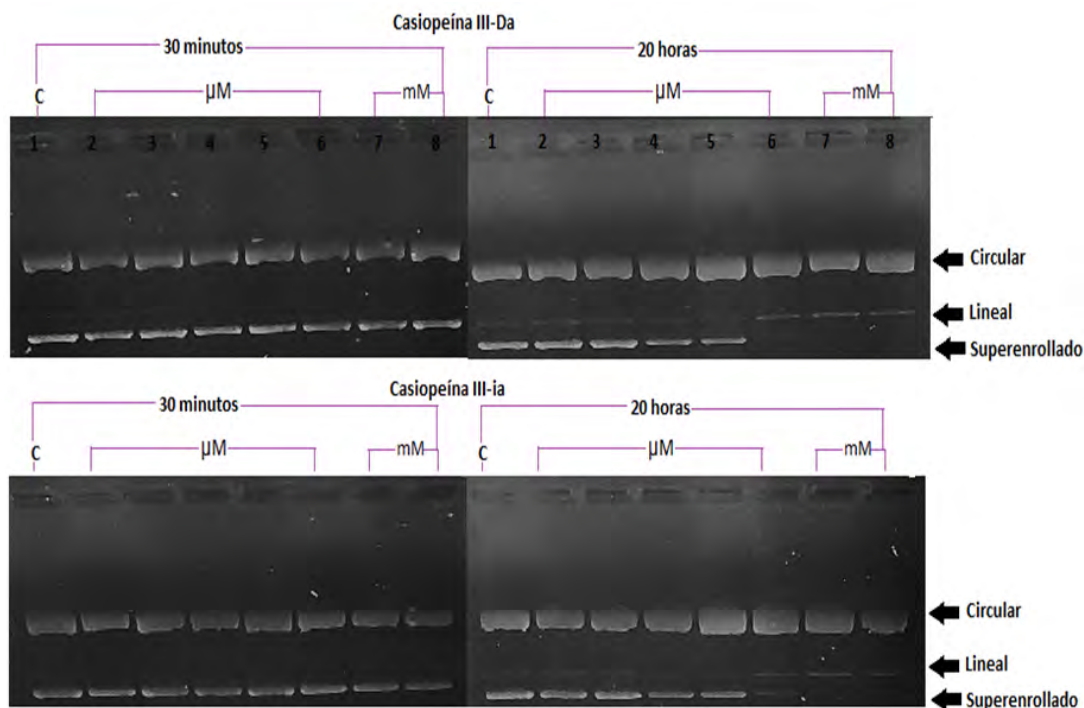


Figura 4.1: Análisis de la interacción del plásmido PBR322 con Casiopeínas de tipo [Cu(bipi)(acac)]NO<sub>3</sub>. Se incubaron 300 ng de plásmido por 30 min y 20 horas a 37 °C. Línea 1, control; línea 2, casiopeína 10 μM; línea 3, casiopeína 25 μM; línea 4, casiopeína 50 μM; línea 5, casiopeína 100 μM; línea 6, casiopeína 500 μM; línea 7, casiopeína 1 mM; línea 8, casiopeína 2 mM.



1. Este conjunto de Casiopeínas, independientemente del sustituyente que contengan, no provocaron una modificación significativa en la forma e intensidad de las bandas observadas en el gel a un tiempo de 30 minutos.
2. A las 20 horas, la banda correspondiente a la forma superenrollada del ADN es la que más se modificó, debido a que disminuyó la intensidad o desapareció la banda. Esto se acentuó a medida que aumentó la concentración de la casiopeína.
3. Se observó la disminución o desaparición de la banda correspondiente a la forma superenrollada del ADN (a las concentraciones de  $500\mu\text{M}$ , 1 y 2 mM); esta disminución en la intensidad puede deberse a la degradación del ADN debido a la interacción con la Casiopeína; este fenómeno no fue observado en el control.
4. Se observó también que estas Casiopeínas indujeron un corte en el ADN, lo anterior, debido a que se apreció una nueva banda, adjudicada a ADN lineal.
5. Conforme se aumentó la concentración de las casiopeínas, la intensidad de la banda adjudicada a ADN lineal también aumentó.
6. Parece ser que la interacción menos fuerte es la que se observó con ADN relajado o circular. Con base en esto, se propone que la primer interacción que se da entre las casiopeínas y el ADN es con la forma superenrollada mediante la ruptura de la cadena del ADN, y posteriormente cuando se aumenta la concentración o el tiempo de incubación, desaparece la banda por completo.

#### 4.2.2. Interacción de casiopeínas [Cu(fen)(acac)]NO<sub>3</sub> con ADN

Este grupo de casiopeínas, son compuestos de coordinación de cobre que están formados por el ligante acetilacetato y fenantrolina, que puede estar sustituido por grupos metilo, fenilo, nitro, cloruro en distintas posiciones del anillo aromático como se indicó en la tabla 4.1. Dada la presencia de dichos sustituyentes, se investigó si existía una tendencia en función de la estructura de las casiopeínas.

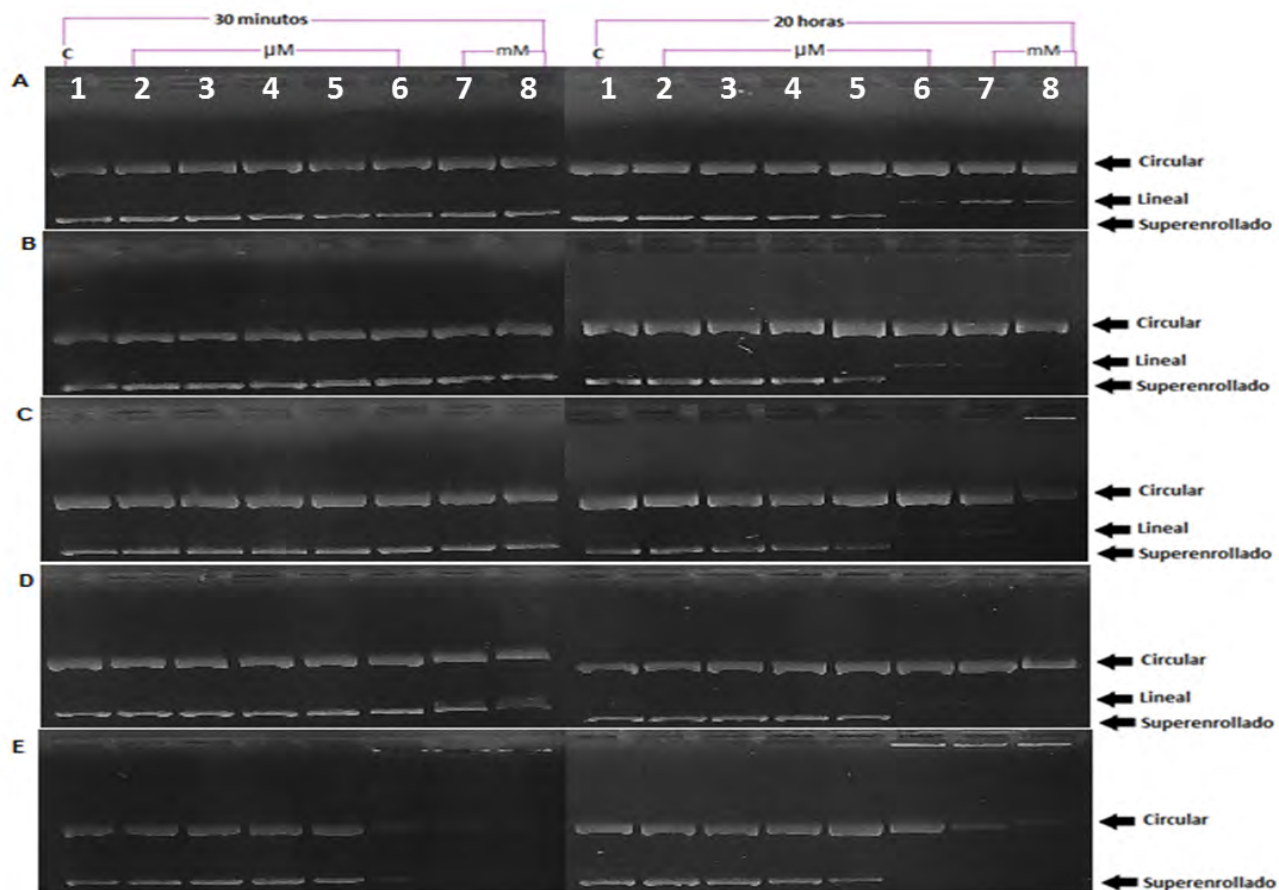


Figura 4.2: Análisis de la interacción del plásmido PBR322 con Casiopeínas de tipo [Cu(fen)(acac)]NO<sub>3</sub>. Se incubaron 300 ng de plásmido por 30 min y 20 horas a 37 °C. Línea 1, control; línea 2, casiopeína 10 μM; línea 3, casiopeína 25 μM; línea 4, casiopeína 50 μM; línea 5, casiopeína 100 μM; línea 6, casiopeína 500 μM; línea 7, casiopeína 1 mM; línea 8, casiopeína 2 mM. A) Cas-III-Ba; B) Cas-4<sup>a</sup>-Mea; C) Cas-5<sup>a</sup>-Mea; D) Cas-III-Ea; E) Cas-III-La.

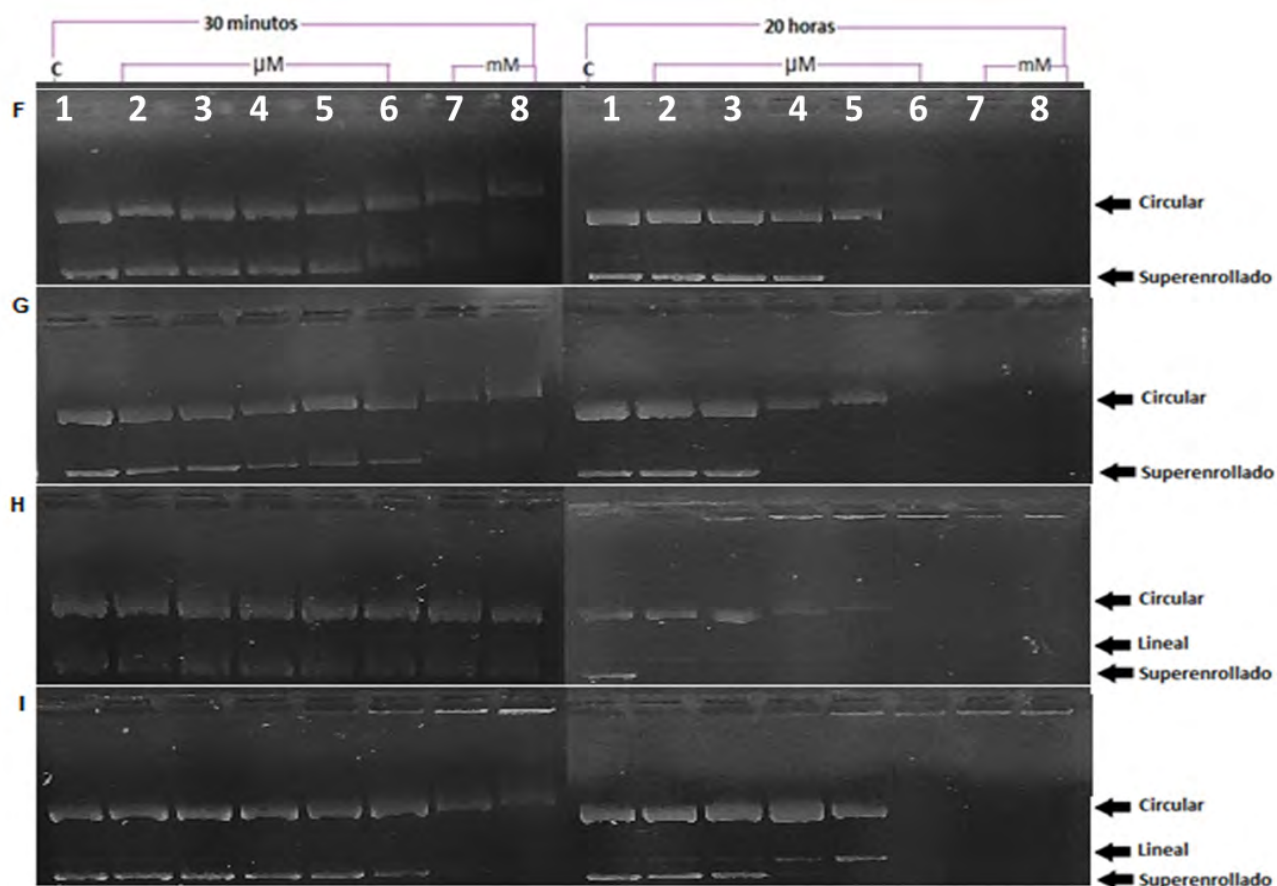


Figura 4.3: Análisis de la interacción del plásmido PBR322 con Casiopeínas de tipo  $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{acac})]\text{NO}_3$ . Se incubaron 300 ng de plásmido por 30 min y 20 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Línea 1, control; línea 2, casiopeína  $10\mu\text{M}$ ; línea 3, casiopeína  $25\mu\text{M}$ ; línea 4, casiopeína  $50\mu\text{M}$ ; línea 5, casiopeína  $100\mu\text{M}$ ; línea 6, casiopeína  $500\mu\text{M}$ ; línea 7, casiopeína  $1\text{mM}$ ; línea 8, casiopeína  $2\text{mM}$ . F) Cas-III-Ma; G) Cas-5-fenil; H) Cas-III-5-Cl; I) Cas-III-5a- $\text{NO}_2$ a

A continuación se enuncian los resultados obtenidos en los geles 4.2 y 4.3 de la interacción entre los compuestos  $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{acac})]\text{NO}_3$  con ADN.

1. A diferencia de las casiopeínas que tienen bipyridinas, las pertenecientes a las casiopeínas que tienen fenantrolina y acetilacetato modificaron la forma e intensidad de las bandas observadas en el gel a un tiempo de 30 minutos.
2. Las casiopeínas III-Ba, 4<sup>a</sup>-Mea, 5<sup>a</sup>-Mea, no tuvieron una interacción significativa con el ADN a 30 minutos, ya que no se observaron cambios en las intensidades de bandas del ADN superenrollado y circular. A este tiempo, la casiopeína cas-III-Ea ( $1$  y  $2\text{mM}$ ) comenzó a presentar interacción con la forma superenrollada del ADN.

3. Las casiopeínas III-Ba, 4<sup>a</sup>-Mea, 5<sup>a</sup>-Mea, Cas-III-Ea (A-D) presentaron el mismo comportamiento, ya que en los geles que se obtuvieron a las 20 horas fueron similares. Se observó la disminución y desaparición de la banda superenrollada, esto se acentuó conforme se aumentó la concentración de casiopeínas; además, se observó una banda referente a la forma lineal del ADN, lo que indica que estas casiopeínas pueden estar interaccionando con los fosfatos, de tal forma que rompan los enlaces fosfodiéster y conduzca a rupturas de las cadenas de ADN. Por otro lado, a pesar de que la casiopeína III-La (E) está compuesta estructuralmente por los mismos ligantes y sustituyentes que la casiopeína III-Ea (D), no se observó la banda lineal de ADN, por lo que se puede proponer que su interacción es mayor comparada con su análogo cas-III-Ea. Esto último sugiere que tener sustituyentes en las posiciones -5, -6 aumenta la interacción con ADN.
  
4. Para las casiopeínas III-Ba, 4<sup>a</sup>-Mea, 5<sup>a</sup>-Mea, Cas-III-Ea y III-La (A a E) se observó una disminución en la intensidad de la banda perteneciente a ADN circular después de que el ADN superenrollado desapareció, por lo que se propone que la primera interacción de las casiopeínas es con ADN superenrollado, de forma que se rompe la tensión de la hélice que mantienen la forma enrollada y luego rompe los enlaces fosfodiéster que genera ADN lineal. La segunda interacción se da con ADN circular, llevándolo a una degradación (por su rompimiento) y la posible generación de ADN lineal.
  
5. En esta familia las casiopeínas que presentaron una mayor interacción con el ADN son: Cas-5-fenil > Cas-III-Ma > Cas-III-5<sup>a</sup>-NO<sub>2</sub>a > Cas-III-5<sup>a</sup>-Cl (F-I), debido a que a los 30 minutos ya se observaban cambios significativos en el ADN superenrollado, esto se apreció en la disminución de la intensidad de la banda e incluso la desaparición de dicha banda a concentraciones de 50, 100, 500  $\mu$ M, 1 y 2 mM. La banda de ADN circular presentó una movilidad retardada y un aumento en la intensidad de la banda de los 10  $\mu$ M hasta los 100  $\mu$ M; a partir de los 500  $\mu$ M, se aprecia una disminución considerable de la intensidad de ADN circular.

6. A las 20 horas, el ADN superenrollado y circular a las concentraciones de 500  $\mu\text{M}$ , 1 y 2 mM desaparecieron del carril, esto es debido a que se llevó a cabo una degradación del ADN como consecuencia de la interacción con la Casiopeína (no observado en el control). La banda correspondiente a la forma superenrollada del ADN fue la que sufrió una mayor modificación, debido a que disminuyó o desapareció la intensidad de su banda.
7. Se observó que las casiopeínas III-5<sup>a</sup>-Cla y III-5<sup>a</sup>-NO<sub>2</sub>a (H e I) indujeron un corte en el ADN, debido a que se apreció una nueva banda, adjudicada a ADN lineal.
8. Conforme la concentración de las de las casiopeínas aumentaba, la intensidad de la banda correspondiente al ADN lineal también aumentó.
9. Se apreció que las casiopeínas 5<sup>a</sup>-Mea, III-La, 5-fenil, III-5<sup>a</sup>-Cla, III-5<sup>a</sup>-NO<sub>2</sub>a, formaron un precipitado que se pudo observar al momento de colocar la muestra a 1  $\mu\text{L}$  de buffer de carga, que ayudó a visualizar el precipitado que puede deberse a algún producto de degradación del ADN.

### 4.2.3. Interacción de casiopeínas [Cu(fen)(gly)]NO<sub>3</sub> con ADN

Este grupo de casiopeínas, son compuestos de coordinación de cobre que están formados por el ligante fenantrolina (con diferentes sustituciones) y glicinato. A continuación se presentan los comportamientos observados de la interacción de estos compuestos con ADN.

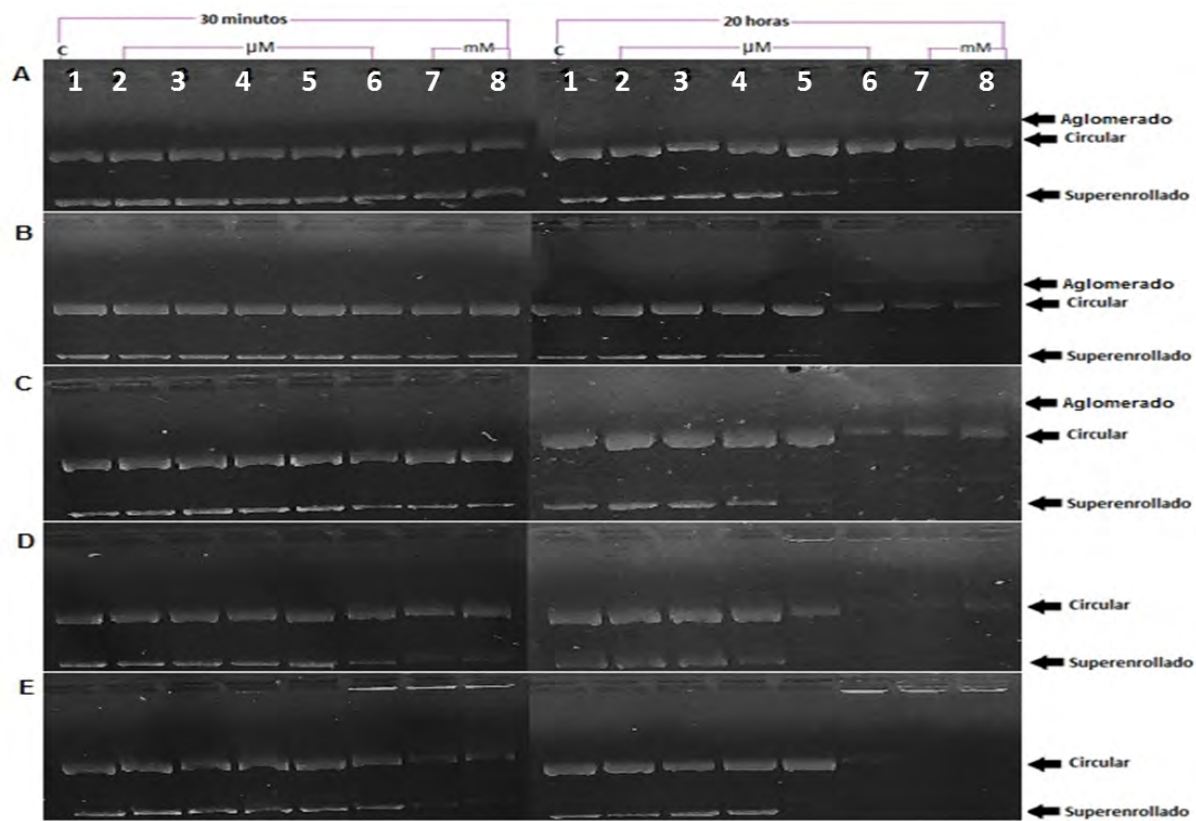


Figura 4.4: Análisis de la interacción del plásmido PBR322 con Casiopeínas de tipo [Cu(fen)(gly)]NO<sub>3</sub>. Se incubaron 300 ng de plásmido por 30 min y 20 horas a 37 °C. Línea 1, control; línea 2, casiopeína 10 μM; línea 3, casiopeína 25 μM; línea 4, casiopeína 50 μM; línea 5, casiopeína 100 μM; línea 6, casiopeína 500 μM; línea 7, casiopeína 1 mM; línea 8, casiopeína 2 mM. A) Cas-VII-gly; B) Cas-4-Megly; C) Cas-5-Megly; D) Cas-II-gly; E) Cas-VI-gly

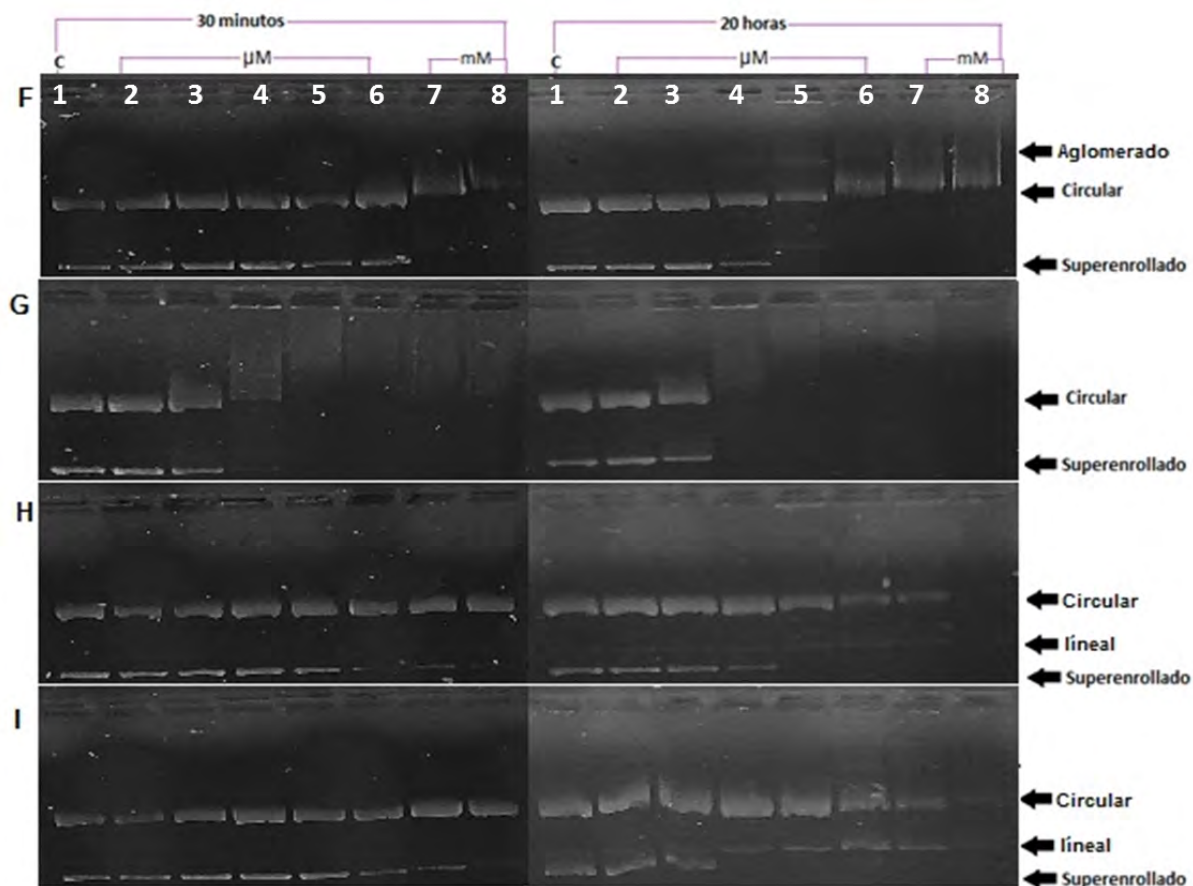


Figura 4.5: Análisis de la interacción del plásmido PBR322 con Casiopeínas de tipo  $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{gly})]\text{NO}_3$ . Se incubaron 300 ng de plásmido por 30 min y 20 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Línea 1, control; línea 2, casiopeína  $10\mu\text{M}$ ; línea 3, casiopeína  $25\mu\text{M}$ ; línea 4, casiopeína  $50\mu\text{M}$ ; línea 5, casiopeína  $100\mu\text{M}$ ; línea 6, casiopeína  $500\mu\text{M}$ ; línea 7, casiopeína  $1\text{mM}$ ; línea 8, casiopeína  $2\text{mM}$ . F) Cas-VIII-gly; G) Cas-I-gly; H) Cas-5-Cl-gly; I) Cas-V- $\text{NO}_2$ -gly.

A continuación se enuncian los resultados obtenidos en los geles 4.4 y 4.5 de la interacción entre los compuestos  $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{gly})]\text{NO}_3$  con ADN.

1. La mayoría de las casiopeínas 5-Megly, II-gly, VI-gly, VIII-gly, I-gly, Cas-5-Cl-gly, V- $\text{NO}_2$ -gly (C-I) que contienen fenantrolina y glicinato como ligantes, modificaron la forma e intensidad de las bandas superenrollada y circular a un tiempo corto (30 minutos) a diferencia de las familias 1 y 2 de casiopeínas, lo que sugiere que el grupo glicinato aumentó la interacción de estos compuestos con ADN.
2. Las casiopeínas VII-gly, 4-Megly, no tuvieron una interacción significativa con el ADN a 30 minutos; ya que no se observaron cambios en las intensidades de las bandas de ADN superenrollado y circular.

3. Las casiopeínas 5-Megly, II-gly, VI-gly, comenzaron a presentar interacción con la forma superenrollada del ADN a los 30 minutos a 500  $\mu\text{M}$ , 1 y 2 mM.
4. Las casiopeínas VII-gly, 4-Megly, 5-Megly, VIII-gly, I-gly, (A-C, F-G) presentaron el mismo comportamiento, ya que en los geles que se obtuvieron a los 20 horas fueron en general muy similares. Se observó la disminución de la intensidad de la banda superenrollada, esto se acentuó conforme se aumentó la concentración de casiopeínas; además, se observó una nueva banda por encima de la banda correspondiente al ADN circular, lo que indica que estas casiopeínas pueden estar formando aductos o aglomerados con el ADN; también se propone que estos compuestos pueden estarse intercalando en las cadenas de ADN circular lo que conduciría a una forma circular más extendida.
5. A pesar de que la casiopeína VII-gly muestra la formación de aductos o aglomerados, también puede observarse una banda correspondiente a ADN lineal (baja intensidad). Esto sugiere que esta casiopeína puede estar presentando más de un modo de unión con el ADN.
6. Por otro lado, las casiopeínas de esta familia que contienen sustituyentes en las posiciones -5, -6 del anillo aromático en la fenantrolina, aumentan la interacción con ADN, ya que a tiempos cortos se observaron más cambios en el ADN superenrollado y circular comparado con los cambios que provocan los compuestos que tienen sustituciones en las posiciones -4, -7.
7. Para las casiopeínas que están -dimetiladas II-gly, VI-gly (D-E) se observó una desaparición del ADN superenrollado y una disminución o desaparición de ADN circular, por lo que se propone que la interacción de las casiopeínas es fuerte ya que degradan a las dos isoformas presentes.
8. En esta familia las casiopeínas que tuvieron una interacción más fuerte con el ADN son: Cas-I-gly, Cas-VIII-gly, Cas-VI-gly, Cas-II-gly (C-G) en ese orden, esto debido a que a los 30 minutos ya se observaban cambios significativos en la banda superenrollada así como la disminución de la intensidad de la banda e incluso la desaparición de esa banda a concentraciones de 1 y 2 mM. En la banda de ADN circular se observó una movilidad retardada y un aumento en la intensidad de la



banda de 10  $\mu\text{M}$  hasta 100  $\mu\text{M}$ ; a partir de los 500  $\mu\text{M}$ , se apreció una disminución considerable de ADN circular.

9. La banda correspondiente a la forma superenrollada del ADN fue la que más se modificó, debido a que disminuyó la intensidad o desapareció su banda por la interacción de las casiopeínas con ADN.
10. En general a las 20 horas, el ADN superenrollado y circular a las concentraciones de 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1 y 2 mM desaparecieron del carril, esto es debido a que se llevó una degradación del ADN provocada por la interacción con la Casiopeína; ya que en el control no se observa este fenómeno.
11. Se aprecia también que las casiopeínas III-5<sup>a</sup>-Cla, 5<sup>a</sup>-NO<sub>2</sub>a, II-gly, VI-gly, VIII-gly, I-gly, formaron un precipitado que se pudo observar desde que se le colocó a la muestra 1  $\mu\text{M}$  de buffer de carga, que ayudó a visualizar el precipitado. Este precipitado puede deberse algún producto de degradación del ADN.
12. Se observó también que las casiopeínas Cas-III-5a-Mea y Cas-III-5a-NO<sub>2</sub>a (H e I) indujeron un corte en el ADN, esto se puede verificar debido a que se apreció una nueva banda, adjudicada a ADN lineal.
13. Conforme se aumentó la concentración de las casiopeínas se pudo ver que la intensidad de la banda adjudicada a ADN lineal también aumentó.

En la siguiente tabla 4.2, se presenta un resumen de las interacciones que se llevó a cabo entre los compuestos mixtos de cobre (Casiopeínas<sup>®</sup>) con ADN superenrollado y circular. Esto permitió hacer una primera clasificación en función del modo de interacción, a partir de los datos observados en los geles de agarosa esto, mediante la separación y cambios en las isoformas del ADN inducidos por las casiopeínas.

Tabla 4.2: Resumen de las interacciones entre las casiopeínas y ADN superenrollado y circular.

Compuesto	Cambios en las intensidades de las bandas del plásmido PBR322		Presencia de distintas formas de ADN	
	Forma Super-enrollada	Forma Circular	Forma lineal	Aglomerado o Adueto
1 Cas-III-Da	Poco	Poco	✓	...
2 Cas-III-ia	Poco	Poco	✓	...
3 Cas-III-Ba	Poco	Poco	✓	...
4 Cas-4a-Mea	Poco	Poco	✓	...
5 Cas-5a-Mea	Poco	Poco	✓	...
6 Cas-III-Ea	Poco	Poco	✓	...
7 Cas-III-La	Poco	Mucho	...	...
8 Cas-III-Ma	Mucho	Mucho	...	...
9 Cas-5-Fenil	Mucho	Mucho	...	...
11 Cas-III-5a-Cla	Mucho	Poco	✓	...
12 Cas-III-5a-NO2a	Mucho	Poco	✓	...
13 Cas-VII-gly	Poco	Poco	...	✓
14 Cas-4-Megly	Poco	Poco	...	✓
15 Cas-5-Megly	Poco	Poco	...	✓
16 Cas-II-gly	Mucho	Mucho	...	...
17 Cas-VI-gly	Mucho	Mucho	...	...
18 Cas-VIII-gly	Mucho	Mucho	...	✓
19 Cas-I-gly	Mucho	Mucho	...	✓
20 Cas-5-Clgly	Mucho	Poco	✓	...
21 Cas-V-NO2-gly	Mucho	Poco	✓	...

✓: si aparece ...: no aparece

En general, se observó que las casiopeínas que tienen como ligantes a bupiridinas y fenantrolinas, este último con sustituciones como grupos -H, -metilo en posición -4 ó -5, -dimetilos en posiciones -4,7 con acetilacetato y por último las que tienen un grupo -nitro y cloruro en posición -5 y en presencia de cualquier ligante secundario, presentan una interacción ligera con ADN superenrollado o circular en tiempos de incubación pequeño (30 minutos), ya que no se observan cambios significativos en las bandas respecto al control. Asimismo, presentan una característica en común, que es la notable aparición de una nueva banda que representa a ADN lineal y se acentúa con el incremento de la concentración de los compuestos. Esta nueva banda sugiere que puede estarse dando una interacción entre las casiopeínas con los fosfatos del esqueleto del ADN provocando la ruptura de los enlaces fosfodiéster y como consecuencia la ruptura de la interacción de puente de hidrógeno que existe entre los pares de bases del ADN. Este comportamiento sugiere que la interacción electrostática mencionadas puedan darse en el surco menor (grupo 1).

En contraste, las casiopeínas que contienen los siguientes sustituyentes: -tetrametiladas, -fenilados, -difenilado, presentan una interacción muy fuerte con el ADN ya que se observa una degradación tanto de ADN superenrollado como circular, dicha degradación, aumenta con el incremento de la concentración de los compuestos y con el tiempo de incubación. Se observó una disminución de ADN superenrollado y un aumento de ADN circular de 10 a 100  $\mu\text{M}$ , lo que sugiere un comportamiento de intercaladores (grupo 2). Por otro lado, se observó un tercer comportamiento, el cual presentó una nueva forma que es de mayor tamaño que el ADN circular. Este último comportamiento expone la formación de aductos, aglomerados como resultados de la interacción de las casiopeínas con ADN o un incremento del tamaño del ADN circular debido a la intercalación de los compuestos que extienden el tamaño del ADN circular (grupo 3).

De acuerdo a las diferencias antes mencionadas, se realizó una clasificación basado en los cambios sobre las isoformas del ADN que son provocados por la interacción molecular que se lleva a cabo entre de las casiopeínas y ADN (tabla 4.3). Por lo que se puede pensar en 3 modos de interacción con el ADN, como: interacción de intercalación e interacción en el surco menor o mayor del ADN.

Tabla 4.3: Clasificación de las casiopeínas según el modo de interacción con el ADN.

	<b>Interacción en los surcos (Grupo 1)</b>	<b>Intercaladores (Grupo 2)</b>	<b>Formación de aglomerados (Grupo 3)</b>
Compuestos de Coordinación mixtos de cobre II (Casiopeínas®)	Cas III-Da	Cas 5-Fenil	Cas III-Ma
	Cas III-ia	Cas II-Gly	Cas VII-Gly
	Cas III-Ba	Cas VI-Gly	Cas 4-Me-gly
	Cas 4 <sup>a</sup> -Mea	Cas III-La	Cas 5-Me-gly
	Cas 5 <sup>a</sup> -Mea		Cas VIII-gly
	Cas III-Ea		Cas I-Gly
	Cas 5 <sup>a</sup> -Cla		
	Cas 5 <sup>a</sup> -Cl-Gly		
	Cas III-5 <sup>a</sup> -NO <sub>2</sub> a		
	Cas V-NO <sub>2</sub> -Gly		

### 4.3. Estudio del modo de interacción de las casiopeínas con ADN mediante espectroscopía de UV-Vis.

La interacción entre una molécula ligada a un ácido nucleico conduce a cambios ópticos que pueden ser aprovechados para monitorear el proceso de enlace o interacción. El análisis de los cambios de absorbancia en los espectros, pueden revelar el tamaño de sitios de enlace, constante de asociación, constante de equilibrio de enlace, velocidad de reacción o interacción. Un análisis cualitativo permite el estudio de la interacción de moléculas pequeñas con ADN para determinar si existe interacción y de qué tipo. En este trabajo se llevó a cabo un estudio espectroscópico para estudiar el modo de interacción que existe entre las casiopeínas y ADN PBR322 a diferentes tiempos de incubación (0, 5, 10, 20, 40, 80 y 120 minutos).

Se obtuvieron los espectros de absorción electrónica en la región UV-visible para los siguientes compuestos, (Tabla 4.4). De cada grupo asignado mediante electroforesis, se eligieron distintas casiopeínas de tal forma que se estudiara la mayoría de compuestos pertenecientes a cada uno de ellos. Además, se evaluaron 3 compuestos control, los cuales han sido ampliamente estudiados y son de conocido comportamiento frente a ADN, cisplatino, bromuro de etidio y netropsina, que fungen como agente alquilante, intercalador e interacción en el surco menor, respectivamente; esto para tenerlos como control positivo e identificar los modos de acción que pueden llevar a cabo las casiopeínas con ADN.

Tabla 4.4: Controles positivos y Casiopeínas a evaluar mediante espectroscopía.

<b>Controles positivos</b>	<b>Interacción en los surcos (Grupo 1)</b>	<b>Intercaladores (Grupo 2)</b>	<b>Formación de aglomerados (Grupo 3)</b>
Cisplatino	CasIII-ia	Cas 5-Fenil	Cas III-Ma
Bromuro de etidio	Cas III-Ba	Cas II-gly	Cas 5-Me-gly
Netropsina	Cas 5 <sup>a</sup> -Mea Cas 5a-Cla Cas V-NO <sub>2</sub> -gly	Cas III-La	Cas VIII-gly Cas I-gly Cas III-Ha

Se analizaron los espectros de absorción de los compuestos que se eligieron como control positivo para establecer las características que permitieran clasificar los diferentes modos de unión que presentan con ADN, de este modo, poder determinar el modo de unión molecular entre las casiopeínas y el ADN.

#### 4.3.1. Interacción entre ADN y cisplatino

En la figura 4.6 se presenta el espectro electrónico de UV de la interacción de cisplatino con ADN. Para el cisplatino, se observa una absorbancia de 204 nm; cuando fue añadido el ADN, apareció una nueva banda a 261 nm, debida a las transiciones  $\pi - \pi^*$  que se dan entre las pares de bases apiladas adyacentes del ADN. En este sistema, el cambio de absorbancia que se sigue, es entonces sobre los cambios en la absorbancia que ocurre a 261 nm (en el ADN). Además, se observó que la intensidad de absorción se incrementó gradualmente de manera lenta de los 5 a 80 minutos de tiempo de incubación y luego aumentó considerablemente a las 24 horas de incubación. Como ya se mencionó, el aumento en la absorbancia acompañado por un desplazamiento hacia el rojo sugiere un daño en la estructura secundaria de la hélice del ADN.

Se observó que a concentraciones de ADN y cisplatino constantes, pero con aumento en el tiempo de incubación, se obtuvo un desplazamiento batocrómico y un efecto hiperocrómico (11.15%) (figura 4.6), este último debido a que los agentes alquilantes causan deformaciones en la estructura del ADN que a su vez provoca que las interacciones de puente de hidrógeno, que se dan naturalmente entre los pares de bases, se pierdan asimismo, existe una perturbación del apilamiento entre las pares de bases adyacentes, lo que en conjunto se traduce en un efecto hiperocrómico y batocrómico.

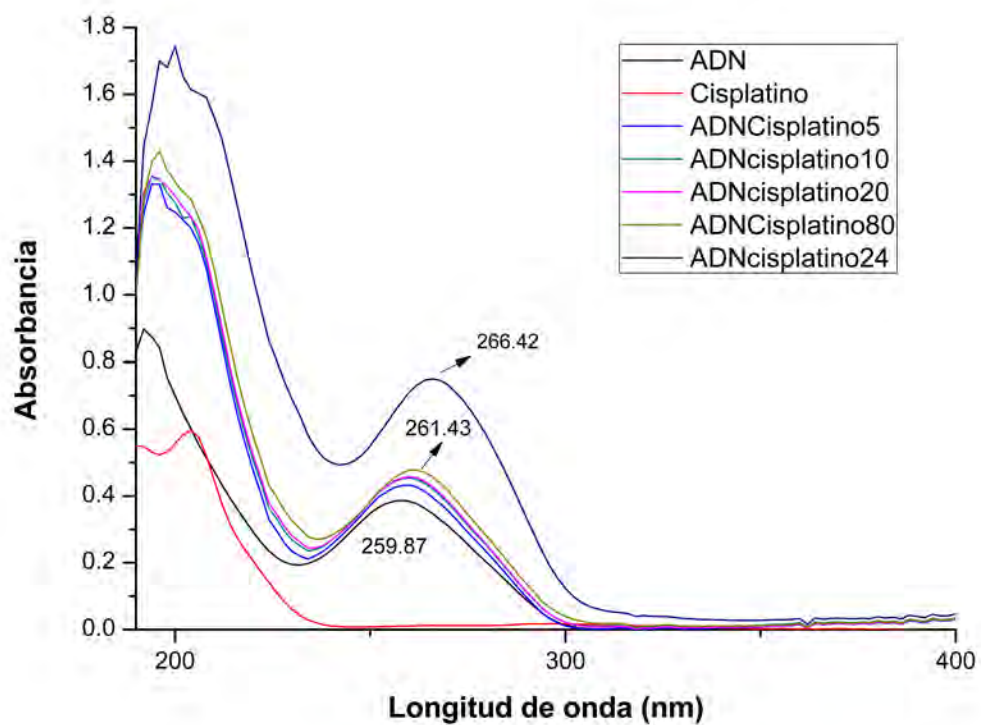


Figura 4.6: Espectro electrónico de cisplatino (100  $\mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 (20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación, menos para el 24 que significa horas.

### 4.3.2. Interacción entre ADN y bromuro de etidio

En la figura 4.7 se presenta el espectro electrónico de UV de la interacción del bromuro de etidio con ADN. La disolución de bromuro de etidio (BrEt) sin ADN presenta una fuerte coloración naranja que pudo ser seguida en la región visible a la longitud de onda de 478 nm debida a la transferencia de carga y otra a 285 nm correspondiente a las transiciones electrónicas entre los orbitales  $\pi - \pi^*$  del anillo.

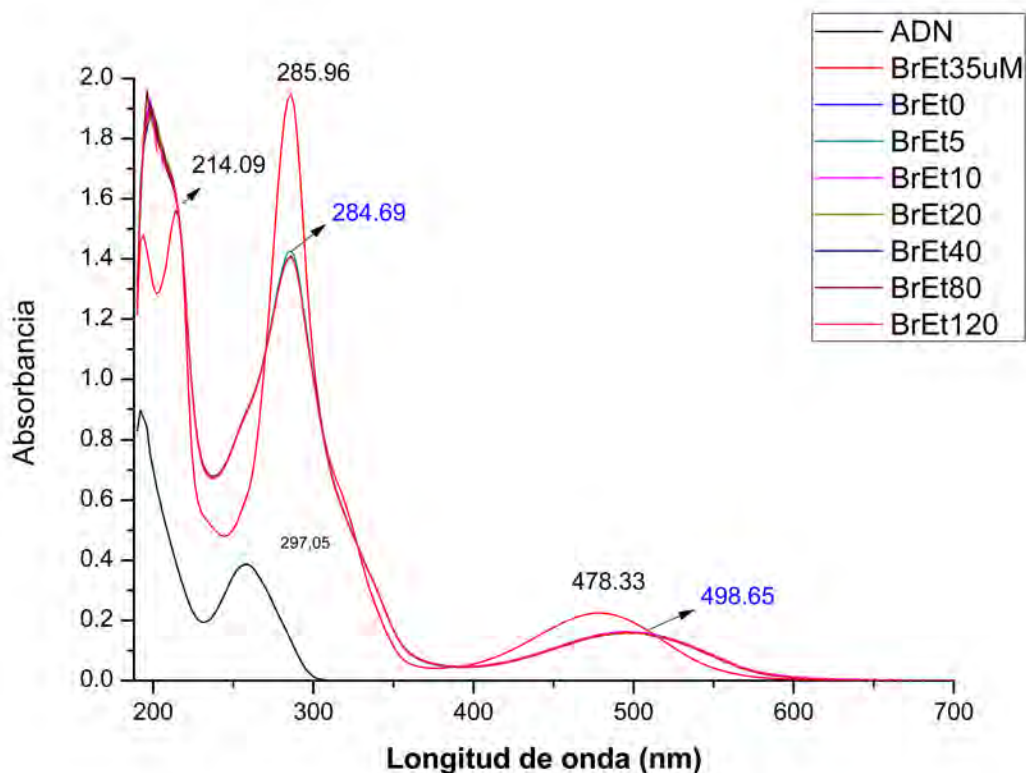


Figura 4.7: Espectro electrónico de bromuro de etidio ( $35 \mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ). Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

Cuando se llevó a cabo la incubación de BrEt con ADN se observó que a concentraciones constantes, pero con aumento en el tiempo de incubación, se apreció un efecto batocrómico (20 nm) en la banda de 478 nm y un efecto hipocrómico del 27.52 en la banda de 285.96 nm (figura 4.7), ambos desplazamientos son debido a que los agentes intercalantes llevan a cabo interacciones entre el cromóforo aromático del ligante y los pares de bases de ADN causando una mayor estabilidad en la estructura del ADN; además se ha encontrado que el grado de hipocromismo es comúnmente consistente con la fuerza de la interacción intercalativa [84].

### 4.3.3. Interacción entre ADN y netropsina

Como último control positivo, se evaluó la interacción de netropsina con ADN. Para la disolución de Netropsina sin ADN se observan dos máximos a las longitudes de onda de 240 y 297 nm correspondiente a las transiciones electrónicas entre los orbitales  $\pi - \pi^*$  de los anillos con heteroátomos (figura 4.8). Cuando se llevó a cabo la interacción de ADN y netropsina a concentraciones constantes pero con aumento en el tiempo de incubación, se observaron dos bandas, la primera que es más intensa se encuentra a 253 nm y una segunda banda (menos intensa) a 311 nm.

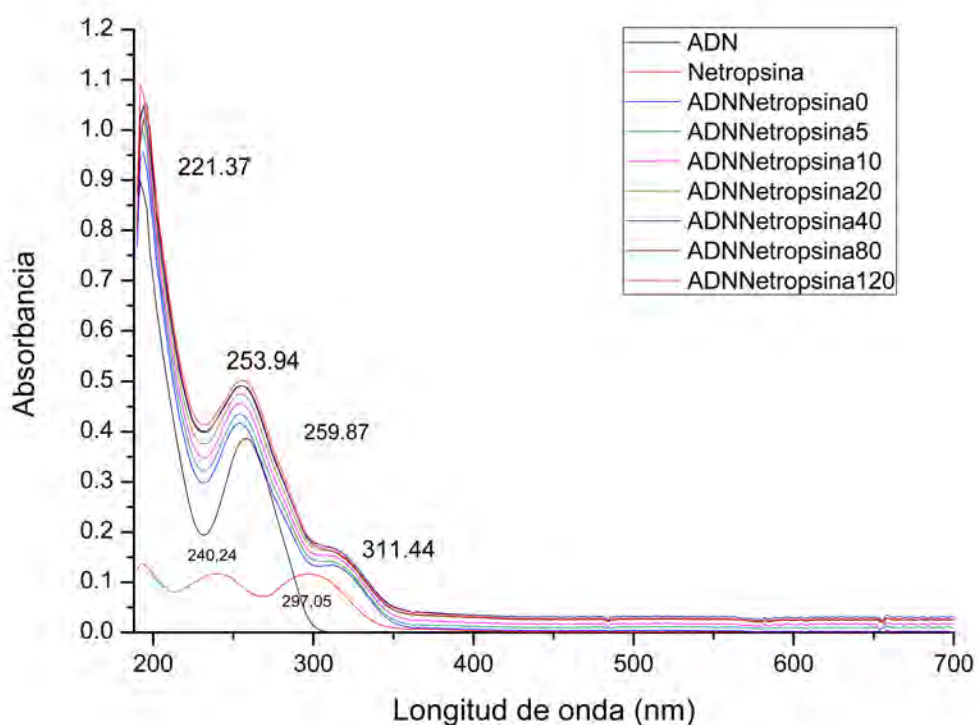


Figura 4.8: Espectro electrónico de netropsina ( $35 \mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ). Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

Las bandas mencionadas, presentaron un efecto hipercrómico (20.29 %) (figuras 4.8 y 4.9). Este efecto puede deberse a que los agentes que interaccionan en el surco menor usualmente rompen las cadenas de ADN, que provocan cambios en la cadena de doble hélice donde los pares de bases pierden la interacción de apilamiento entre los pares adyacente lo que conduce al aumento de la absorbancia por la mayor exposición de los pares de bases. También se observó que la absorbancia aumentó de manera gradual de 0 a 120 minutos de tiempo de incubación.



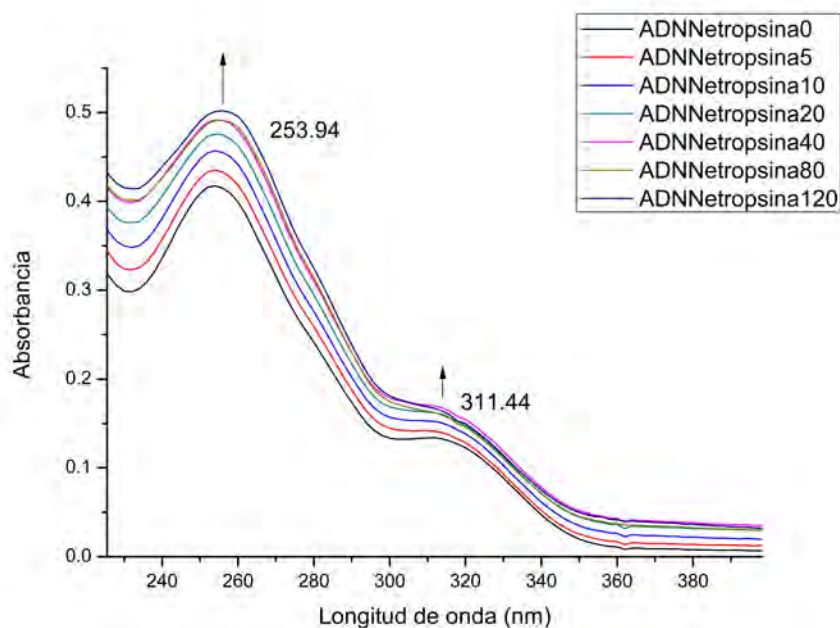


Figura 4.9: Espectro electrónico de netropsina ( $35 \mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ). Efecto hipercrómico debido a la interacción de netropsina con ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

Con base en los resultados obtenidos por UV-visible, se describirán las características generales que presentaron los compuestos empleados como controles positivos de: interacción covalente, intercalación e interacción en el surco menor, cuando son expuestos con ADN con un aumento en el tiempo de incubación a  $37^\circ\text{C}$ .

1. Cuando se llevó a cabo la interacción de cisplatino con ADN, se observó un efecto hipercrómico, este puede deberse a la deformación en las cadenas del ADN como resultado de la formación de enlaces covalentes entre el metal platino y el N7 de los nucleótidos, en especial, al N7 de la guanina (20). La mayor exposición de las pares de bases del ADN, se traduce en el aumento de la absorbancia de la banda adjudicada a los anillos heterocíclicos de los nucleótidos, que absorben la luz UV con un máximo cercano a 260 nm. También se observó un desplazamiento batocrómico de 20 nm, debido a la interacción covalente entre el platino y las bases que provoca perturbaciones en los enlaces de hidrógeno que se dan naturalmente en el ADN de doble cadena. Entonces, un efecto hipercrómico acompañado de un desplazamiento batocrómico son evidencia de una interacción covalente entre una molécula y ADN de doble cadena.

2. En la interacción entre el bromuro de etidio y ADN se observó un efecto hipocrómico que puede ser por la interacción de apilamiento entre los pares de bases del ADN y el cromóforo aromático del ligante. Las transiciones  $\pi - \pi^*$  fueron menores, lo que se traduce en la disminución de la absorbancia ya que se requiere menor energía para lograr la transición. Estas características pueden sugerir una interacción de intercalación entre una molécula y los pares de bases del ADN de doble cadena.
3. El efecto hipercrómico observado de la interacción entre la netropsina y ADN, surge principalmente debido a la presencia de cationes cargados que se unen al ADN mediante atracción electrostática con el grupo fosfato del esqueleto de ADN (principalmente con los oxígenos), provocando así una contracción y un daño global a la estructura secundaria del ADN. Estas particularidades pueden ser aludidas a una interacción en el surco menor entre una molécula y ADN de doble cadena.

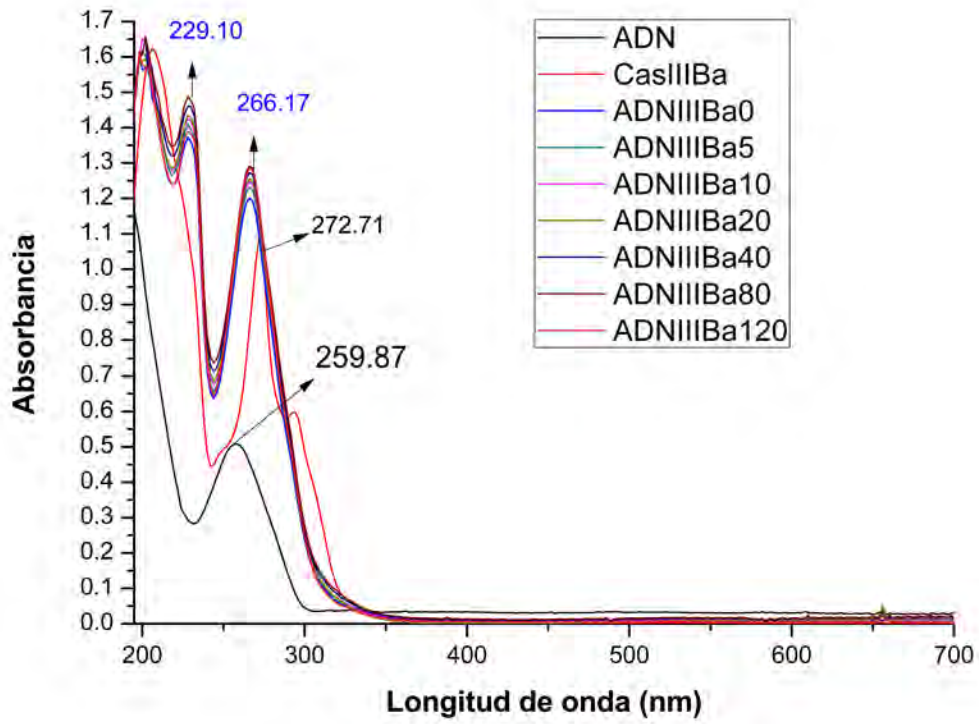
#### 4.3.4. Interacción entre ADN con casiopeínas

Basado en a las características antes mencionadas, se estudió a un conjunto de casiopeínas con el objeto de obtener información acerca del modo de unión molecular que presentan frente a ADN de doble cadena. La concentración que se empleó de Casiopeína-ADN (1:1; moles de casiopeína: moles de pares de bases), se eligió para evitar tener la degradación que se observó en los geles de agarosa con lo que se redujo las variables que pueden afectar las lecturas ópticas sobre el sistema.

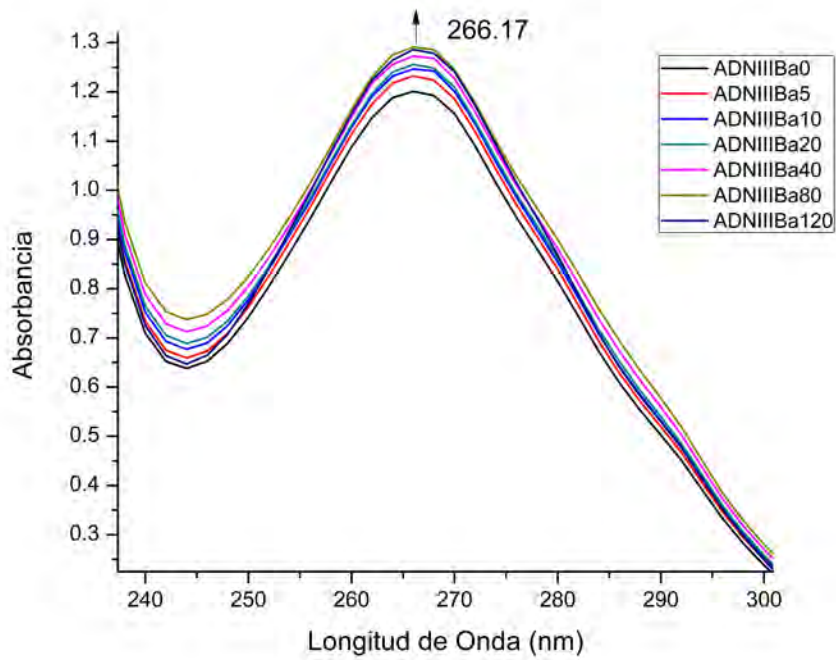
En este estudio, los cambios ópticos que se analizaron fueron sobre las bandas adjudicadas a las transiciones  $\pi - \pi^*$  del complejo (271-286 nm), debido a la premisa de que la fenantrolina, que forma parte de la estructura de las casiopeínas, se intercala entre los pares de bases del ADN. Los cambios observados en esta banda, fueron usados para observar el modo de unión de las casiopeínas-ADN.

Los resultados obtenidos por UV-Vis de las interacciones de Casiopeína-ADN, muestran dos comportamientos diferentes. El primer comportamiento es un efecto hipercrómico y el segundo es un efecto hipocrómico, todos ellos acompañados de un desplazamiento hipsocrómico referente a las bandas ( $\pi - \pi^*$  del compuesto de coordinación de cobre (II) libre. Mencionado lo anterior, se analizaron los dos grupos obtenidos para explicar su posible modo de unión molecular con ADN y observar las características estructurales que tienen en común los compuestos de cobre (II), que inducen a dichos efectos.

A continuación, se describirá una casiopeína por cada comportamiento observado, ya que en general, cada grupo presentan la misma forma de interacción con ADN. Todas las interacciones que fueron estudiadas entre las casiopeínas-ADN, se encuentran en el anexo B. En la figura 4.10, se muestra el espectro de UV de la casiopeína III-Ba ( $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetato})\text{NO}_3]$ ) en forma libre y cuando interacciona con ADN. Estos resultados mostraron un efecto hiperocrómico de 7.42 %, se pudo apreciar que este efecto rebasa la banda de las interacciones  $\pi - \pi^*$  del apilamiento de la fenantrolina contenida en la casiopeína libre, posiblemente a la contribución de las transiciones  $\pi - \pi^*$  de los pares de bases del ADN que están en forma más libre, provocado por la interacción de las casiopeínas con los fosfatos del ADN que induce a la pérdida de los puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarias y la distorsión de la doble hélice. Además, se observa un efecto hipsocrómico, este hecho, nos permite decir que la interacción es de forma electrostática ya que de haber interaccionado de forma covalente se podría observar un efecto batocrómico significativo.



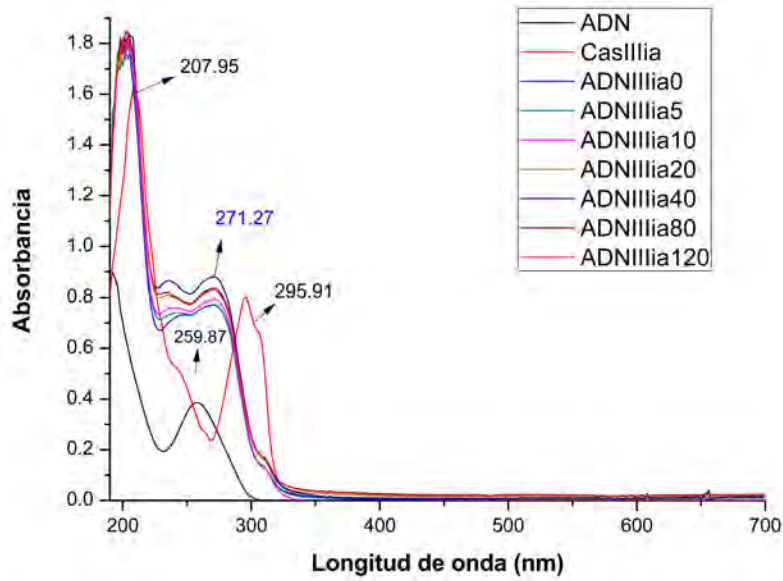
(a)



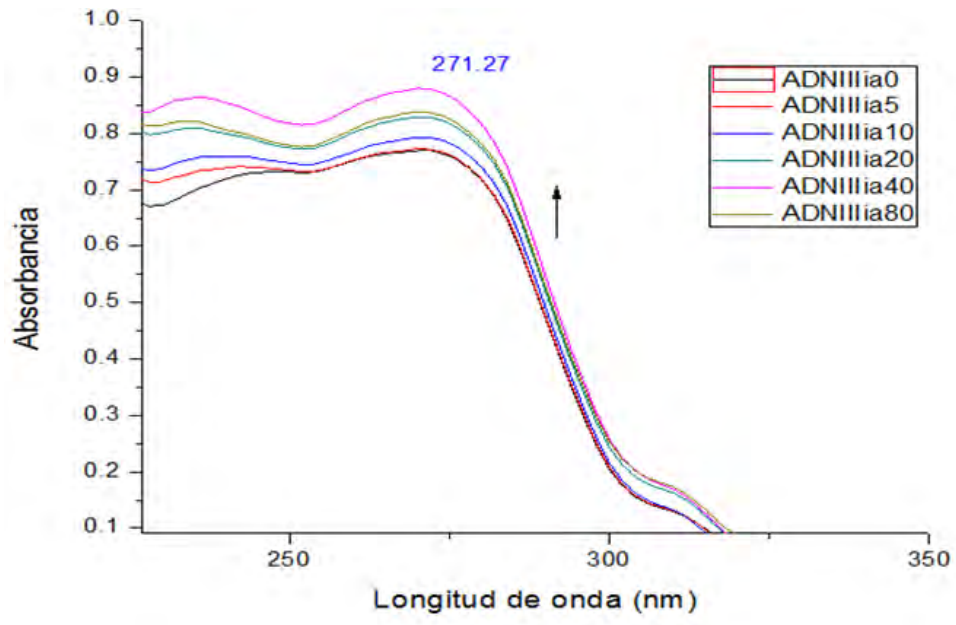
(b)

Figura 4.10: Espectro electrónico de Casiopeína-III-Ba ( $35 \mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20\text{ng}/\mu\text{L}$ ). A) Efecto hipercrómico debido a la interacción de III-Ba con ADN. B) seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi - \pi^*$  de la interacción Cas-III-Ba-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

En la gráfica 4.11, se muestra el espectro de UV de la casiopeína III-ia ([Cu(4,4'-dimetil-2,2'bipiridina)(acetilacetato)NO<sub>3</sub>] ) en forma libre y cuando interacciona con ADN. Cabe mencionar, que este compuesto se encuentra en fase clínica 1. Estos resultados mostraron un efecto hipercrómico de 12.20 %, se observó que este efecto rebasa la banda de las interacciones  $\pi - \pi^*$  del apilamiento de la fenantrolina contenida en la casiopeína libre, posiblemente dada la contribución de las transiciones  $\pi - \pi^*$  de los pares de bases del ADN que están en forma más libre, provocado por la interacción de las casiopeínas con los fosfatos del ADN que induce a la pérdida de los puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarias y la distorsión de la doble hélice. Sin embargo, la primera interacción que esta casiopeína tiene con ADN (tiempo 0), provoca una disminución en la absorbancia referente a la banda de la casiopeína libre, esto puede atribuirse a la pérdida de las interacciones intermoleculares que se dan entre las moléculas de las casiopeínas. Esta casiopeína presenta efecto hipercrómico del tiempo 0 a los 40 minutos de incubación; sin embargo, a partir de los 80 minutos se aprecia una disminución en la absorbancia, lo que puede sugerir un modo de intercalación para estos tiempos. Además se observa un efecto hipsocrómico, este hecho, nos permite decir que la interacción es de forma electrostática ya que de haber interaccionado de forma covalente, se podría observar un efecto batocrómico significativo.



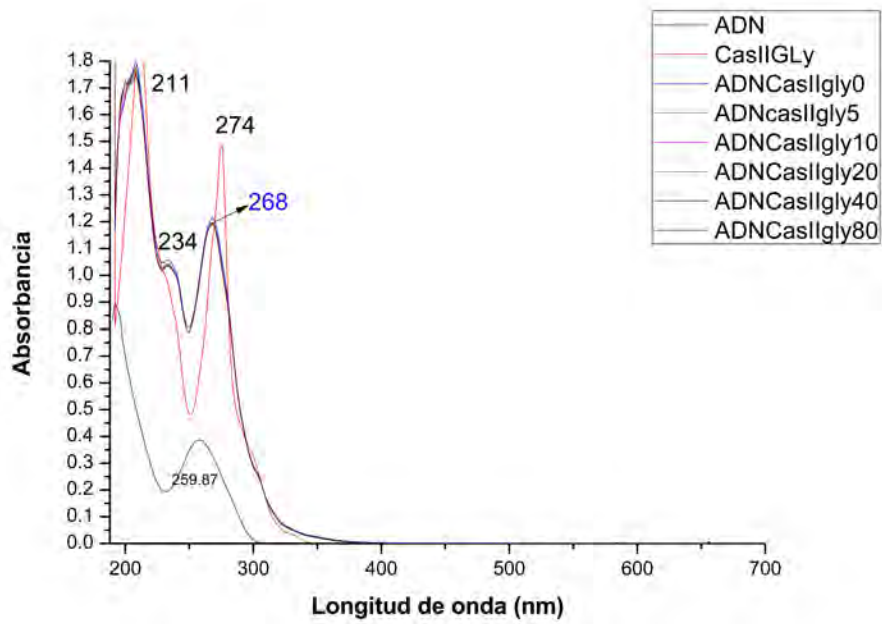
(a)



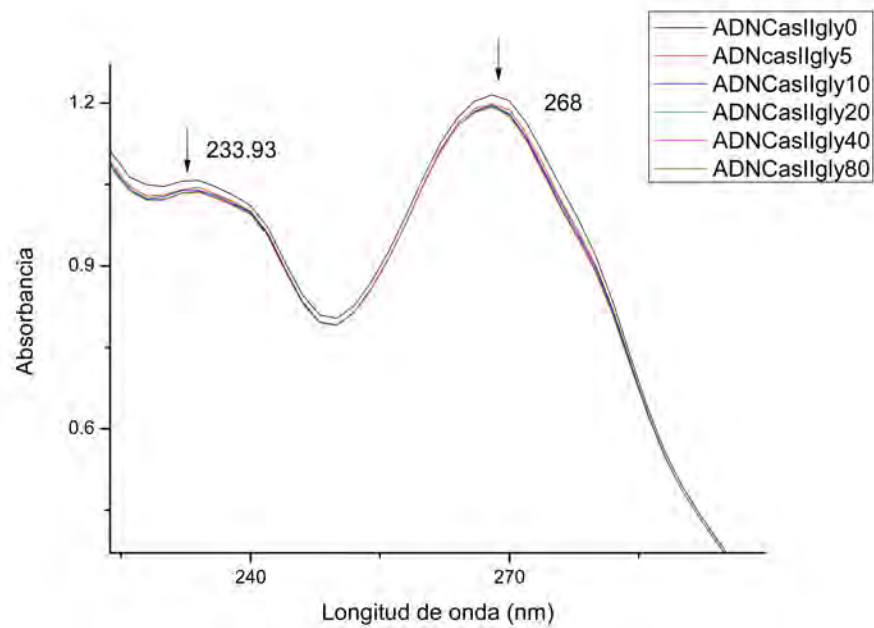
(b)

Figura 4.11: Espectro electrónico de Casiopeína-III-ia ( $35 \mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20\text{ng}/\mu\text{L}$ ). A) Efecto hiperocrómico debido a la interacción de III-ia con ADN. B) seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi - \pi^*$  de la interacción Cas-III-ia-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

A continuación, se describirán dos compuestos de coordinación de cobre, que presenta comportamiento contrario a las casiopeínas antes expuestas. En la figura 4.12, se muestra el espectro de UV de la casiopeína II-gly ( $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})\text{NO}_3]$ ) en forma libre y cuando interacciona con ADN. Estos resultados mostraron un efecto hipocrómico de 19.65 %. Se observó, que al momento de llevarse a cabo la primera interacción, la absorbancia de la banda a 274 nm de las transiciones  $\pi - \pi^*$  de la casiopeína, disminuye gradualmente conforme aumenta el tiempo de incubación hasta 268 nm; además de presentar un desplazamiento hacia el azul. El efecto espectral observado se atribuyó al orbital  $\pi^*$  de la fenantrolina intercalada que puede estarse acoplando con el orbital  $\pi$  de los pares de bases, disminuyendo así las energías de transición  $\pi - \pi^*$ . Por otro lado, el acoplamiento de los orbitales  $\pi^*$  están parcialmente llenos, disminuyendo así las probabilidades de transición.



(a)

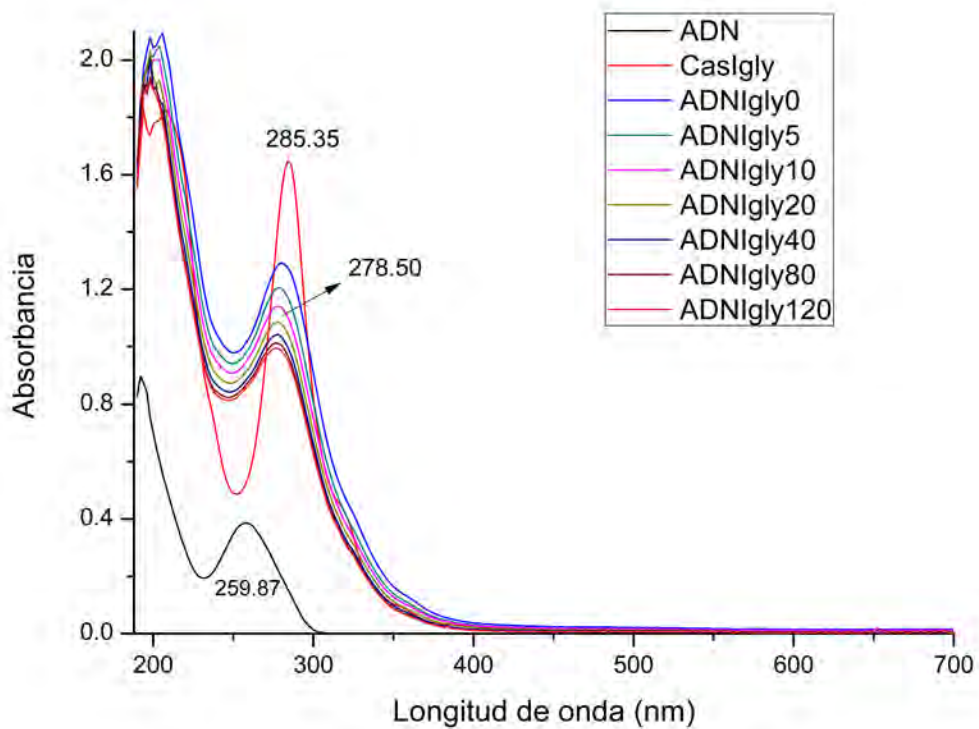


(b)

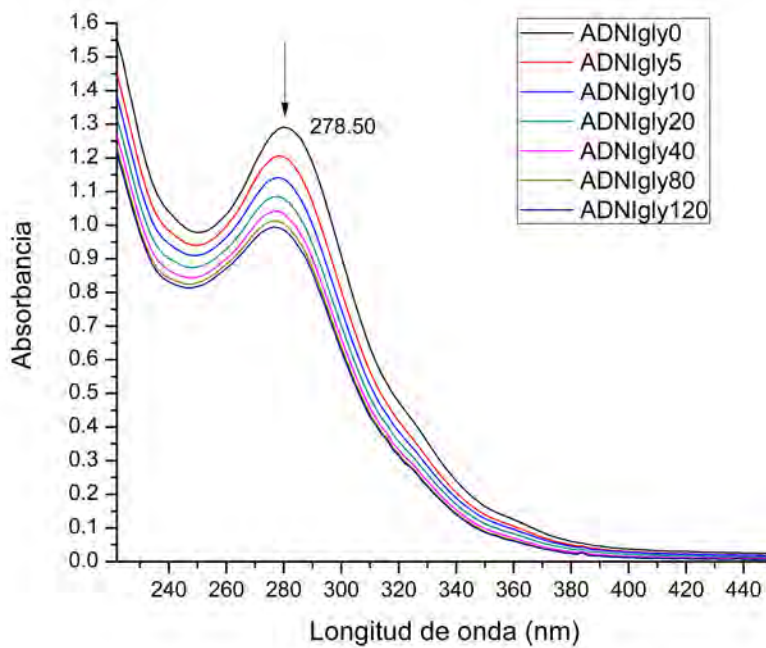
Figura 4.12: Espectro electrónico de Casiopeína-II-gly ( $35 \mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20\text{ng}/\mu\text{L}$ ). A) Efecto hipercrómico debido a la interacción de II-gly con ADN. B) seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi - \pi^*$  de la interacción Cas-II-gly-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.



En la gráfica 4.13, se presenta el espectro electrónico de UV de la interacción de la Cas-I-gly ( $[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})\text{NO}_3]$ ) en forma libre y cuando interacciona con ADN. Cuando se llevó a cabo la interacción se observó un efecto hipocrómico del 40.18 % (figura 4.13) referente a la banda de 285 nm, y un efecto hipsocrómico de 7 nm. El efecto espectral observado al igual que para la casiopeína II-gly, se atribuyó a que la fenantrolina puede intercalarse con los pares de bases del ADN, disminuyendo así las energías de transición  $\pi - \pi^*$ , que causa una mayor estabilidad en la estructura del ADN.



(a)



(b)

Figura 4.13: Espectro electrónico de Casiopeína-I-gly ( $35 \mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20\text{ng}/\mu\text{L}$ ). A) Efecto hiperocrómico debido a la interacción de I-gly con ADN. B) seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi - \pi^*$  de la interacción Cas-I-gly-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

A manera de resumen, en las figuras 4.14 y 4.15, se muestran las gráficas obtenidas al evaluar los cambios en los máximos de las longitudes de onda de las transiciones  $\pi - \pi^*$  de las casiopeínas a diferentes tiempos de incubación, que se obtuvieron de la interacción con ADN. Como ya hemos expuesto, un efecto hipercrómico puede ser resultado de una interacción en el surco menor entre las casiopeínas con los fosfatos del ADN; mientras que un efecto hipocrómico, puede ser consecuencia de la intercalación del ligante de las casiopeínas entre los pares de bases del ADN. En estas gráficas, se agruparon las casiopeínas que mostraron efecto hipercrómico e hipocrómico, para observar si existen características estructurales en común entre los compuestos de coordinación que permitan predecir el modo de interacción frente ADN. En la tabla 4.5 se muestra el porcentaje hipercrómico e hipocrómico.

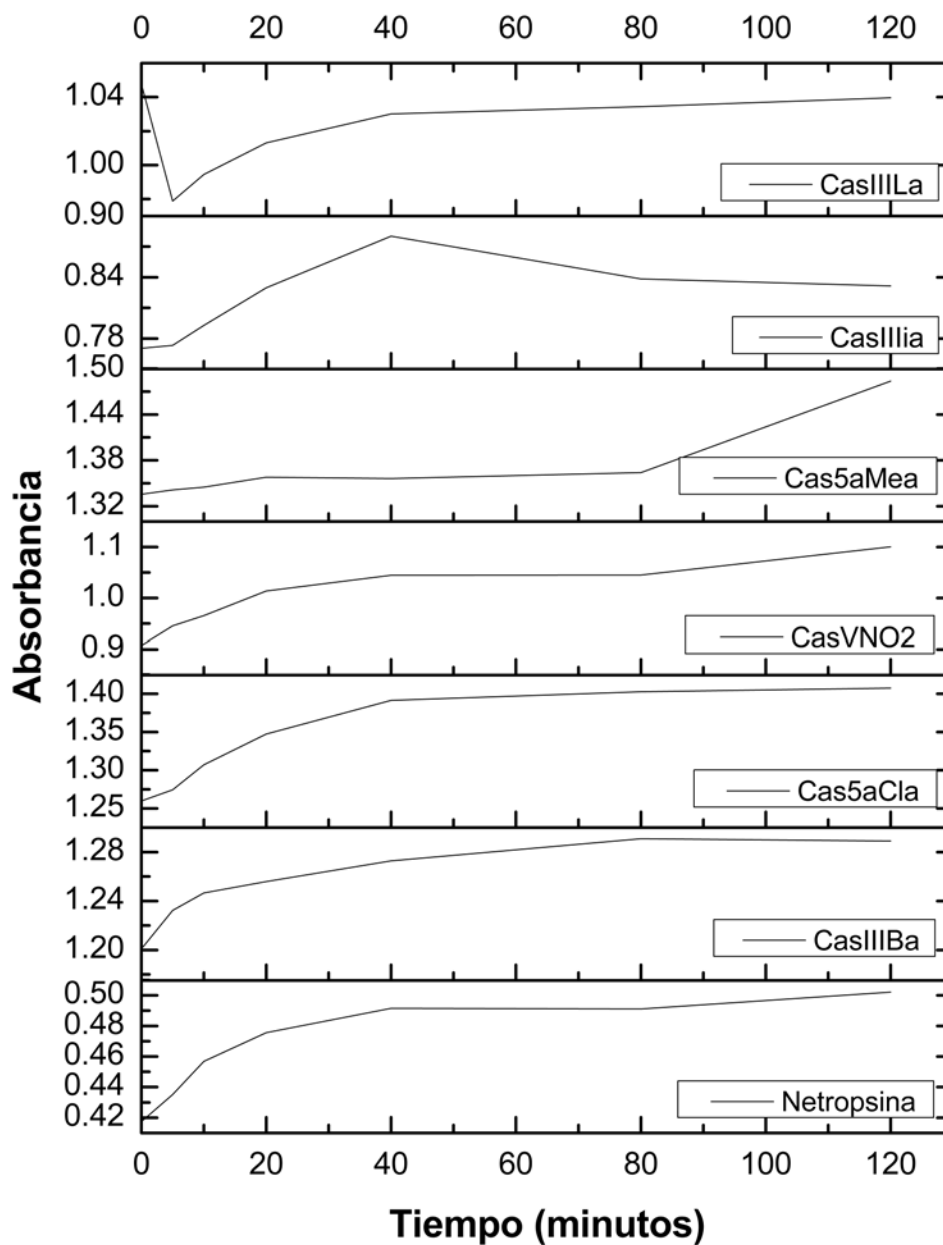


Figura 4.14: Grafica de los máximos de absorbancia de las transiciones  $\pi - \pi^*$  vs tiempo de incubación Casiopeínas-ADN (1:1). Grupo de casiopeínas que presentan efecto hiperocrómico.

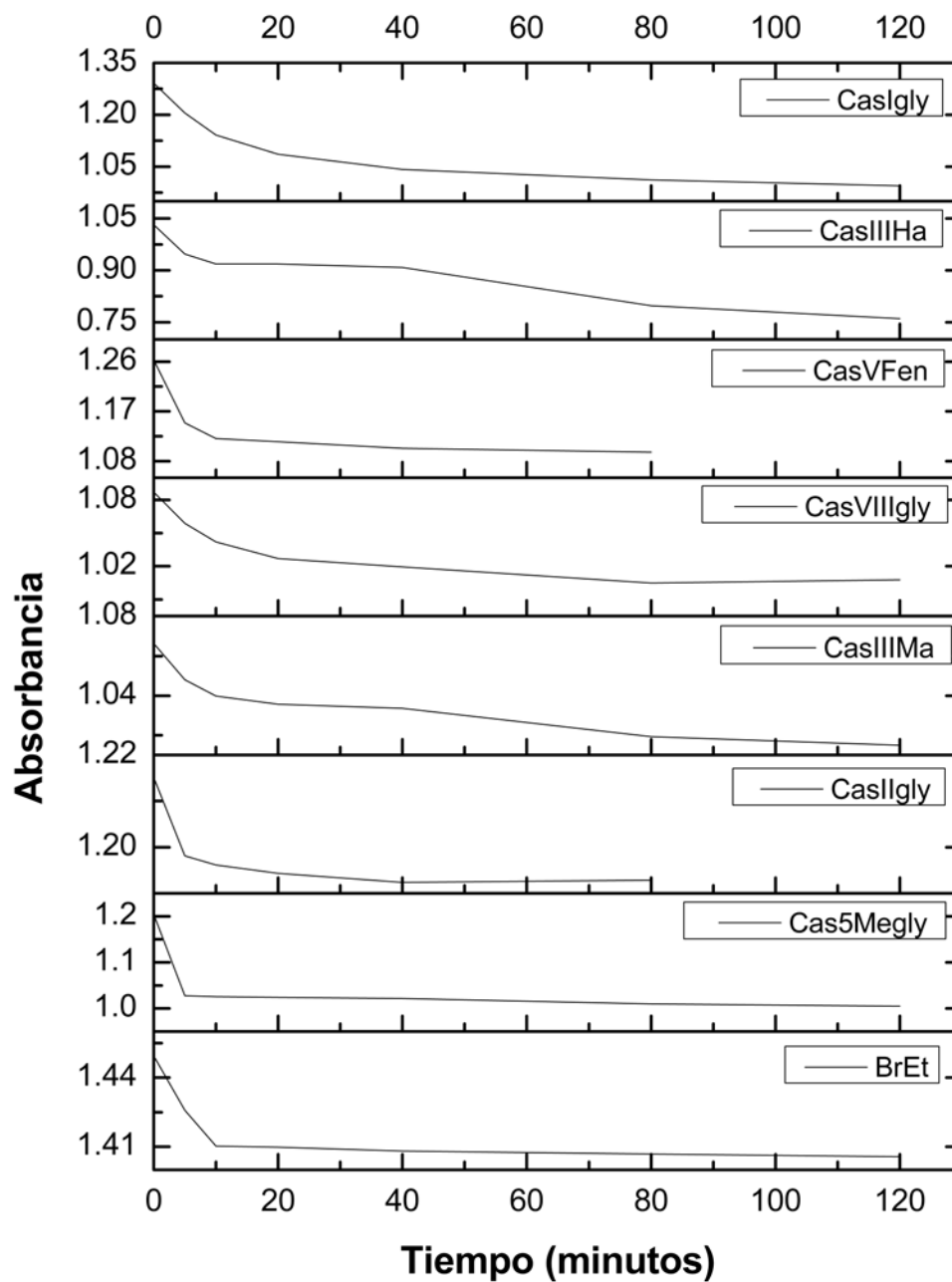


Figura 4.15: Grafica de los máximos de absorbancia de las transiciones  $\pi - \pi^*$  vs tiempo de incubación Casiopeínas-ADN (1:1). Grupo de casiopeínas que presentan efecto hipocrómico.

Tabla 4.5: Resumen de los resultados observados por UV de las interacciones entre las casiopeínas con ADN.

Compuesto	Grupo de electroforesis	$\lambda$ (nm) de la casiopeína	$\lambda$ (nm) Casiopeína-ADN	Efecto observado
Cas III-ia	1	295.91	271.27	12.2 ↑
Cas III-Ba	1	271.71	266.17	7.42 ↑
Cas 5-Mea	1	276.77	269.19	9.85 ↑
Cas III-La	2	281.43	270.37	23.01 ↑
Cas 5 <sup>a</sup> -Cla	1	276.01	267.15	10.97 ↑
Cas V-NO <sub>2</sub> -gly	1	275.13	263.14	17.47 ↑
Cas 5Me-gly	3	277.10	269.22	11.26 ↓
Cas II-gly	2	274.00	268.00	19.65 ↓
Cas III-Ma	3	277.72	269.47	20.87 ↓
Cas VIII-gly	3	279.32	271.46	31.38 ↓
Cas V-Fe	2	281.46	268.83	16.16 ↓
Cas III-Ha	—	285.96	278.25	34.18 ↓
Cas I-gly	3	285.35	278.50	40.18 ↓

# Capítulo 5

## Discusión de resultados

En busca de comprender el modo de interacción de las casiopeínas, en el presente trabajo se utilizaron dos técnicas con el fin de evaluar si las diferencias estructurales de los compuestos de coordinación de cobre (II) (tabla 2.1) influyen en su modo de unión con ADN. Para esto se utilizó electroforesis en gel de agarosa y espectroscopia de UV-Vis. Los resultados revelaron que todas las casiopeínas interactúan de menor o mayor medida con ADN dependiendo de su estructura. Además, estos compuestos interactúan de varios modos y la forma e intensidad están influenciadas por sus ligantes y sustituyentes.

Los resultados de electroforesis observados para las casiopeínas con fenantrolina, muestran que la forma e intensidad de interacción depende también de sus sustituciones en el anillo; por ejemplo, se observó que las sustituciones con grupo –metilo en las posiciones -5, -5,6 son mayor o más intensa respecto a las casiopeínas con fenantrolina que presentan sustituciones por –metilos en las posiciones -4, -4,7. Este efecto también fue observado por Chikira (52-53) ya que las sustituciones en las posiciones 4 y 7 de la fenantrolina, disminuía la asociación entre el compuesto de Cobre (II) y ADN, mientras que las sustituciones en las posiciones 5 y 6 ayudan a estabilizar la interacción. En el grupo de trabajo se tienen datos de la constante de asociación las casiopeínas II-gly y VI-gly (sustituciones en 4,7 y 5,6, respectivamente) con ADN-TB, donde la  $K_b$  para el primero es de  $7.15 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , mientras que para el segundo es ligeramente mayor  $7.89 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Estos datos apoyan los resultados obtenidos en electroforesis ya que se observó un mayor efecto en cuanto a la velocidad de interacción.

Con este perfil, se observó que las casiopeínas con fenantrolinas que tiene sustituyentes como: -5-Cl, -5-NO<sub>2</sub>, -3,4,7,8-tetrametil, 5-fenil, 4,7-difenil presentan mayor interacción con ADN, en ese orden. A los 30 minutos de incubación ya tenían una interacción significativa con ADN superenrollado incluso con ADN circular a concentraciones de  $500 \mu\text{L}$ , 1

y 2 mM, provocando su degradación. Esta tendencia también se observa en la actividad biológica de diversas pruebas in vitro en varias líneas celulares, expuestas en un estudio QSAR (63) sobre las mismas 21 casiopeínas que se tienen como estudio en este trabajo.

Además existe una mayor influencia del ligante glicinato sobre el modo y afinidad de la interacción con ADN en comparación del ligante acetilacetato. Este dato no se observa en el estudio QSAR, ya que mencionan que el ligante glicinato no tiene influencia en la actividad biológica como la que aporta el acetilacetato.

Los compuestos de coordinación que causan cortes en el ADN, son en general compuestos que tienen bipyridina y fenantrolinas, este último con las siguientes sustituciones -H, -metil, -dimetil, -Cl, -NO<sub>2</sub>. Lueth, reportó que los ligantes bipyridinas o fenantrolinas que forman parte de unos complejos de cobre (II) tienen interacciones de apilamiento intramolecular con la 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato.

En general, podemos confirmar cada sustituyente afecta en el modo de interacción de las casiopeínas con ADN. Parece ser que la interacción de las casiopeínas se lleva a cabo entre el ligante diimina y los pares de bases del ADN.

En la literatura sugieren que el modo de unión al ADN de complejos con fenantrolinas es intercalación o intercalación parcial, basada en el hipocromismo en los espectros UV. Sin embargo, algunos complejos de cobre, níquel y zinc presentan hipercromismo que son mucho más bajos que los de los análogos de 2,2'-dipiridilamina, lo que sugiere la inserción parcial del anillo fenantrolina coordinado en los pares de bases de ADN (84). En este trabajo se observaron dos tipos de comportamientos, el primero presenta un efecto hipercrómico y el segundo un efecto hipocrómico.

El efecto hipercrómico que se observó en algunas de las casiopeínas estudiadas, puede atribuirse al modo de unión electrostático. Sin embargo, se propone que el efecto hipercrómico observado puede deberse principalmente a la presencia de ion Cu (II) que se une al ADN por atracción electrostática a los oxígenos de los fosfato de la cadena principal del ADN, causando así una contracción y un daño global a la estructura secundaria del ADN (85).

Las casiopeínas que presentan dentro de su estructura el ligante bipyridina, fenantrolinas con los siguientes sustituyentes: -H, -metilos, -dimetilos, -cloruro junto con el ligante acetilacetato. Y la que contiene al grupo -nitro con fenantrolina y glicinato, presentaron hipercromismo a los tiempos de estudio. Por otro lado, la casiopeína III-ia



durante los 40 minutos de incubación presento un efecto hipercromico, los que indica que posiblemente tiene una interacción en el surco menor empero, de los 80 a los 120 minutos se observó un efecto batocrómico, esto sugiere que podría estarse intercalando después de estar interaccionando en el surco.

El efecto hipocrómico se observó en las casiopeínas de mayor tamaño, comparadas con las que presentaron efecto hipercrómico. Las casiopeínas con fenatrolinas que cuentan con 3,4,7,8-tetrametil, -5-fenil, 5,6-difenil con acetilacetato como ligante. Además las casiopeínas que tienen los siguientes sustituyentes sobre la fenantrolina 4 o 5-metil, 4,7 o 5,6-dimetil, 3,4,7,8-tetrametil, 5,6-difenil con glicinato también presentan efecto hipocrómico. Este efecto lo han observado otros grupos que estudiaron compuesto de coordinación con diversos metales como cobre, níquel, zinc y Holmio con fenantrolina como uno de los ligantes (86-88). La intercalación da como resultado un efecto hipocrómico. El porcentaje de hipocrómismo es comúnmente consistente con la fuerza de la interacción intercalativa.

Tamilarasan expuso que compuestos que cuentan con sustituyentes voluminosos como fenilos, disminuye la interacción de estos con los pares de bases del ADN evitando la intercalación, sin embargo sus experimentos de UV-vis y fluorescencia sugirieron que estos compuestos pueden estarse intercalando mediante la inserción por el surco mayor. Puede ser posible si la energía de unión es suficiente para superar la barrera contra la rotación del grupo fenilo en el plano (89).

El grupo 1 que se obtuvo a partir de electroforesis coincide con los compuestos que presentaron efecto hipercrómico en UV-vis. Y las casiopeínas que se encuentran en el grupo 2 y 3 en la clasificación por electroforesis coinciden con los compuestos que mostraron efecto hipocrómico. Dada esta situación, podemos decir que las casiopeínas que mostraron actividad nucleasa en los geles (aparición de ADN lineal) pueden estar cortando al ADN de forma que el cobre de las casiopeínas interacciona con los oxígenos de los fosfatos rompiendo las interacciones puente de hidrógeno que se da naturalmente entre las pb de tal forma que queden expuestas y contribuyan a un aumento de absorbancia. Por otro lado, las casiopeínas que presentaron una disminución en la forma superenrollada con un aumento en la forma circular del ADN presentaron un efecto hipocrómico que sugiere que el modo de unión de estas casiopeínas es de forma intercalativa.

Los grupos obtenidos por las dos técnicas no coincide con la clasificación realizada por Cortés [81], esto puede ser debido a que la simulación se realizó con un fragmento de ADN (dodecamero) y la interacción no se restringió a un solo sitio, lo que condujo a que las

casiopeínas tuvieran interacciones con los pares finales del ADN, estas interacciones no son reales en un sistema biológico. Sin embargo, la casiopeína III-Ha ( $[\text{Cu}(4,7\text{-difenil},1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$ ) tanto en el estudio teórico como en el experimental, se propone que su modo de interacción con el ADN es por intercalación.

# Capítulo 6

## Conclusiones

El mecanismo y la intensidad de interacción de las casiopeínas y el ADN están influenciados por ambos ligandos coordinados al cobre (ligandos primarios y secundarios), los sustituyentes de los ligandos primarios tienen un rol importante en el modo de unión.

El anillo aromático extendido del ligante fenantrolina favorece la interacción con ADN por cualquier modo de unión ya sea, intercalación o interacción en el surco menor o mayor.

Para los tres grupos de Casiopeínas obtenidos por electroforesis, la cantidad de ADN superenrollado disminuye a medida que aumenta la concentración del complejo de cobre. Mientras que para los grupos 2 y 3 se observa un aumento en la intensidad de ADN circular, que sugiere que su modo de unión molecular sea por intercalación.

Los perfiles obtenidos sugieren que la interacción de las casiopeínas ensayadas con ADN plasmídico desencadenó un mecanismo molecular de escisión sin emplear agentes reductores endógenos o exógenos. Dada esta situación, podemos decir que las casiopeínas interaccionan de forma directa con ADN. De acuerdo a los resultados de UV-vis se obtuvieron dos comportamientos diferentes: efecto hipercrómico y un efecto hipocrómico, los cuales sugieren que las casiopeínas pueden unirse al ADN mediante interacción en los surcos o intercalación, respectivamente.

Parece ser que el modo de unión entre las casiopeínas y el ADN, es entre el ligante aromático y las pares de bases. Las casiopeínas que contienen biperidinas y fenantrolinas con los siguientes sustituyentes, -H, -Cl, -NO<sub>2</sub>) y acetilacetato o glicinato como ligante secundario, presentan interacción con el surco menor. Por otro lado, las casiopeínas con fenantrolinas que están metiladas o -dimetiladas y que cuentan con el ligante acetilacetato también presentan este comportamiento. Al contrario de esta situación, las

casiopéínas que están -metiladas o -dimetiladas, pero que contienen al ligante secundario glicinato tienen un modo de unión de intercalación entre las pb del ADN.

El modo de unión para las casiopéínas que contienen más sustituyentes (-3,4,7,8-terametil) o sustituyentes voluminosos (5-fenil, 4,7-difenil), presentan un modo de unión molecular de intercalación. En este trabajo proponemos, que el modo de unión que se lleva a cabo entre las casiopéínas que contienen sustituyentes fenilos y el ADN es por la intercalación o intercalación parcial vía surco mayor.

# Referencias

- [1] <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es#conjunto-de-enfermedades>
- [2] [http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color\\_palette=default&projection=natural-earth](http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?mode=cancer&mode_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default&projection=natural-earth) (1.1).
- [3] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html>
- [4] [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) (figura 1.2).
- [5] <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- [6] ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, ET AL., *La importancia del diagnóstico en cáncer*, Centro de Investigación del cáncer, (2008).
- [7] R.T. SKEEL, S.N. KHLEIF, *Handbook of Cancer Chemotherapy*, (2011). Puede buscarse en ([https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=6Nz\\_87OLrtcC&oi=fnd&pg=PR7&dq=R.T.+Skeel,+S.N.+Khleif,+Handbook+of+Cancer+Chemotherapy,+Eighth,+Philadelphia,+2011.&ots=ocPXXsY3zr&sig=C6w4f94z3h8QJqJL32jJVPXEesE#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=6Nz_87OLrtcC&oi=fnd&pg=PR7&dq=R.T.+Skeel,+S.N.+Khleif,+Handbook+of+Cancer+Chemotherapy,+Eighth,+Philadelphia,+2011.&ots=ocPXXsY3zr&sig=C6w4f94z3h8QJqJL32jJVPXEesE#v=onepage&q&f=false))
- [8] <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia>
- [9] V. DEL SOLAR FERNÁNDEZ,, *Síntesis, actividad catalítica y evaluación biológica de nuevos compuestos de Pt(II) y Pt(IV)*, Universidad Autónoma de Madrid, España. Facultad de ciencias. Tesis de Doctorado.
- [10] TESSLER, J.; VARELA, Y.; ROSSO., D., *Manual de Farmacología II*, Quimioterapéuticos antineoplásicos e inmunosupresores, (2004) 2-8.
- [11] ESPINOSA, E.; ZAMORA, P.; FELIU, J.; GONZÁLEZ BARÓN, M., *Classification of anticancer drugs a new system bases on therapeutic targets*, Cancer Treat. Rev. 29, (2003) 1521-1531.

- [12] WU, X.-Z., *A new classification system of anticancer drugs-based on cell biological mechanisms*, Med.Hypotheses. 66, (2006) 883-887.
- [13] ARNAB, M.; WILBEE, D. S., *Drug-DNA Intercalation: From Discovery to the Molecular Mechanism*, Adv. Protein Chem. Struct. Biol. (2013) 1-11.
- [14] ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRINGAS, T., *Inhibitions of Cell Division in Echerichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode*, Nature. (1965) 698-699.
- [15] GAMBINO, D.; MORENO, V.; NAVARRO, M., *Aplicaciones de los compuestos metálicos en medicina. Una visión inorgánica*, Ed. Academia Española. (2012). Págs., 1-73.
- [16] GUO, Z.; SADLER, P., *Metals in Medicine*, Angew. Chem. Int. Ed. 38, 1999, 1512-1531.
- [17] GRAHAM L. P., *An introduction to medical chemistry*, Departament of chemistry, paisley university. Vol. 40, (1995) 76.
- [18] QING, H. , *Understanding and Improving the Anticancer Activity of Cisplatin*, Massachusetts Institute of Technology. (2001). Tesis de doctorado.
- [19] JOHNSON, N.P; HOESCHELE, J.D; RAHN, R.O., *Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and transdichlorodiammineplatinum(II) to DNA*, Chem. Biol. Interact. 30, (1980) 151-169.
- [20] LIU, Z.; TAN, S.; ZU, Y.; FU, Y.; MENG, R.; XING, Z., *The interactions of cisplatin and DNA studied by atomic force microscopy*, Micron. (2010)
- [21] JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. , *Structure Recognition and Processing of Cisplatin-DNA Adducts*, J. Chem. Rev. 99, (1999) 2467-2498.
- [22] FICHTINGER-SCHEPMAN, A.; VAN DER VEER, J.; DEN HARTOG, J.; LOHMAN, P.; REEDIJK, J., *Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation*, Biochemistry, 24, (1985) 707-713.
- [23] SUO, Z.; LIPPARD, S. J.; JOHNSON, K. A., *Single d(GpG)/cis-Diammineplatinum(II) Adduct-Induced Inhibition of DNA Polymerization*, Biochemistry, 38, (1999) 715-726.
- [24] LIU, Z.; TAN, S.; ZU, Y.; FU, Y.; MENG, R.; XING, Z., *The interactions of cisplatin and DNA studied by atomic force microscopy*, Micron, 41, (2010) 833-839.

- [25] LIU, Z.; LIU, R.; ZHOU, Z.; ZU, Y.; XU, F., *Structural changes of linear DNA molecules induced by cisplatin*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457 (2015) 688-692.
- [26] GELASCO A., LIPPARD S. J., *NMR Solution Structure of DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin*, *Biochemistry.* 37, (1998) 9230-9239.
- [27] TAKAHARA, P. M.; ROSENZWEIG, A.; C.; FREDERICK, C.; A.; LIPPARD, S., *Crystal structure of double-stranded DNA containing de major adduct of the anticancer drug cisplatin*, *J. Nature*, 377, (1995) 649-652.
- [28] J. SERGIO CASAS, V.M., ÁNGELES SÁNCHEZ, JOSÉ L. SÁNCHEZ, JOSÉ SORDO, *Química Bioinorgánica*, ed. E. síntesis.
- [29] L. RUIZ-AZUARA, 07/628,628: RE 35,458, Feb. 18 (1997), United States Patent 1992.
- [30] L. RUIZ-AZUARA, 07/628,628: 5,576,326, United States Patent 1996.
- [31] L. RUIZ-AZUARA, 07/628,843: RE 35,458, Feb. 18 (1997). United States Patent 1992.
- [32] BECCO, L.; RODRÍGUEZ, A.; BRAVO, M.E.; PRIETO, M.J.; RUIZ-AZUARA, L.; GARAT, B.; MORENO, B.; GAMBINO, D., *New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas<sup>®</sup>: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity*, *J. Inorg. Biochem.* 109, (2012) 49-56.
- [33] GUTIÉRREZ, A.; VÁZQUEZ-AGUIRRE, A.; GARCÍA-RAMOS, J.; FLORES-ALAMO, M.; HERNÁNDEZ-LEMUS, E.; RUIZ-AZUARA, L.; MEJÍA, C., *Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212*, *J. Inorg. Biochem.* 126, (2013) 17-25.
- [34] F. OOMS, *Molecular modeling and computer aided drug design., Examples of their applications in medicinal chemistry*, *Curr. Med. Chem.* 7, (2000) 141-158.
- [35] ROGNAN D., *Structure-Based Approach to target Fishing and Ligand Profiling*, *Mol. Inf.* 29, (2010) 176-187.
- [36] MEDINA J., FERNÁNDEZ E., NAVEJA J., *Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora*, *Educación Química.*, 26, (2015) 180-186.
- [37] HURLEY, L. H., *DNA and its associated processes as targets for cancer therapy*, *Nat. Rev. Cancer*, 2, (2012) 188-200.

- [38] WARRIN, J. M., *DNA modification and cancer*, Ann. Rev. Biochem. 50, (1981) 159-92.
- [39] LERMAN, L. S., *Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines*, J. Mol. Biol. 3, (1961) 18-30.
- [40] PINDUR, U.; HABER, M.; SATTLER, K., *Antitumor Active Drugs as Intercalators of Deoxyribonucleic Acid Molecular Models of Intercalation Complexes*, J. Chem. Educ. 70, (1993) 263-269.
- [41] FREIFELDER, D., *Electron Microscopic Study of the Ethidium Bromide-DNA Complex*, J. Mol. Biol. 60, (1971) 401-403.
- [42] HOU, X. M.; ZHANG, X. H.; WEI, K. J.; JI, C.; DOU, S. X.; WANG, W. C.; LI, M.; WANG, P. Y., *Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules*, Nucleic Acids Res., 37 (2009) 1400-1410.
- [43] CRAWFORD, L. V.; WARING, M. J., *Supercoiling of Polyoma Virus DNA measured by its Interaction with Ethidium Bromide*, J. Mol. Biol. 25, (1967) 23-30.
- [44] KECK, M. V.; LIPPARD, S. J., *Unwinding of Supercoiled DNA by Platinum-Ethidium and Related Complexes*, J. Am. Chem. Soc. 114, (1992) 3386-3390.
- [45] RUIZ, J.; CUTILLAS, N.; VICENTE, C.; VILLA, M. D.; LÓPEZ, G., *New Palladium(II) and Platinum(II) Complexes with the Model Nucleobase 1-Methylcytosine: Antitumor Activity and Interactions with DNA*, Inorg.Chem. 44, (2005) 7365-7376.
- [46] HERRERA, J. M.; MENDES, F.; GAMA, S.; SANTOS, I.; NAVARRO RANNINGER, C.; CABRERA, S.; QUIROGA, A. G., *Design and Biological Evaluation of New Platinum(II) Complexes Bearing Ligands with DNA-Targeting Ability*, Inorg. Chem. 53, (2014) 12627-12634.
- [47] WANG, Y.; HU, J.; CAI, Y.; XU, S.; WENG, B.; PENG, K.; WEI, X.; WEI, T.; ZHOU, H.; LI, X.; LIANG, G., *An Oxygen-Chelate Complex, Palladium Bis-acetylacetonate, Induces Apoptosis in H460 Cells via Endoplasmic Reticulum Stress Pathway Rather than Interacting with DNA*, J. Med. Chem. 56, (2013) 9601-9611.
- [48] RUIZ, J.; LORENZO, J.; SANGLAS, L.; CUTILLAS, N.; VICENTE, C.; VILLA, M. D.; AVILÉS, F. X.; LÓPEZ, G.; MORENO, V.; PÉREZ, J.; BAUTISTA, D., *Palladium(II) and Platinum(II) Organometallic Complexes with the Model Nucleobase Anions of Thymine, Uracil, and Cytosine: Antitumor Activity and Interactions with DNA of the Platinum Compounds*, Inorg. Chem. 45, (2006) 6347-6360.



- [49] MACQUET, J. P.; BUTOUR, J. L., *Modifications of the DNA secondary structure upon platinum binding: a proposed model*, Biochemie. 60, (1978) 901-914.
- [50] PAUL, A.; BHATTACHARYA, S., *Chemistry and biology of DNA-binding small molecules*, Curr. Sci. 102, (2012) 212-231.
- [51] BAILLY, C.; CHAIRES, J. B., *Sequence-Specific DNA Minor Groove Binders. Design and Synthesis of Netropsin and Distamycin Analogues*, Bioconjug. Chem. 9 (1998) 513-38.
- [52] PELTON, J. G.; WEMMER, D. E., *Binding modes of distamycin A with d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub> determined by twodimensional NMR*, J. Am. Chem. Soc. (1990) 112, 1393.
- [53] THEOPHANIDES, T.; ANASTASSOPOULOU, J., *Copper and carcinogenesis*, Crit. Rev. Oncol.Hematol. 42, (2002) 57-64.
- [54] CORNEJO-ROMERO, A.; SERRATO-DÍAZ, A.; RENDÓN-AGUILAR, B.; ROCHAMUNIVE, M., *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, (2014) 27-52.
- [55] REHMAN, S. U.; SARWAR, T.; HUSAIN, M. A.; ISHQI, H. M.; TABISH, M., *Studying non-covalent drug-DNA interactions*, Arch. Biochem. Biophys. 576, (2015) 49-60.
- [56] GANESHPANDIAN, M.; RAMAKRISHNAN, S.; PALANIANDAVAR, M.; SURESH, E.; RIYASDEEN, A.; AKBARSHA, M.A. , J. Inorg. Biochem. 140, (2014) 202-212
- [57] AKDI, K.; VILAPLANA, R. A.; KAMAH, S.; GONZÁLEZ-VÍLCHEZ, F., *Effects of Tris and Hepes buffers on the interaction of palladium-diaminopropane complexes with DNA*, J. Inorg. Biochem. 99, (2005) 1360-1368.
- [58] ARJMAND, F.; PARVEEN, S.; AFZAL, M.; TOUPET, L.; BEN HADDA, T., *Molecular drug design, synthesis and crystal structure determination of Cu (II) e Sn (IV) heterobimetallic core: DNA binding and cleavage studies*, Eur. J. Med. Chem. 49, (2012) 141-150.
- [59] THEDERAHN, T. B.; KUWABARA, M. D.; LARSEN, T. A.; SIGMAN, D. S., *Nuclease Activity of 1,10-Phenanthroline-Copper: Kinetic Mechanis*, J. Am. Chem. Soc. 111, (1989) 4941-4946.
- [60] CHIKIRA, M.; TOMIZAWA, Y.; FUKITA, D.; SUGIZAKI, T.; SUGAWARA, N.; YAMAZAKI, T.; SASANO, A.; SHINDO, H.; PALANIANDAVAR, M.; ANTHOLINE, W.

- E., *DNA-fiber EPR study of the orientation of Cu(II) complexes of 1,10-phenanthroline and its derivatives bound to DNA: mono(phenanthroline)-copper(II) and its ternary complexes with amino acids*, J. Inorg. Biochem. 89, (2002) 163–173.
- [61] HIROHAMA, T.; KURANUKI, Y.; EBINA, E.; SUGIZAKI, T.; ARII, H.; CHIKIRA, M.; SELVI, P. T.; PALANIANDAVAR, M., *Copper(II) complexes of 1,10-phenanthroline-derived ligands: Studies on DNA binding properties and nuclease activity*, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 1205–1219
- [62] KIM, Y.; LONG, E. C.; BARTON, J. K.; LIEBER, C. M., *Imaging of Oligonucleotide-Metal Complexes by Scanning Tunneling Microscopy*, Langmuir. 8, (1992) 496-500.
- [63] FITZSIMONS, M. P.; BARTON, J. K., *Design of a Synthetic Nuclease: DNA Hydrolysis by a Zinc-Binding Peptide Tethered to a Rhodium Intercalator*, J. Am. Chem. Soc. 119, (1997) 3379-3380.
- [64] ALEMÓN-MEDINA, R.; MUÑOZ-SÁNCHEZ, J.L.; RUIZ-AZUARA, L.; GRACIA-MORA, I., *Casiopaina II gly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide*, Toxicol. Vit. 22 (2008) 710-5.
- [65] TREJO-SOLÍS, C.; PALENCIA, G.; ZUÑIGA, S.; RODRÍGUEZ-ROPON, A.; OSORIO-RICO, L.; TORRES LUVIA, S.; GRACIA-MORA, I.; MARQUEZ-ROSADO, L.; SÁNCHEZ, A.; MORENO-GARCÍA, M. E.; CRUZ, A.; BRAVO-GÓMEZ, M. E.; RUIZ-RAMÍREZ, L.; RODRÍGUEZ-ENRIQUEZ, S.; SOTELO, J. , *Cas II gly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms*, Neoplasia. 7, (2005) 563-74.
- [66] DE VIZAYA, A.; RIVERO, A.; RUIZ, L.; KASS, G.; KELLASND, L.; ORR, R.; DOBROTA, M., *Induction of Apoptosis by a Novel Copper-based Anticancer Compound , Casiopaina II , in L1210 Murine Leukaemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells*, Toxicol. Vit. 14, (2000) 1-5.
- [67] MARÍN-HERNÁNDEZ, A.; GRACIA-MORA, I.; RUIZ-RAMÍREZ, L.; MORENO-SÁNCHEZ, R., *Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopainas) on mitochondrial functions*, Biochem. Pharmacol. 65, (2003) 1979-89.
- [68] RIVERO-MÜLLER, A.; DE VIZCAYA-RUIZ, A.; PLANT, N.; RUIZ, L.; DOBROTA, M., *Mixed chelate copper complex, Casiopaina II gly, binds and degrades nucleic acids: a mechanism of cytotoxicity*, Chem. Biol. Interact. 165, (2007) 189-99.

- [69] BECCO, L.; GARCÍA-RAMOS, J.; RUIZ-AZUARA, L.; GAMBINO, D.; GARAT, B., *Analysis of the DNA Interaction of Copper Compounds Belonging to the Casiopeínas<sup>®</sup> Antitumoral Series*, Biol. Trace. Elem. Res. 161, (2014) 210–215.
- [70] SOLANS, X.; RUÍZ-RAMÍREZ, L.; MARTÍNEZ, A.; GASQUE, L.; MORENO-ESPARZA, R., *Mixed chelate complexes. II. Structures of L-alaninato(aqua)(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)copper(II) nitrite monohydrate and aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(nitrate)copper(II) monohydrate*, Acta Cryst. C. 49, (1993) 890-893.
- [71] BRAVO-GÓMEZ, M. E.; GARCÍA-RAMOS, J. C.; GRACIA-MORA, I.; RUIZ-AZUARA, L., *Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N–N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N–N)(glycinato)]NO<sub>3</sub> complexes*, (Casiopeínas<sup>®</sup>), J. Inorg. Biochem. 103, (2009) 299–309.
- [72] SÁNCHEZ-BARTÉZ F., *Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las Casiopeínas Igly, IIgly y III-ia en linfocitos, médula ósea de ratón y linfocitos humanos en cultivo*, Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis Maestría, (2006).
- [73] BECCO L.; RODRÍGUEZ A.; BRAVO M.E.; PRIETO M.J.; RUIZ-AZUARA L.; GARAT B.; MORENO V.; GAMBINO D., *New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas<sup>®</sup>: interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity*, J. Inorg. Biochem. 109, (2012) 49-56.
- [74] SERMENT-GUERRERO, J.; CANO-SANCHEZ, P.; REYES-PEREZ, E.; VELAZQUEZ-GARCIA, F.; BRAVO-GOMEZ, M. E.; RUIZ-AZUARA, L., *Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas*, Toxicol. Vitr., 25, (2011) 1376-1384.
- [75] KACHADOURIAN, R.; BRECHBUHL, H. M.; RUIZ-AZUARA, L.; GRACIA-MORA, I.; DAY, B., *Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells*, Toxicol. Vitr. 268, (2010.) 176-183.
- [76] BRAVO-GÓMEZ, M. E.; CAMPERO-PEREDO, C.; GARCÍA-CONDE, D.; MOSQUEIRA-SANTILLÁN, M. J.; SERMENT-GUERRERO, J.; RUIZ-AZUARA, L., *DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casiopeinas<sup>®</sup>) and analysis of its biological meaning*, Polyhedron. 102 (2015) 530–538.
- [77] GARCÍA-RAMOS, J.C., *Actividad nucleasa de quelatos mixtos de Cu (II): Casiopeínas*, Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de México (UNAM). México, D.F. (2015).

- [78] GARCÍA-RAMOS, J. C.; TOVAR-TOVAR, A.; HERNÁNDEZ-LIMA, J.; CORTÉS-GUZMÁN, F.; MORENO-ESPARZA, R.; RUIZ-AZUARA, L., *A new kind of intermolecular stacking interaction between copper (II) mixed chelate complex (Casiopeína III-ia) and adenine*, Polyhedron. 30, (2011) 2697–2703.
- [79] GALINDO-MURILLO, R.; HERNANDEZ-LIMA, J.; GONZÁLEZ-RENDÓN, M.; CORTÉS-GUZMÁN, F.; RUÍZ-AZUARA, L.; MORENO-ESPARZA, R., *π-Stacking between Casiopeinas and DNA bases*, Phys. Chem. Chem. Phys. 13, (2011) 14510–14515.
- [80] GALINDO-MURILLO, R.; RUI-AZUARA, L.; MORENO-ESPARZA, R.; CORTE-GUZMA, F., *Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex*, Phys. Chem. 14, (2012) 15539–15546.
- [81] GALINDO-MURILLO, R.; GARCÍA-RAMOS, J. C.; RUIZ-AZUARA, L.; CHEATHAM, T. E.; CORTÉS-GUZMÁN, F., *Intercalation processes of copper complexes in DNA*, Nucleic Acids Res. (2015) 1-13.
- [82] SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A., *Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 124, (2013) 1–19.
- [83] GATTI, C.; DE HOUSSIER, C.; FREDERIC E., *Binding of ethidium bromide to ribosomal RNA. Absorption, fluorescence, circular and electric dichroism study*, Biochim.Biophys. Acta. 407, (1975) 308—319.
- [84] HURLEY, L. H, *DNA and its associated processes as targets for cancer therapy*, Nat. Rev. Cancer. 2, (2012), 188-200.
- [85] ZHEN, Q. X.; YE, B. H.; ZHANG, Q. L.; LIU, J. G.; LI, H.; JI, L. N.; WANG, L., *Synthesis, characterization and the effect of ligand planarity of [Ru(bpy)2L]2q on DNA binding affinity*, Journal of Inorganic Biochemistry. 76, (1999) 47–53.
- [86] V. T. YILMAZ, C. ICSEL, F. SUYUNOVA, M. AYGUN, N. AZTOPALC, E. ULUKAYAD, *Ni(II)/Cu(II)/Zn(II) 5,5-diethylbarbiturate complexes with 1,10-phenanthroline and 2,2'-dipyridylamine: synthesis, structures, DNA/BSA binding, nuclease activity, molecular docking, cellular uptake, cytotoxicity and the mode of cell death*, J. Royal Society of Chemistry. Dalton Trans. (2016).
- [87] MAHMOOD, A.; KHAN, M.A.; MIR, S.; GATOO, M.A., *DNA Binding, Cleavage Activity, Molecular Docking, Cytotoxicity and Genotoxicity Studies of Newly Synthesized Copper Based Metal*, Pharm. Anal. Acta. 7, (2016) 1-11.

- [88] RAMBABU, A.; KUMAR, M.P.; TEJASWI, S.; VAMSIKRISHNA, N., *DNA interaction, antimicrobial studies of newly synthesized copper (II) complexes with 2-amino-6-(trifluoromethoxy)benzothiazole Schiff base ligands*, J. Photochem. Photobiol. 165, (2016) 147–156.
- [89] HEGDE, D.; NAIK, G.N.; VADAVI, R.S.; KUMAR, V.S.; BARRETO, D.A.; GUDASI, K.B., *Transition Metal Complexes of N'-(2-(hydroxyimino)propanoyl)isonicotinohydrozide: Synthesis, Characterization, DNA Interaction and Anticancer Evaluation*, Inorganica Chimica Acta. (2017).
- [90] NIROOMAND, S.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; NOROOZIFAR, M.; MOO, A., *Spectroscopic studies on the binding of holmium-1,10-phenanthroline complex with DNA*. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 117 (2012) 132–139.
- [91] TAMILARASAN, R.; MCMILLIN, D. R.; LIU, F., *Excited-State Modalities for Studying the Binding of Copper Phenanthrolines to DNA*, American Chemical Society. (1989).

## Capítulo 7

# Gráficas de los espectros de infrarrojo de las casiopeínas

### Cas-III-Da

Acetilacetato		Bipiridina				
OH	$\nu_{as}$ COO-	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C-C)	$\nu$ (C-H)	NO <sub>3</sub> -iónico
3477	1585	1616	1525	1448	731	1384.76

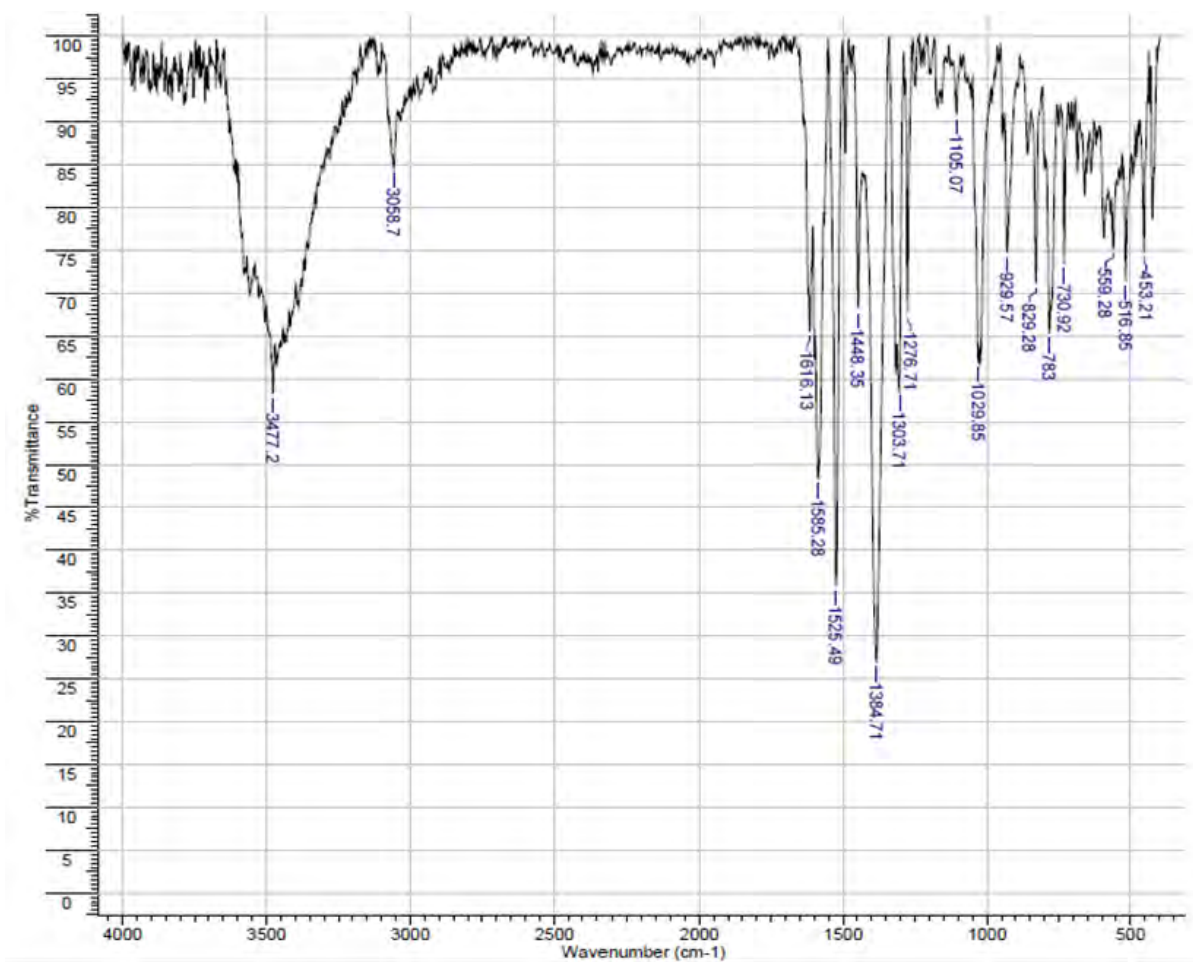


Figura 7.1: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(2,2'bipiridina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>.

### Cas-4-Mea

Acetilacetonato		Fenantrolina				
OH	$V_{as}$ COO-	$\nu(C=C)$	$\nu(C=N)$	$\nu(C-C)$	$\nu(C-H)$	NO <sub>3</sub> -iónico
3444	1578	1519	1428	837	727	1384.71

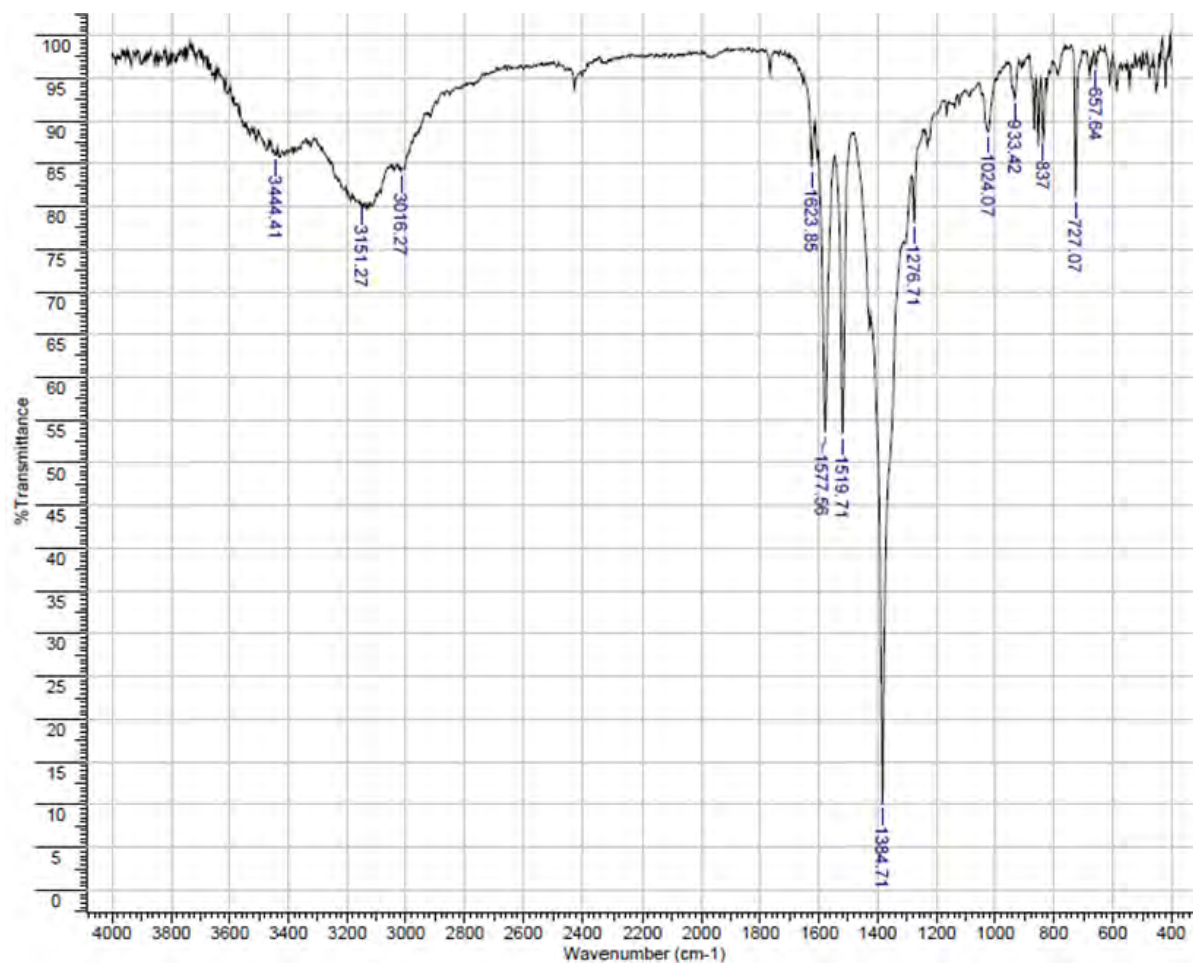


Figura 7.2: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(4-metil,1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub> H<sub>2</sub>O



### Cas-5-Mea

Acetilacetato		Fenantrolina				
OH	$V_{as}$ COO-	$\nu(C=C)$	$\nu(C=N)$	$\nu(C-C)$	$\nu(C-H)$	NO <sub>3</sub> -iónico
3442	1579	1518	1427	810	729	1384.71

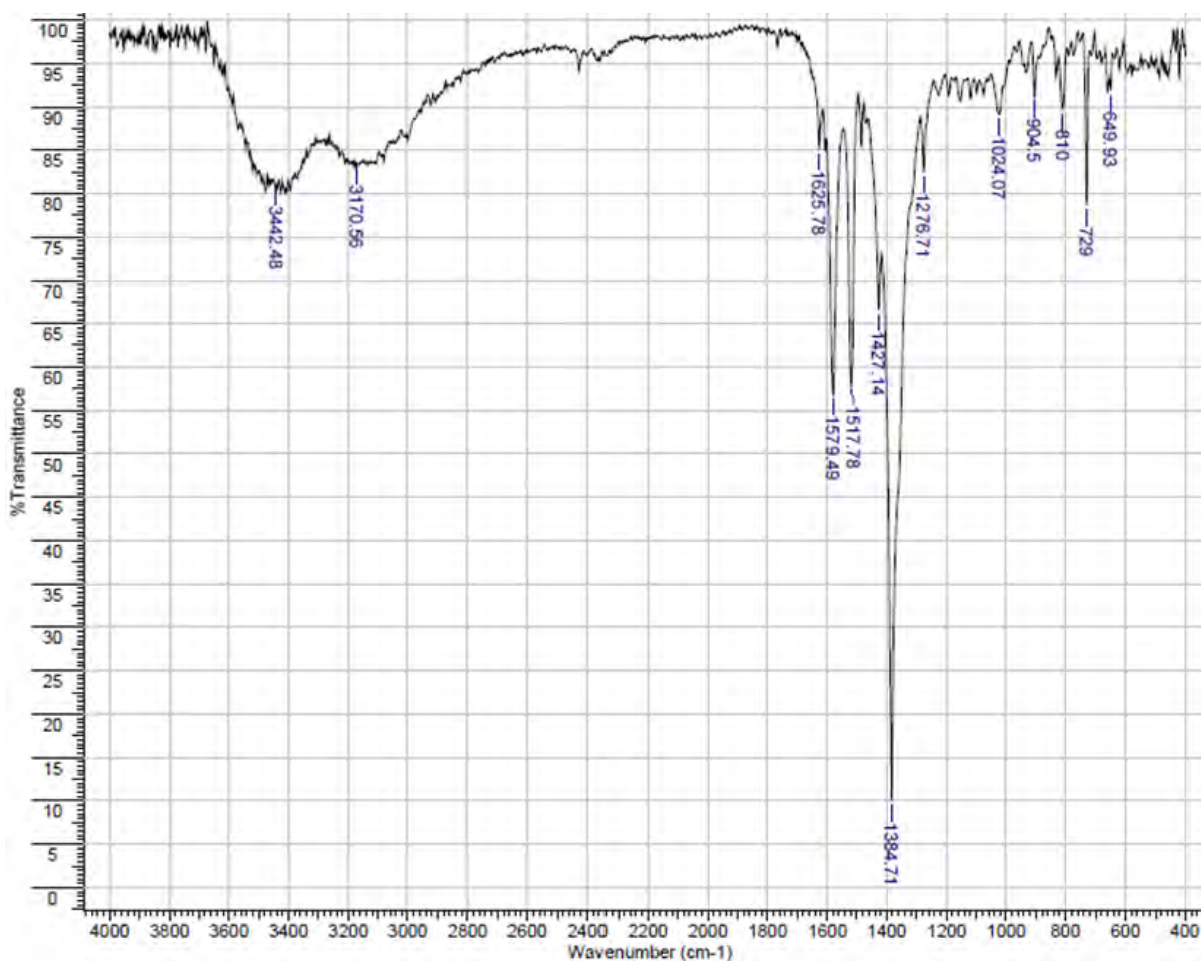


Figura 7.3: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(5-metil,1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub> H<sub>2</sub>O

### Cas-III-Ea

Acetilacetato		Fenantrolina				
OH	$V_{as}$ COO-	$\nu(C=C)$	$\nu(C=N)$	$\nu(C-C)$	$\nu(C-H)$	NO <sub>3</sub> -iónico
3427	1578	1522	1425	820	725	1384.71

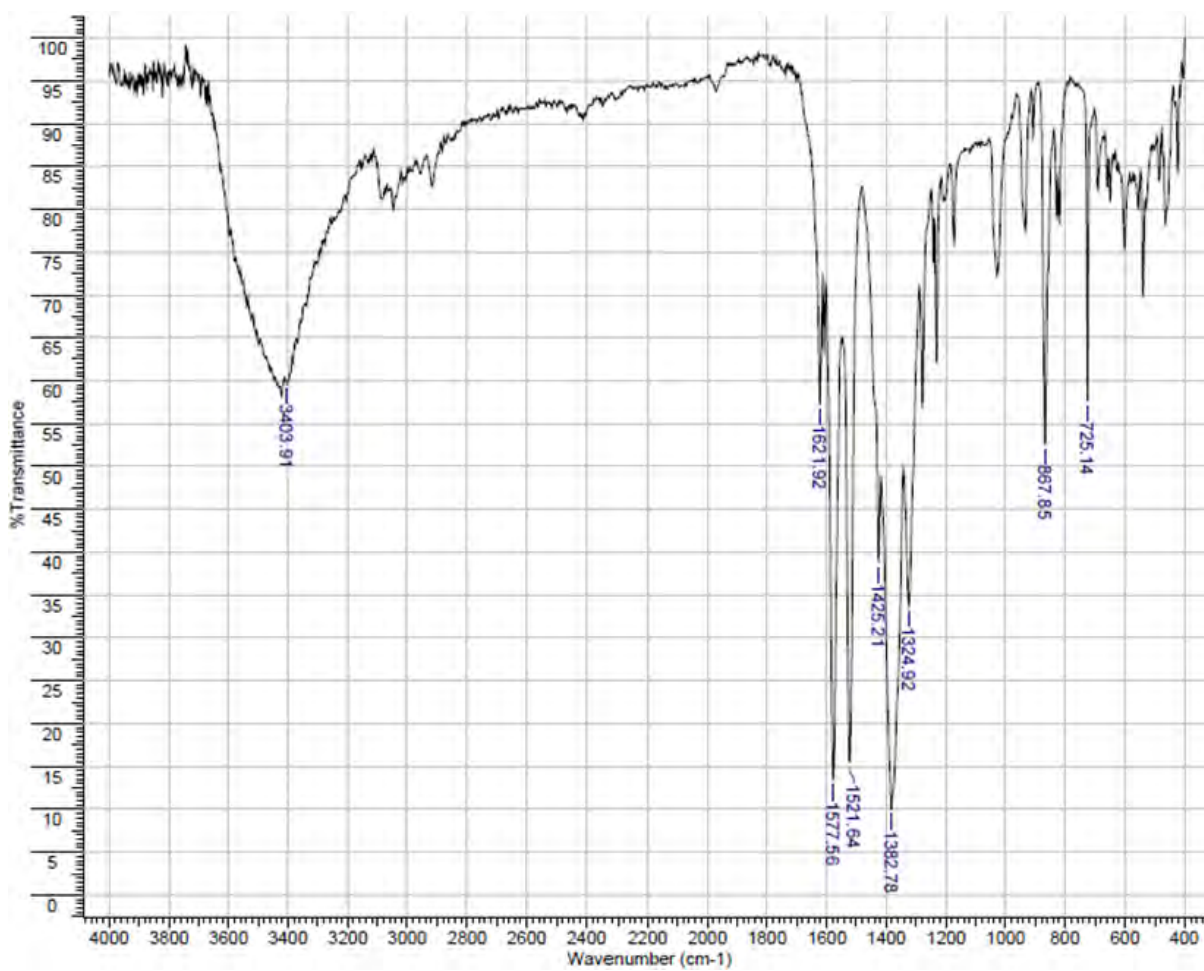


Figura 7.4: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(4,7-dimetil,1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O

### Cas-III-La

Acetilacetato		Fenantrolina					
OH	$V_{as}$ COO-	$\nu(C=C)$	$\nu(C=N)$	$\nu(C-C)$	$\nu(C-H)$	NO <sub>3</sub> -iónico	
3400	1579	1520	1431	820	729	1384.71	

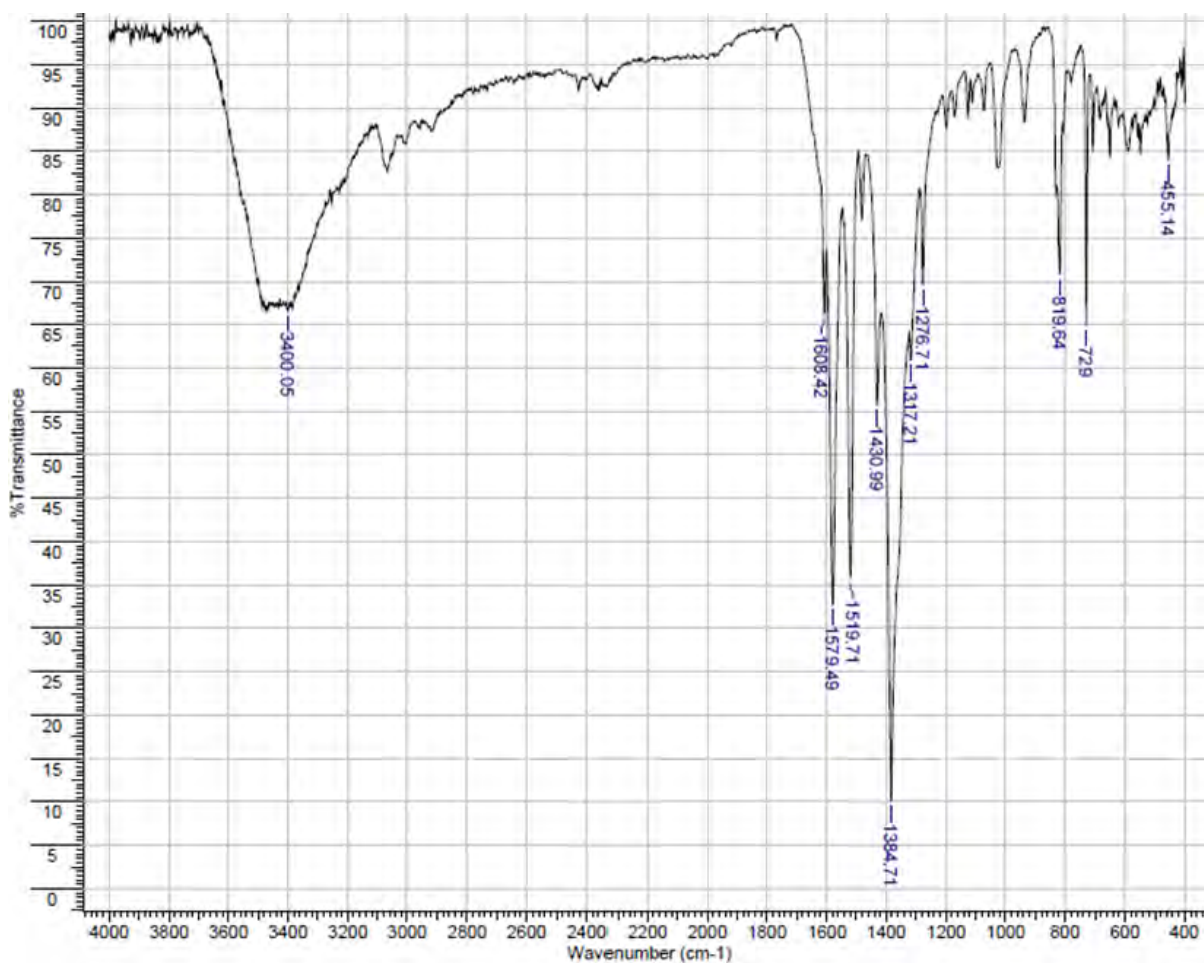


Figura 7.5: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(5,6-dimetil,1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub> 2H<sub>2</sub>O

### Cas-III-Ma

Acetilacetato		Fenantrolina					
OH	$V_{as}$ COO-	$\nu(C=C)$	$\nu(C=N)$	$\nu(C-C)$	$\nu(C-H)$	$NO_3$ -iónico	
3415	1585	1518	1431	833	727	1384.71	

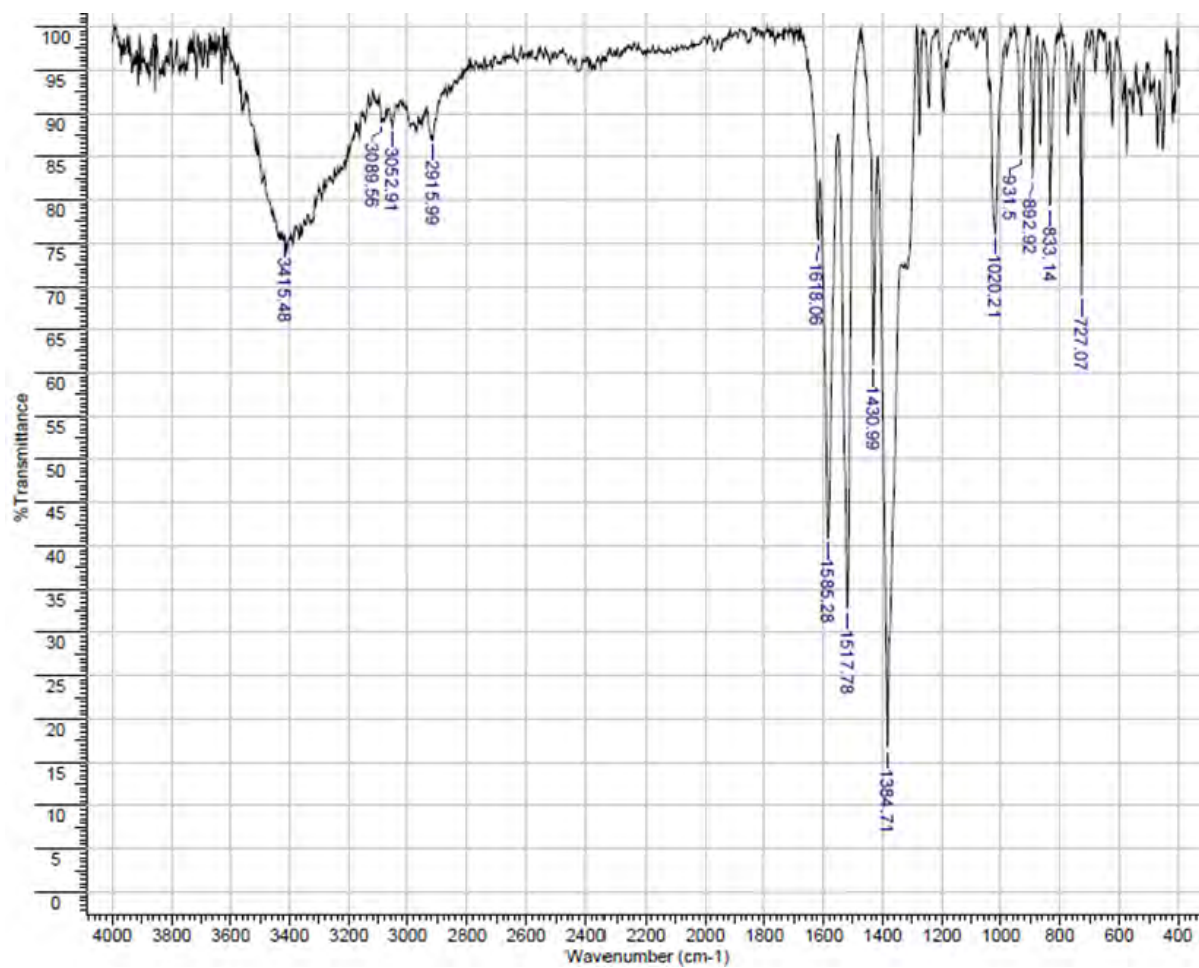


Figura 7.6: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(3,4,7,8-tetrametil,1,10-fenantrolina) (acetilacetato)]NO<sub>3</sub> H<sub>2</sub>O

## Cas-5-Fenil

Acetilacetionato		Fenantrolina					
OH	$V_{as}$ COO-	$\nu(C=C)$	$\nu(C=N)$	$\nu(C-C)$	$\nu(C-H)$	NO <sub>3</sub> -iónico	
3429	1583	1524	1429	833	731	1384.71	

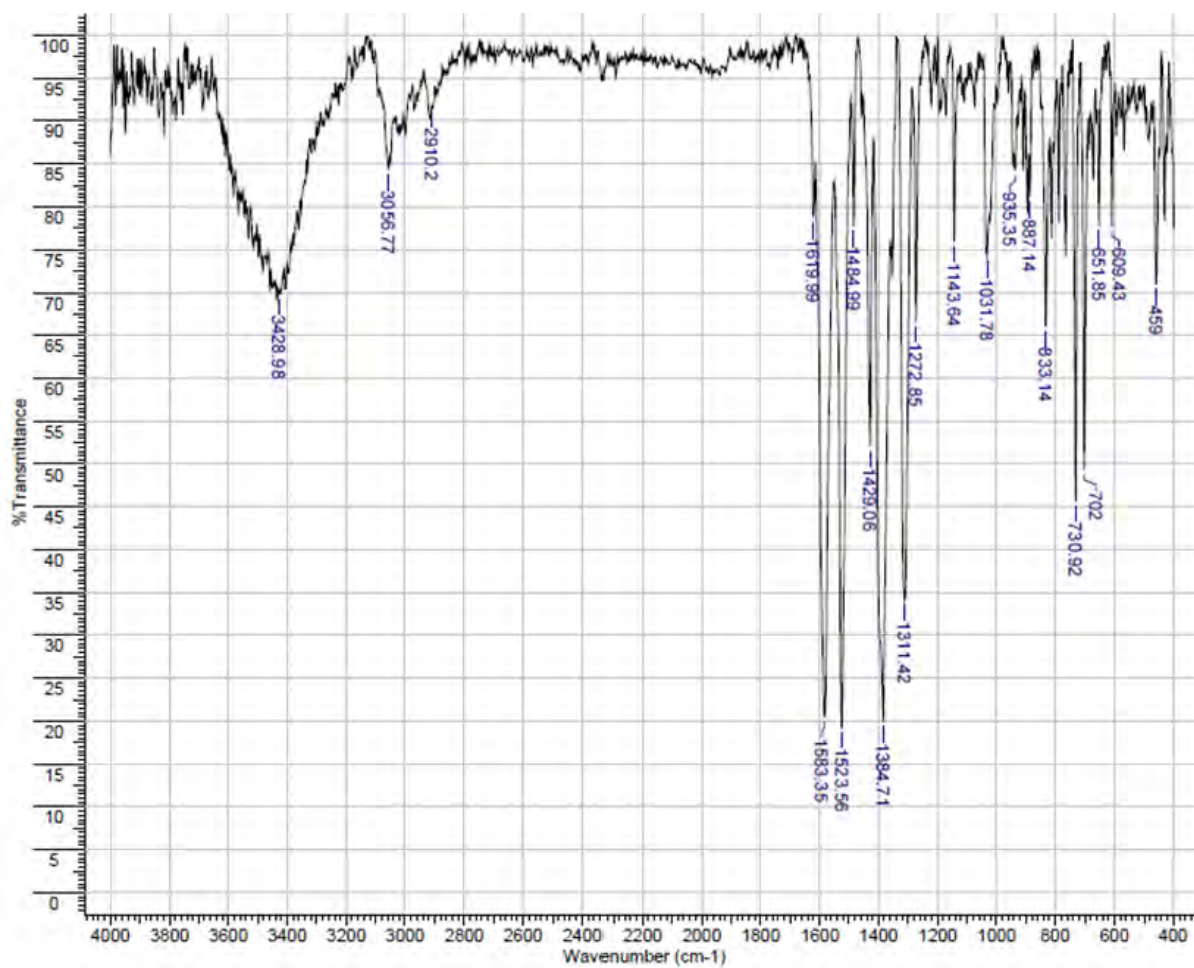


Figura 7.7: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(5-fenil,1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]NO<sub>3</sub>

### Cas-III-Ha

Acetilacetato		Fenantrolina					
OH	$V_{as}$ COO-	$\nu(C=C)$	$\nu(C=N)$	$\nu(C-C)$	$\nu(C-H)$	$NO_3$ -iónico	
3425	1585	1518	1428	831	731	1384.71	

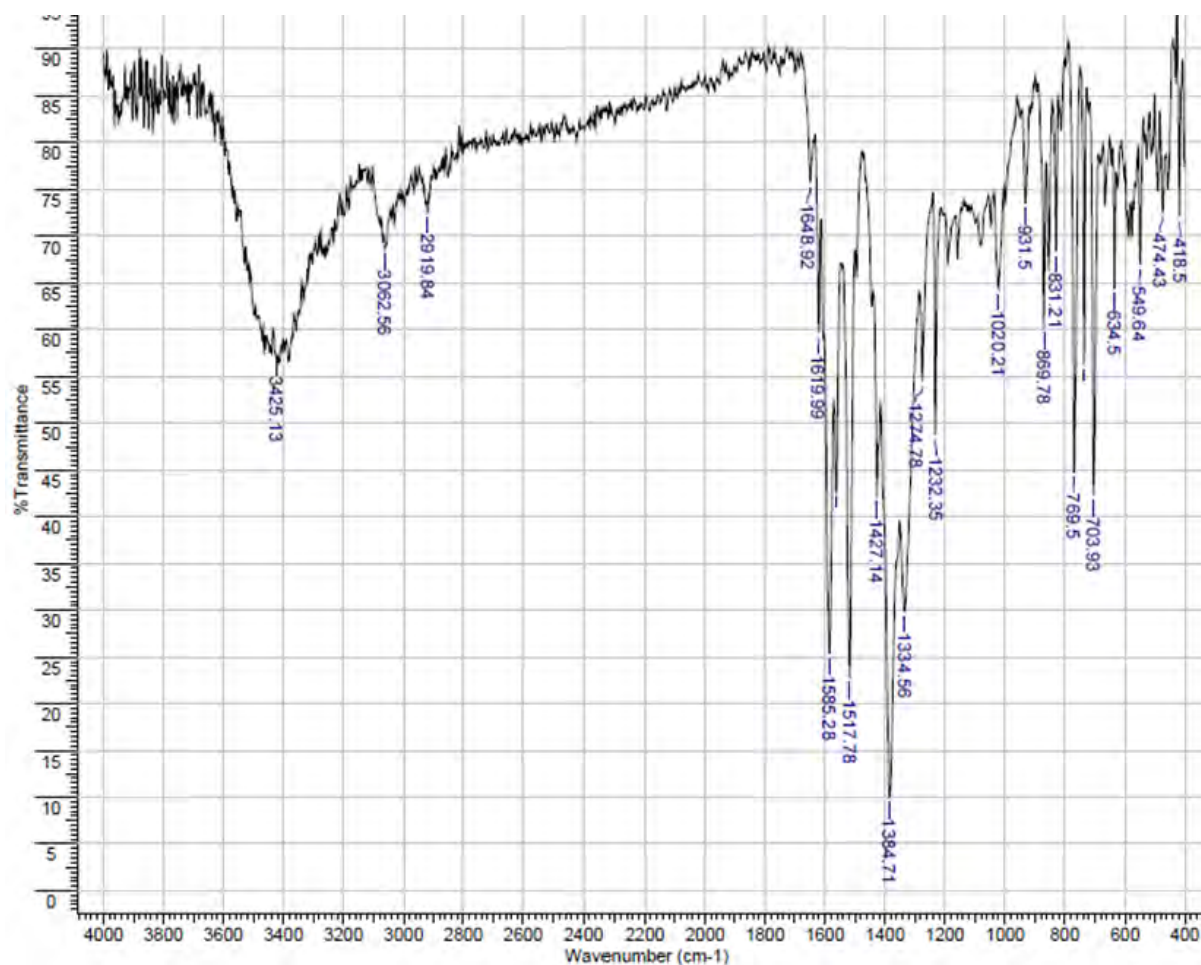


Figura 7.8: Espectro infrarrojo de la casiopeína  $[Cu(4,7\text{-fenil},1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]NO_3H_2O$

### Cas-III-5a-Cla

Acetilacetato		Fenantrolina				
OH	$V_{as}$ COO-	$\nu(C=C)$	$\nu(C=N)$	$\nu(C-C)$	$\nu(C-H)$	NO <sub>3</sub> -iónico
3432	1578	1518	1421	813	729	1384.71

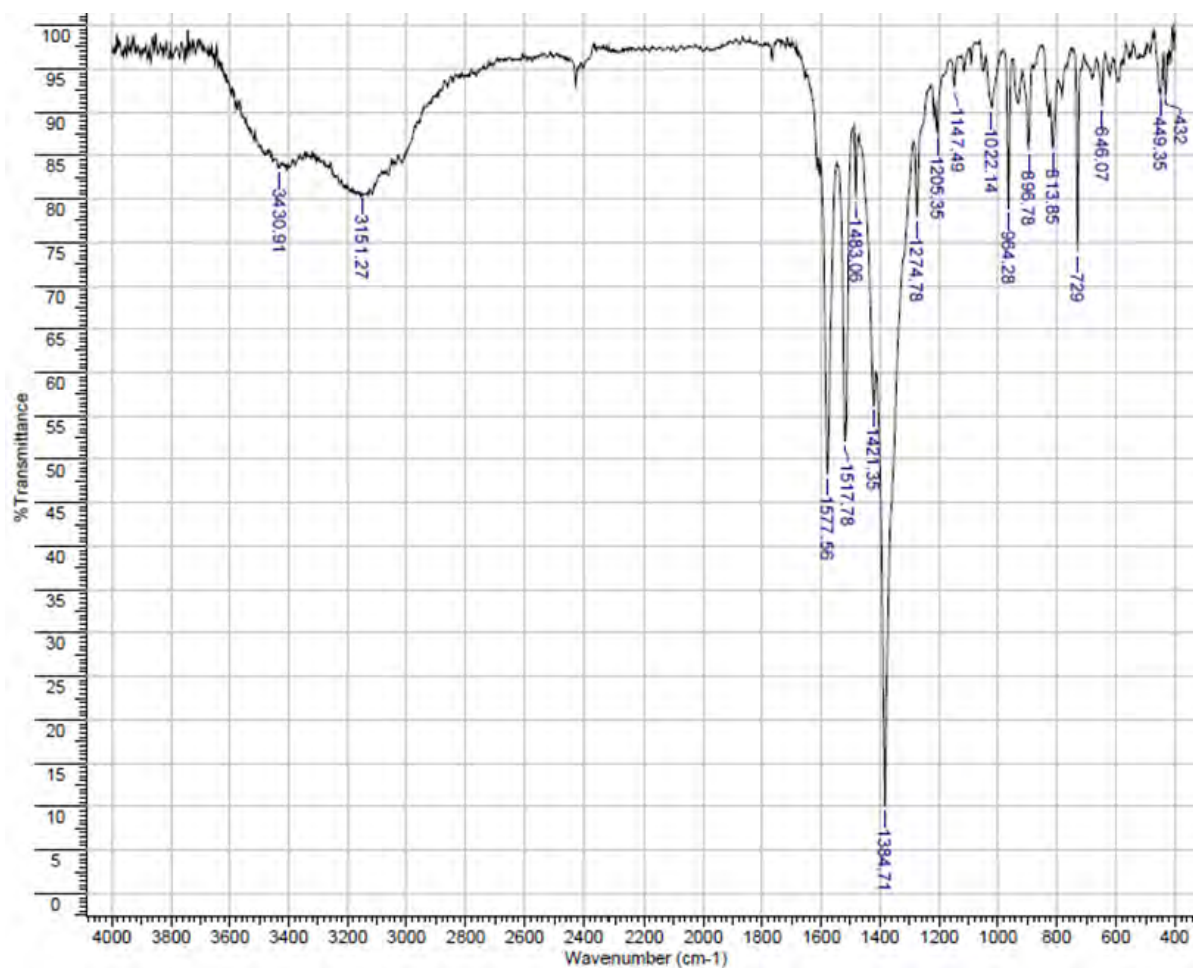


Figura 7.9: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(5-cloro,1,10-fenantrolina) (acetilacetato)]NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O

### Cas-III-5-NO<sub>2</sub>a

Acetilacetato		Fenantrolina				
OH	V <sub>as</sub> COO-	v(C=C)	v(C=N)	v(C-C)	v(C-H)	NO <sub>3</sub> -iónico
3446	1578	151	1419	824	723	1384.71

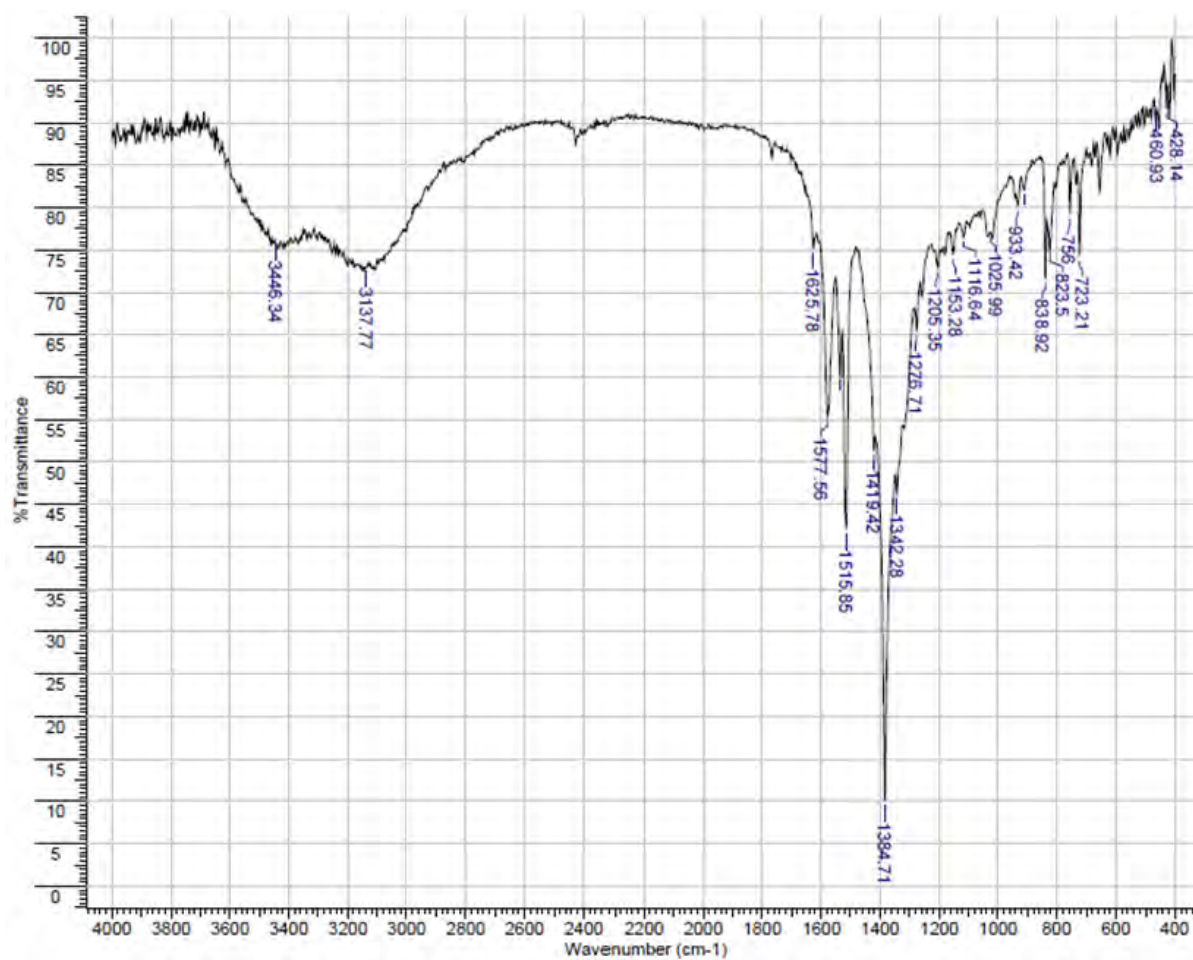


Figura 7.10: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(5-nitro,1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>



## Cas-VII-gly

Glicinato				Fenantrolina				
$\nu$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ NH <sub>2</sub>	$V_{as}$ COO-	$\delta$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	NO <sub>3</sub> -iónico
3419	3244	1641	546	1524	1429	860	725	1384.71

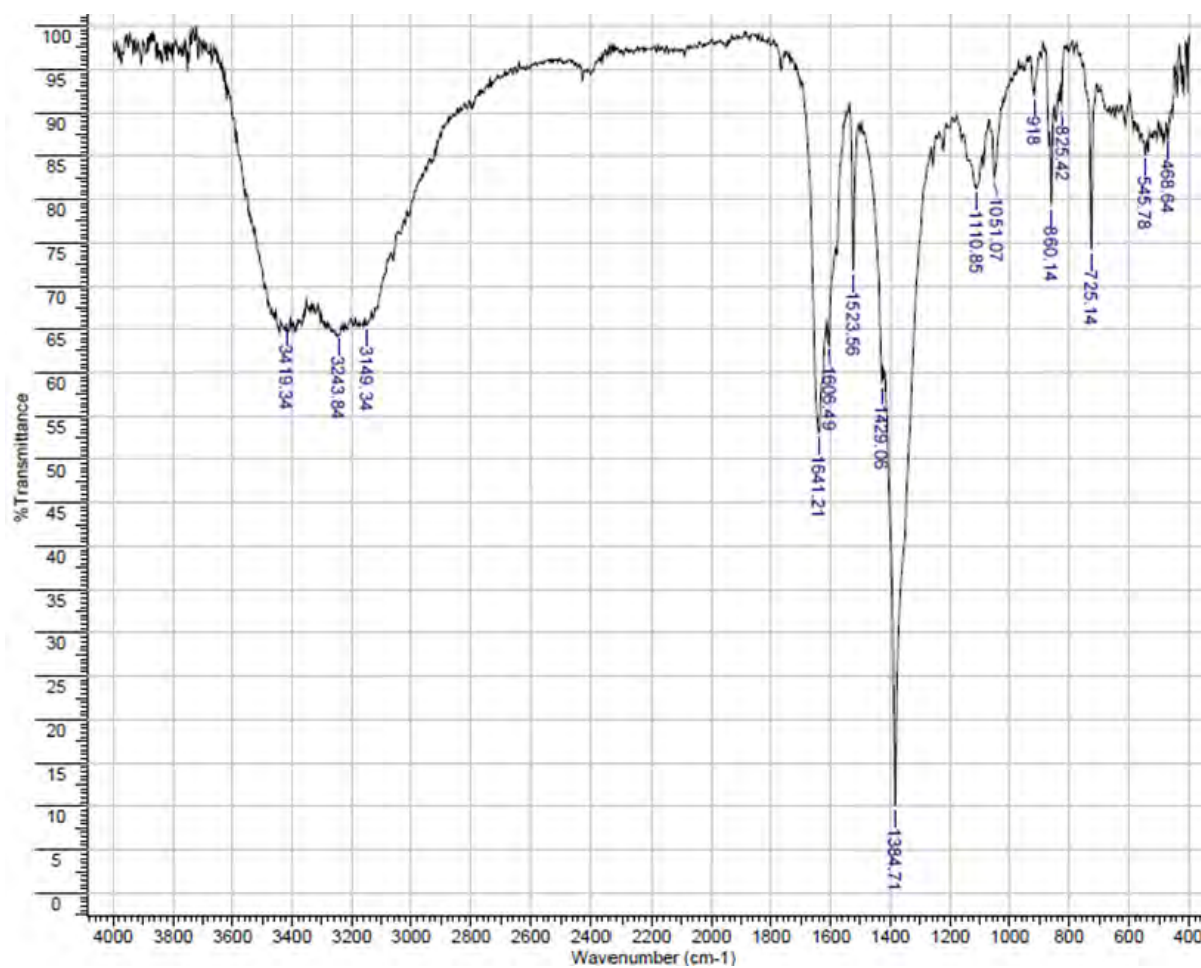


Figura 7.11: Espectro infrarrojo de la casiopéina [Cu(4-metil,1,10-fenantrolina) (glicinato)]NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O

## Cas-4-Me-gly

Glicinato				Fenantrolina				
$\nu$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ NH <sub>2</sub>	$V_{as}$ COO <sup>-</sup>	$\delta$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	NO <sub>3</sub> -iónico
3419	3244	1641	546	1524	1429	860	725	1384.71

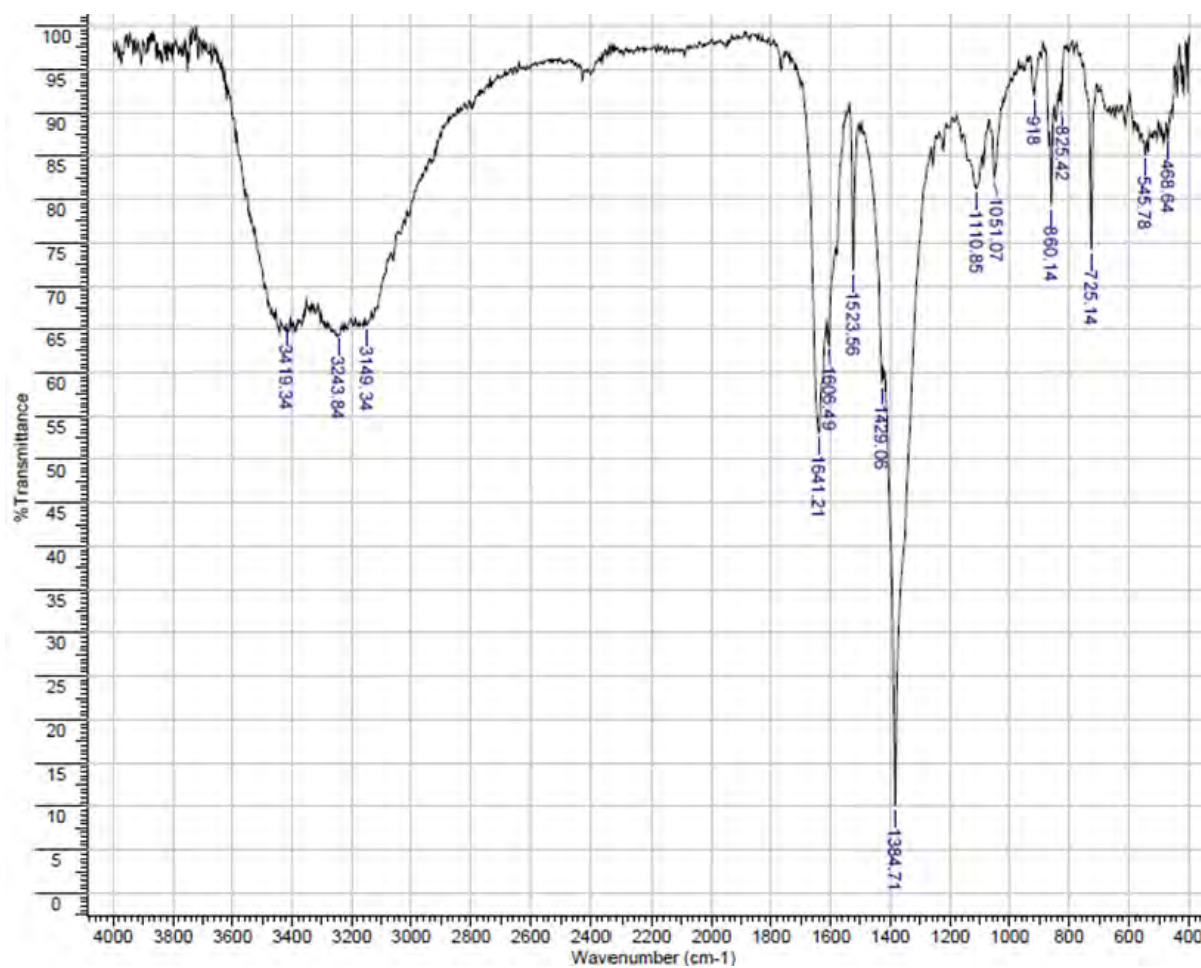


Figura 7.12: Espectro infrarrojo de la casiopéina [Cu(4-metil,1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O

### Cas-5-Me-gly

Glicinato				Fenantrolina					
$\nu$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ NH <sub>2</sub>	$V_{as}$ COO-	$\delta$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	NO <sub>3</sub> -iónico	
3427	3253	1637	633	1524	1431	818	729	1384.71	

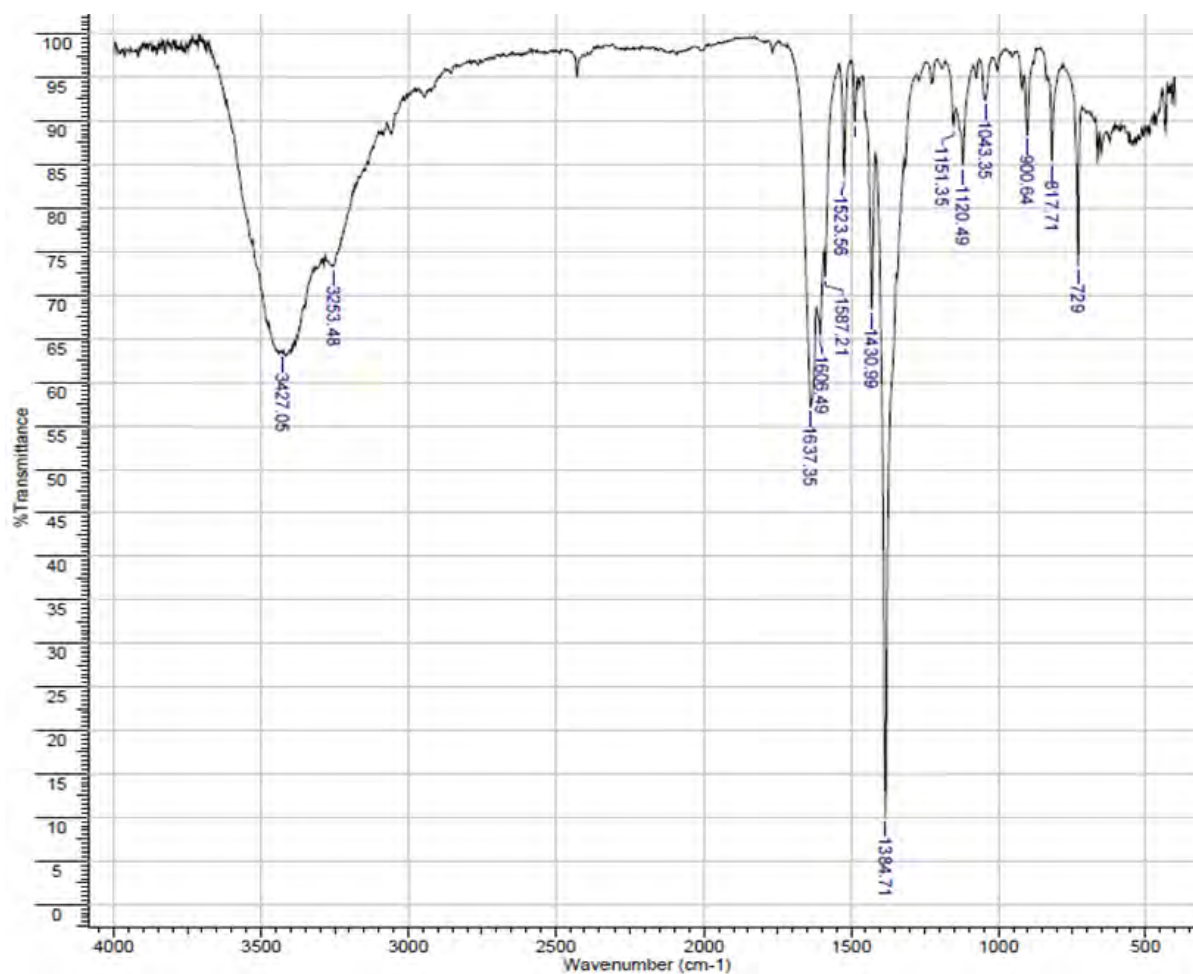


Figura 7.13: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(5-metil,1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O

## Cas-II-gly

Glicinato				Fenantrolina				
$\nu$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ NH <sub>2</sub>	$V_{as}$ COO <sup>-</sup>	$\delta$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	NO <sub>3</sub> -iónico
3416	3253	1622	638	1525	1429	872	727	1384.71

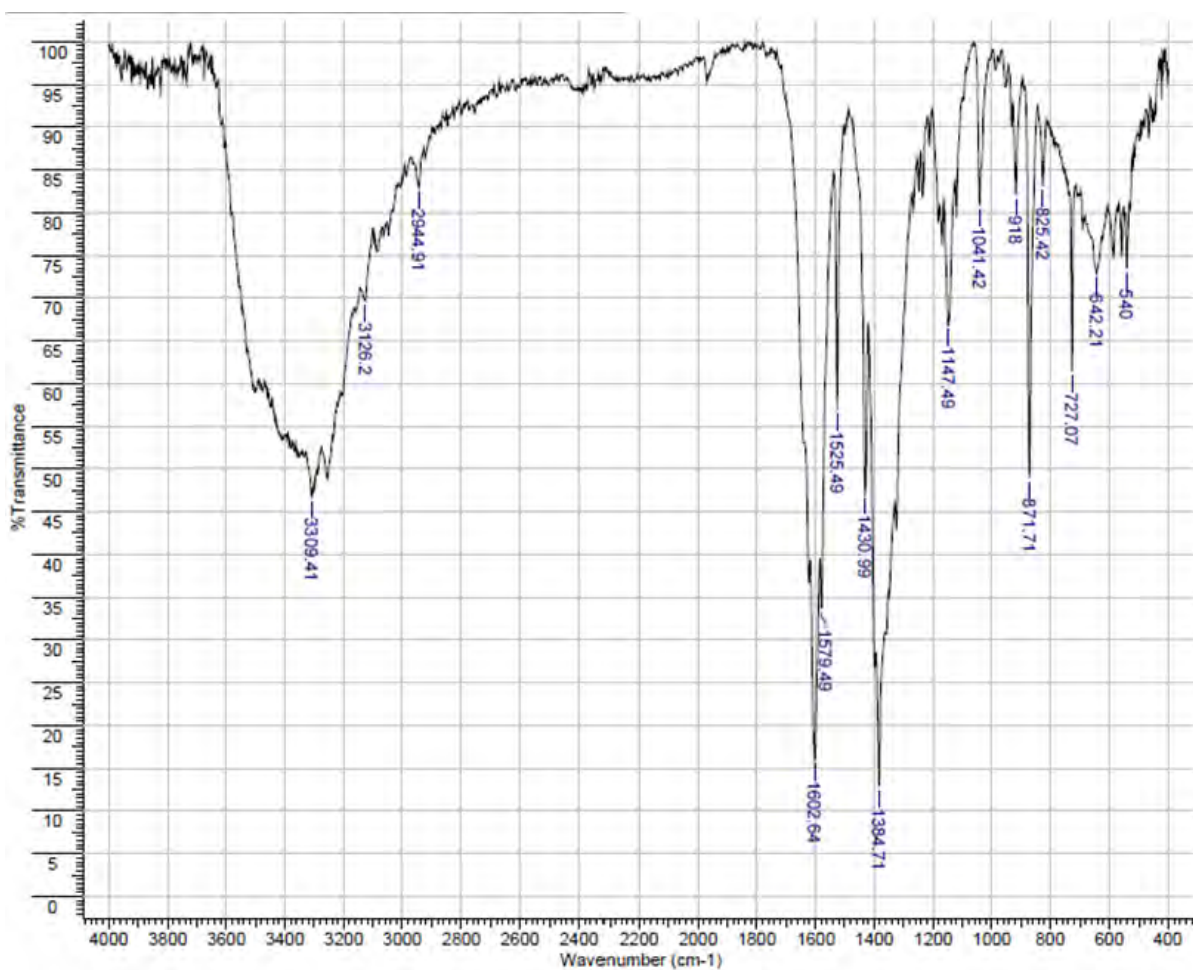


Figura 7.14: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(4,7-dimetil,1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O

## Cas- VI-gly

Glicinato				Fenantrolina				
$\nu$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ NH <sub>2</sub>	$V_{as}$ COO <sup>-</sup>	$\delta$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	NO <sub>3</sub> -iónico
3439	3196	1607	639	1524	1431	872	731	1384.71

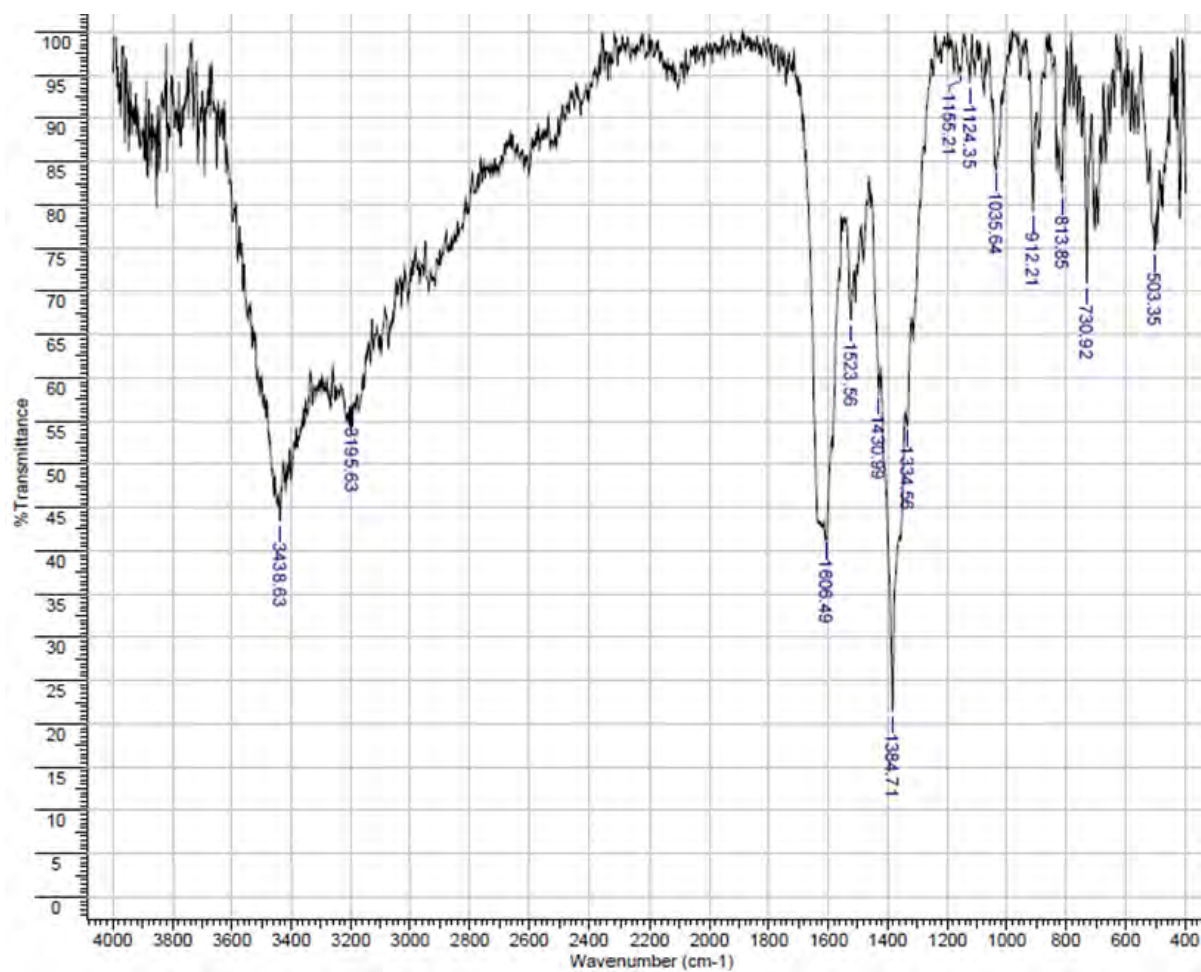


Figura 7.15: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(5,6-dimetil,1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O

### Cas-VIII-gly

Glicinato				Fenantrolina				
$\nu$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ NH <sub>2</sub>	$V_{as}$ COO <sup>-</sup>	$\delta$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	NO <sub>3</sub> -iónico
3416	3257	1630	1533	1435	898	727	1384.71	

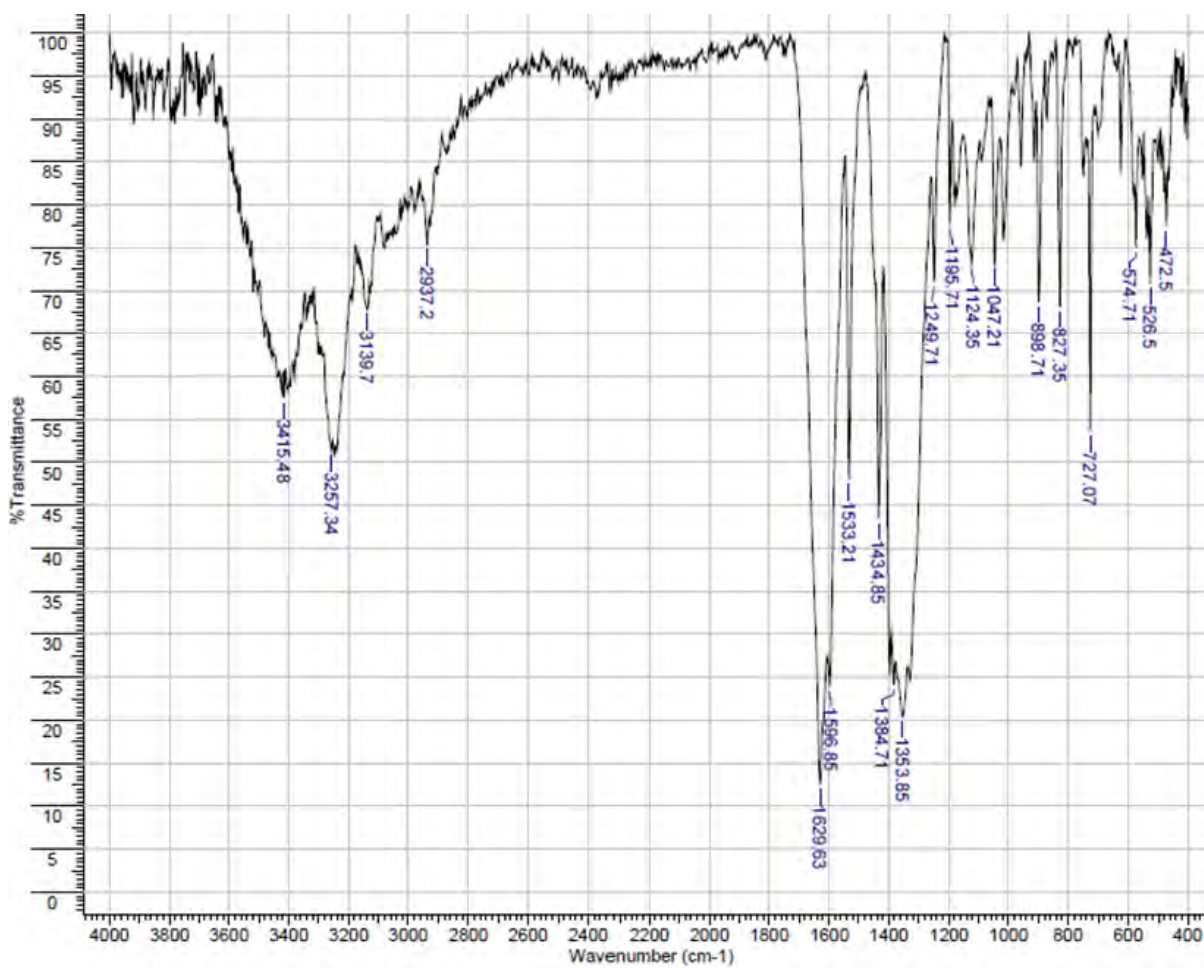


Figura 7.16: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(3,4,7,8-tetrametil,1,10-fenantrolina) (glicinato)]NO<sub>3</sub>

## Cas-I-gly

Glicinato				Fenantrolina				
$\nu$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ NH <sub>2</sub>	$V_{as}$ COO-	$\delta$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	NO <sub>3</sub> -iónico
3458	3248	1605	635	1524	1429	864	745	1384.71

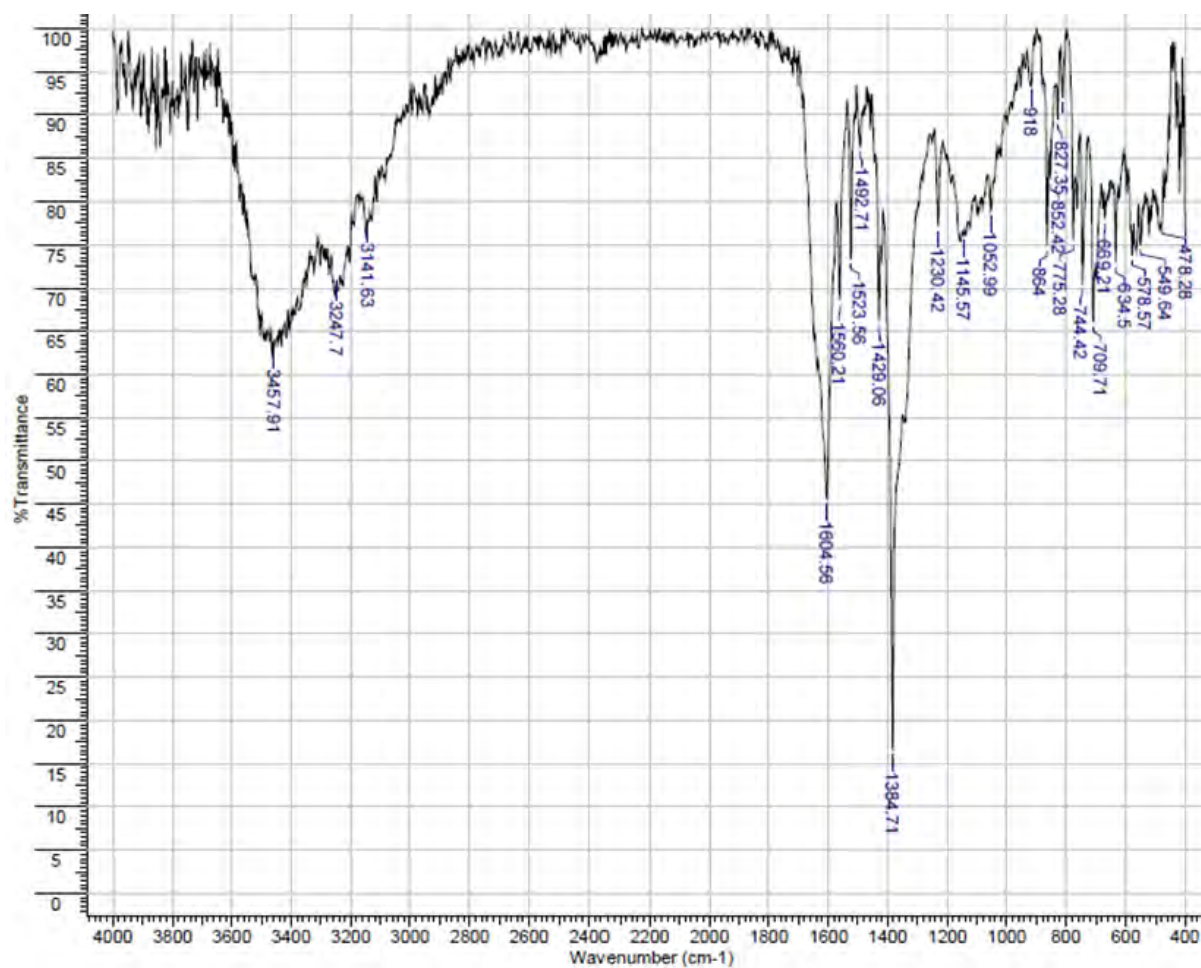


Figura 7.17: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(4,7-difenil,1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O

## Cas-5Cl-gly

Glicinato			Fenantrolina				NO <sub>3</sub> -iónico	
$\nu$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ NH <sub>2</sub>	$V_{as}$ COO-	$\delta$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	NO <sub>3</sub> -iónico
3421	3234	1614		1514	1425	897	729	1384.71

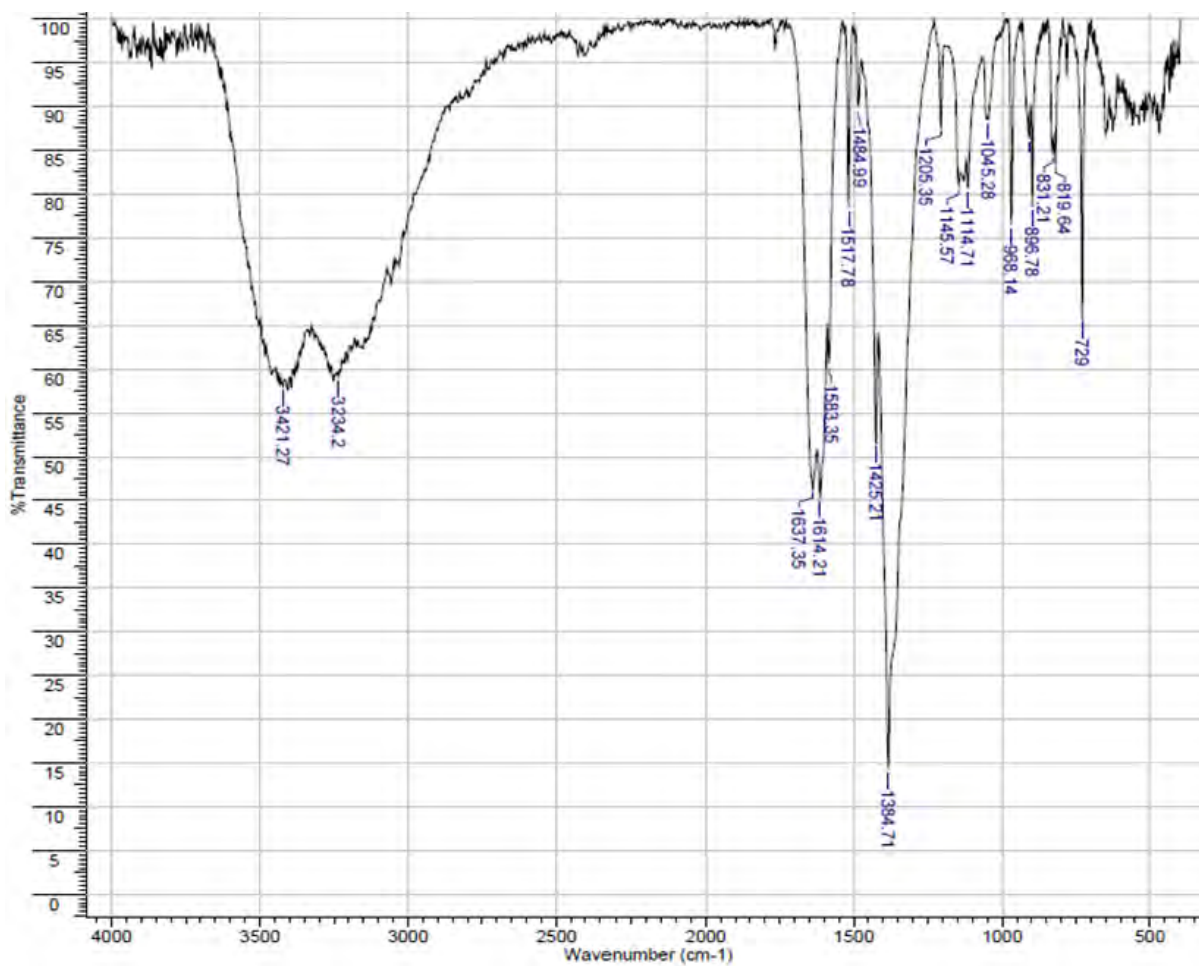


Figura 7.18: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(5-cloro,1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O



## Cas-VNO<sub>2</sub>-gly

Glicinato				Fenantrolina				
$\nu$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ NH <sub>2</sub>	$\nu_{as}$ COO <sup>-</sup>	$\delta$ NH <sub>2</sub>	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	NO <sub>3</sub> -iónico
3340	3144	1632	617	1520	1427	841	723	1384.71

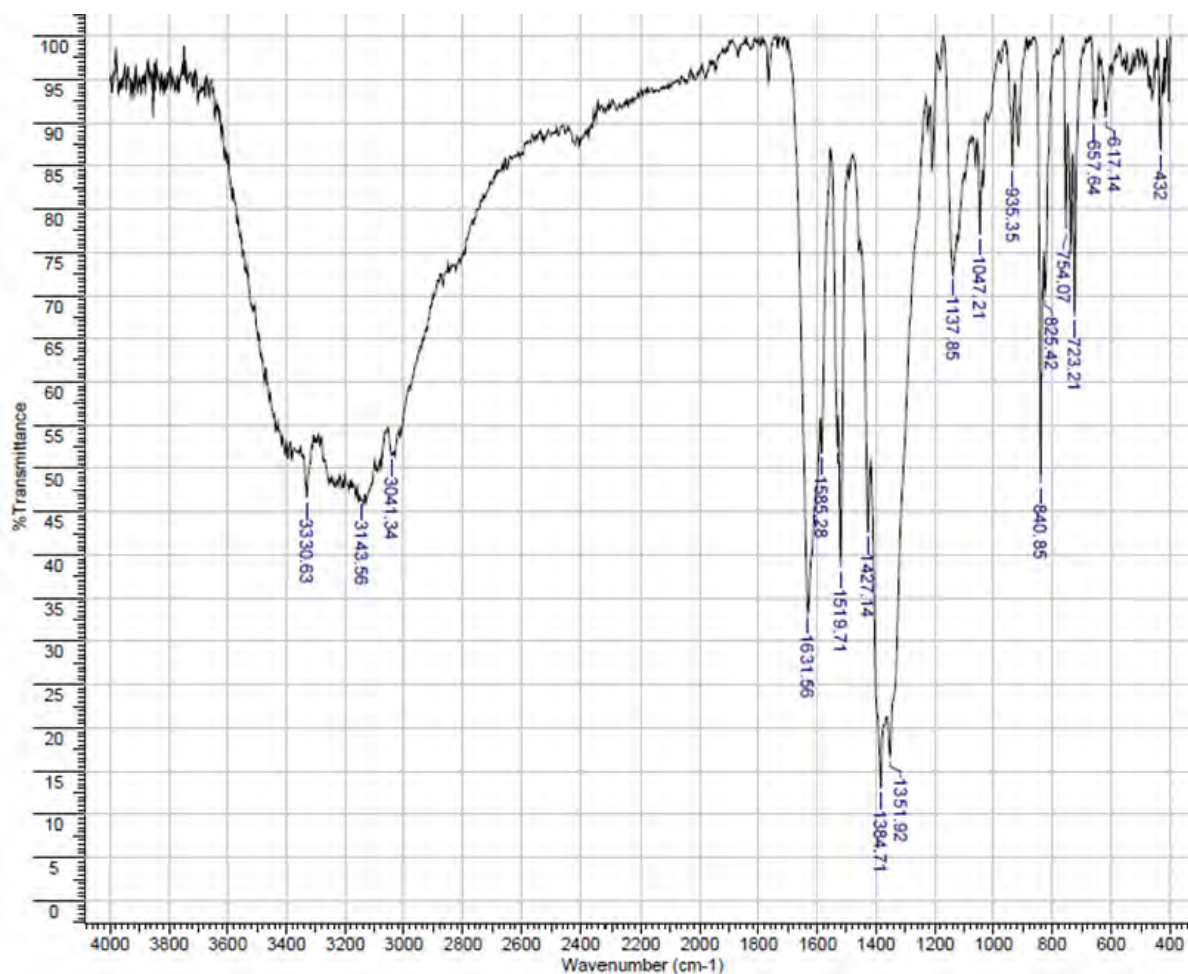
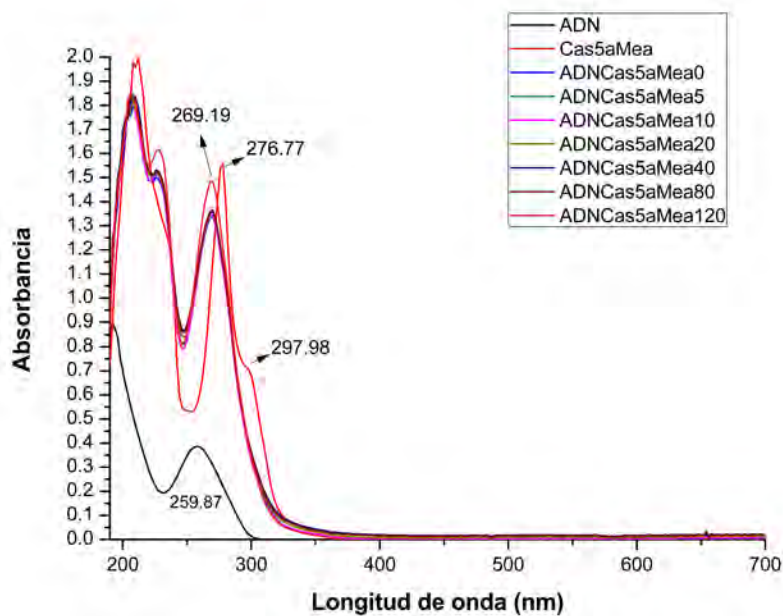


Figura 7.19: Espectro infrarrojo de la casiopeína [Cu(5-nitro,1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O

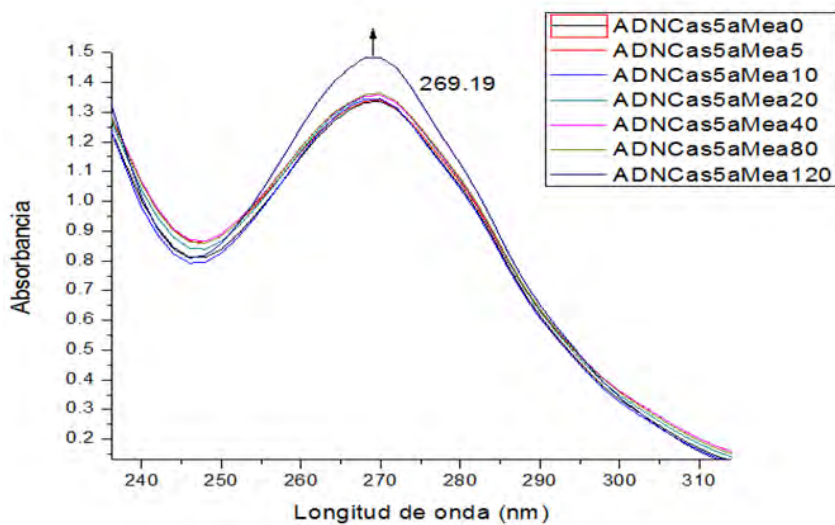
## Capítulo 8

Gráficas de los espectros de absorción electrónica en la región de UV-vis de la interacción de las casiopeínas con ADN

## Cas-5-Mea



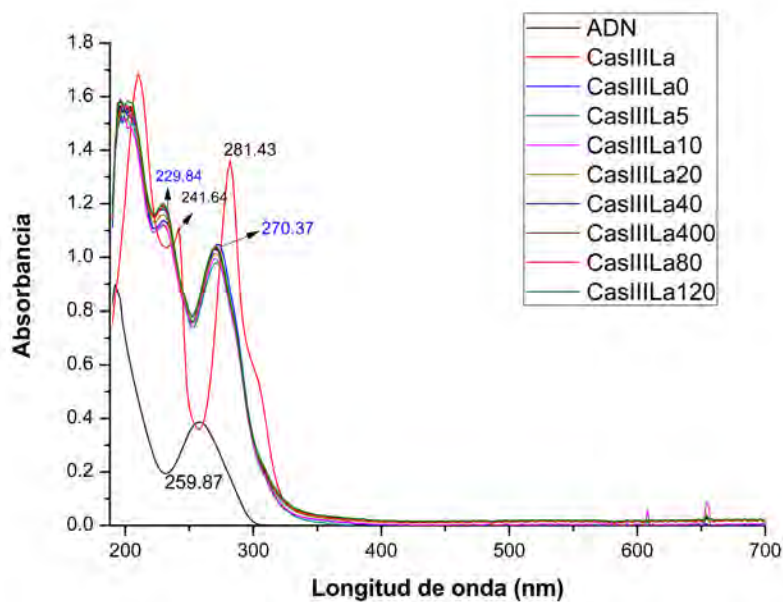
(a)



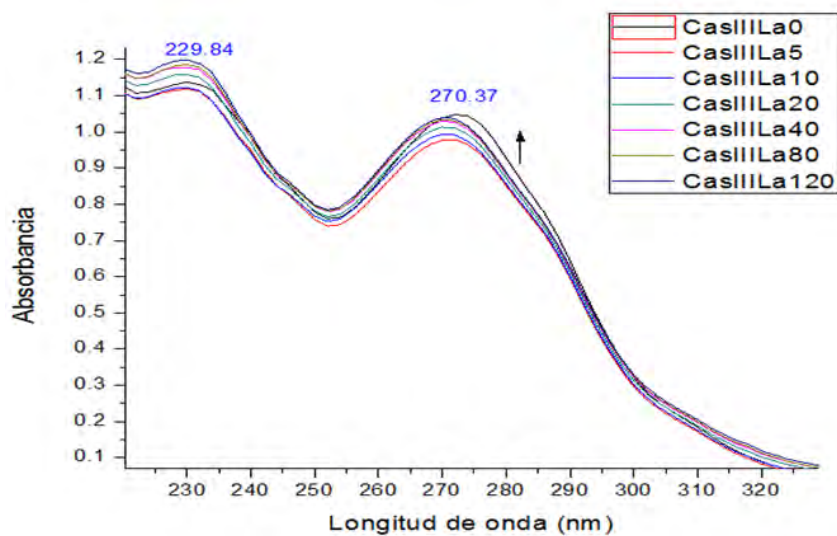
(b)

Figura 8.1: Espectro electrónico de Casiopeína-5a-Mea ( $35\mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20\text{ng}/\mu\text{l}$ ). a) Efecto hiperocrómico debido a la interacción de casiopeína-5a-Mea con ADN. b) Seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi - \pi^*$  de la interacción Cas-5a-Mea-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

## Cas-III-La



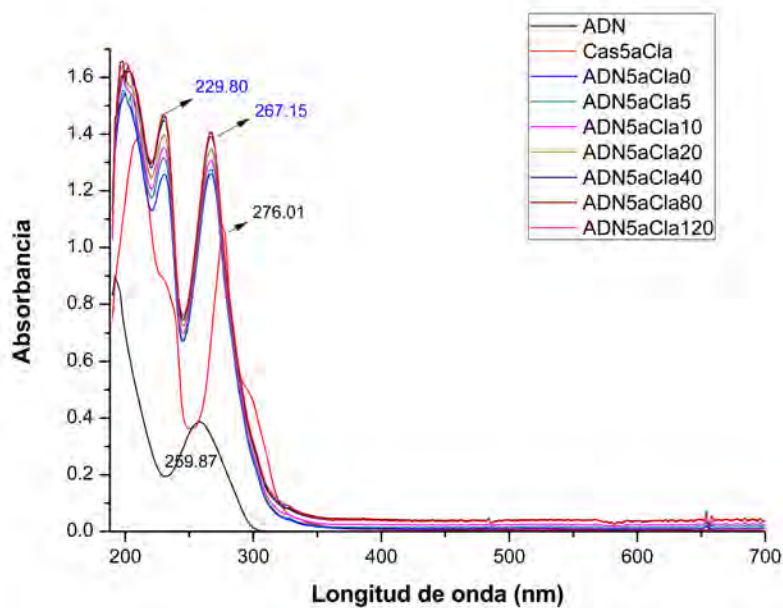
(a)



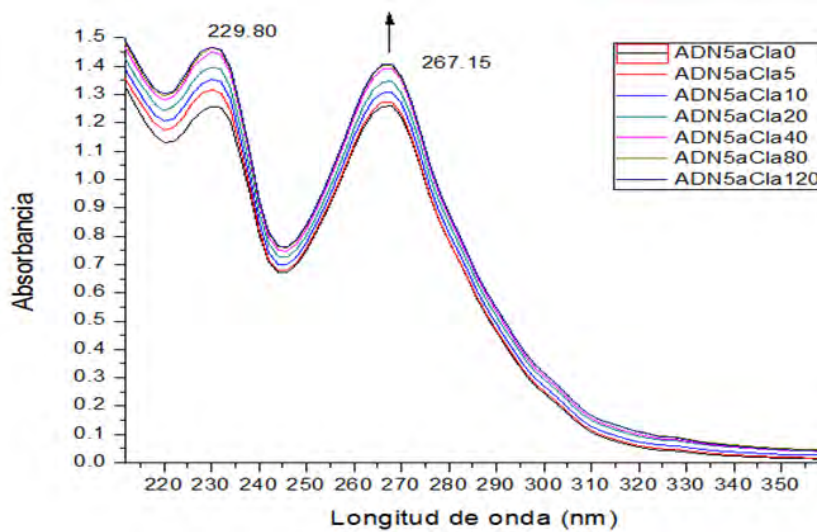
(b)

Figura 8.2: Espectro electrónico de Casiopeína-III-La ( $35\mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20\text{ng}/\mu\text{l}$ ). a) Efecto hiperocrómico debido a la interacción de casiopeína-III-La con ADN. b) Seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi-\pi^*$  de la interacción Cas-III-La-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

## Cas-5<sup>a</sup>-Cla



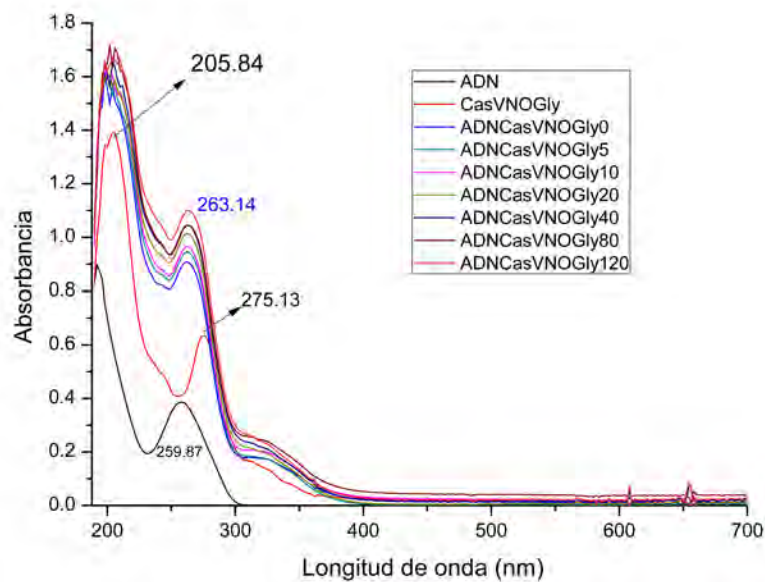
(a)



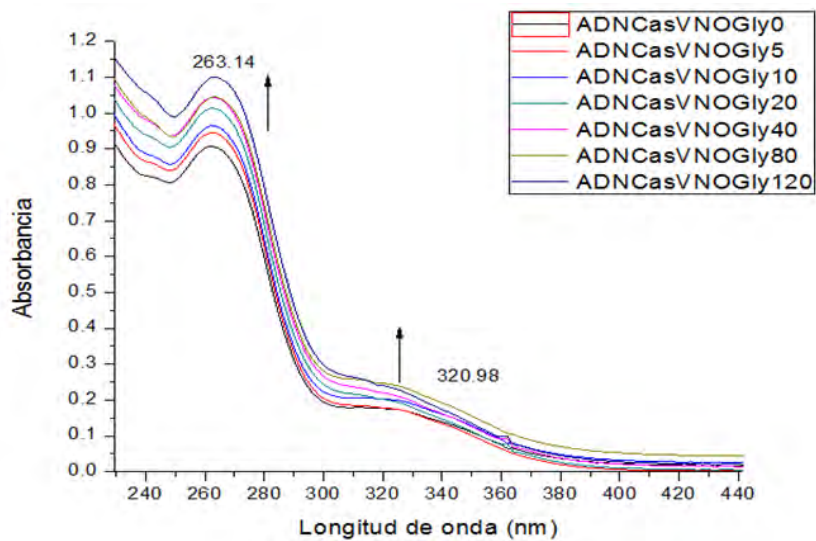
(b)

Figura 8.3: Espectro electrónico de Casiopeína-5a-Cla (35 μM) con ADN PBR322 (20 ng/μl). a) Efecto hiperocrómico debido a la interacción de casiopeína-5a-Cla con ADN. b) Seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi-\pi^*$  de la interacción Cas-5a-CI-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

## Cas-V-NO<sub>2</sub>-gly



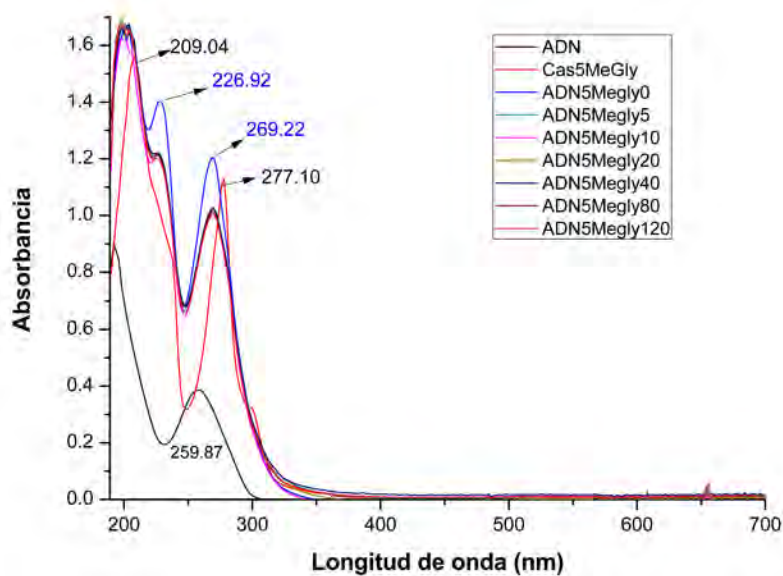
(a)



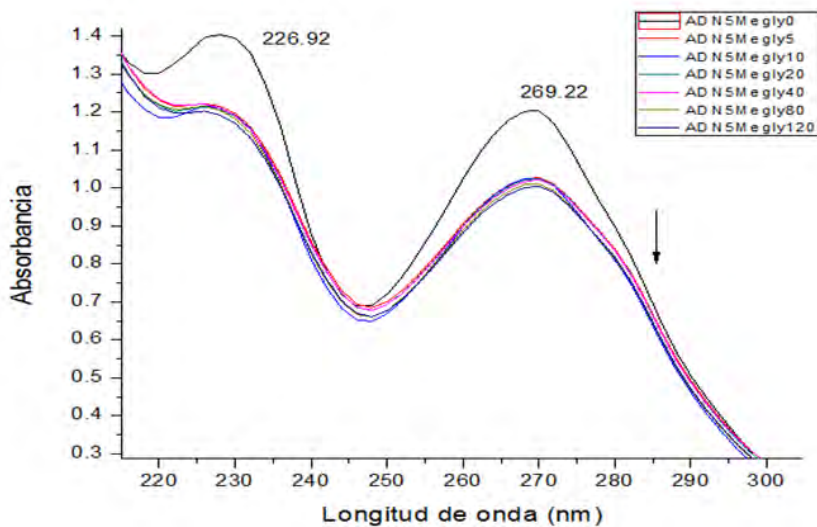
(b)

Figura 8.4: Espectro electrónico de Casiopeína-V-NO<sub>2</sub>-gly (35 μM) con ADN PBR322 (20 ng/μl). a) Efecto hiperocrómico debido a la interacción de casiopeína-V-NO<sub>2</sub>-gly con ADN. b) Seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi - \pi^*$  de la interacción Cas-V NO<sub>2</sub>-gly-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

## Cas-5Me-gly



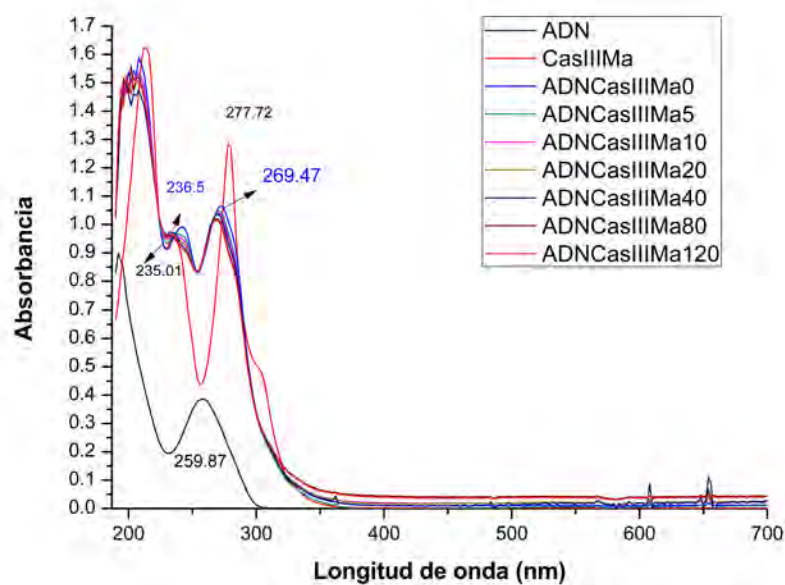
(a)



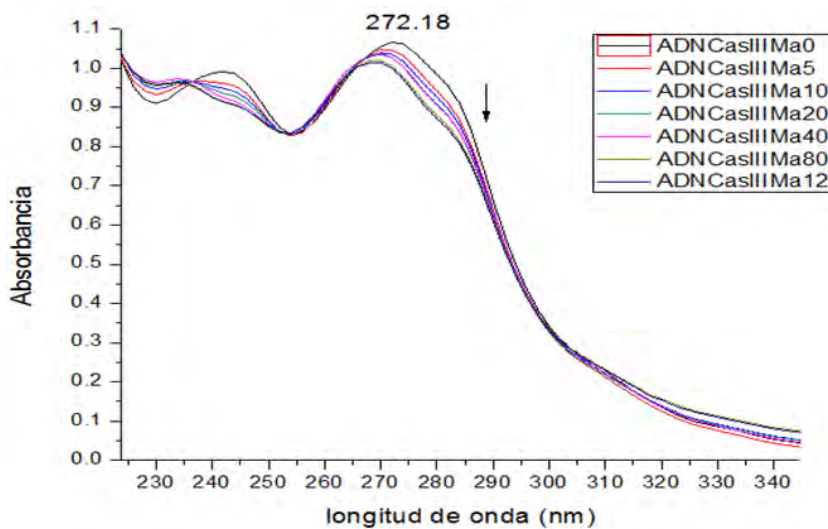
(b)

Figura 8.5: Espectro electrónico de Casiopeína-5-Me-gly ( $35\mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20\text{ng}/\mu\text{l}$ ). a) Efecto hipocrómico debido a la interacción de casiopeína-5-Me-gly con ADN. b) Seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi - \pi^*$  de la interacción Cas-5-Me-gly-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

## Cas-III-Ma



(a)

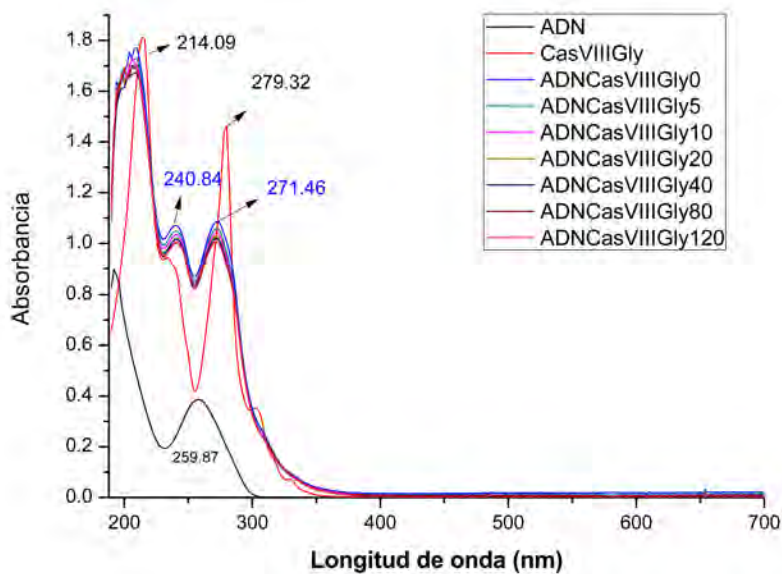


(b)

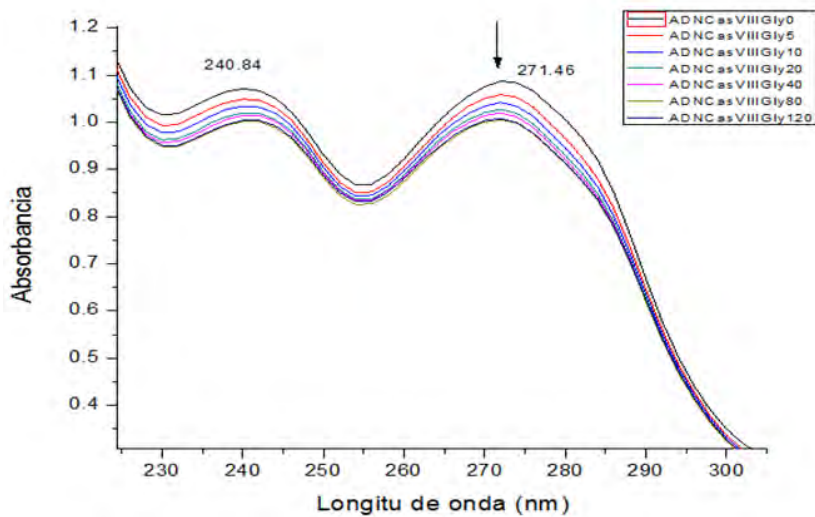
Figura 8.6: Espectro electrónico de Casiopeína-III-Ma ( $35\mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20\text{ng}/\mu\text{l}$ ). a) Efecto hipocrómico debido a la interacción de casiopeína-III-Ma con ADN. b) Seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi - \pi^*$  de la interacción Cas-III-Ma-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.



## Cas-VIII-gly



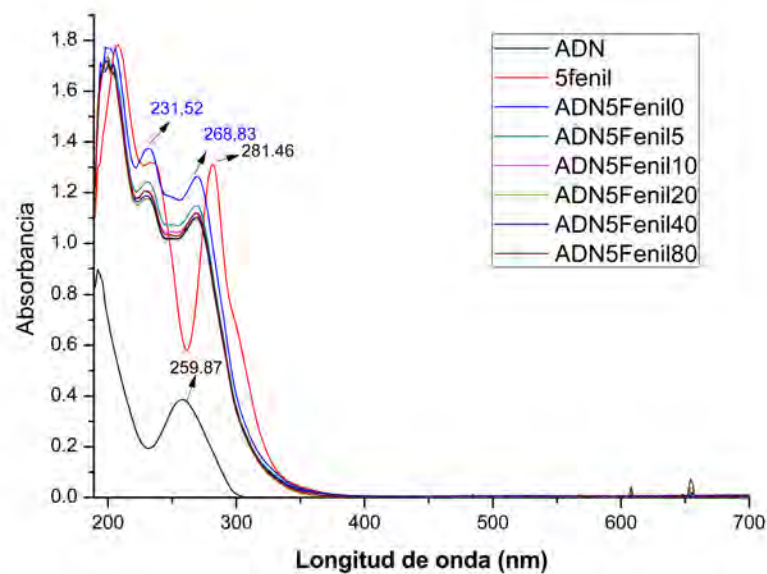
(a)



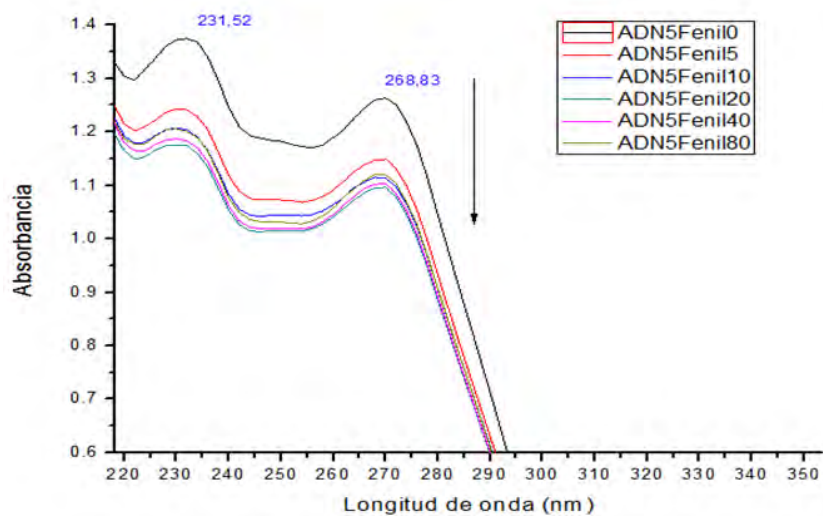
(b)

Figura 8.7: Espectro electrónico de Casiopeína-VIII-gly ( $35\mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20\text{ng}/\mu\text{l}$ ). a) Efecto hipocrómico debido a la interacción de casiopeína-VIII-gly con ADN. b) Seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi-\pi^*$  de la interacción Cas-VIII-gly-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

## Cas-V-Fe



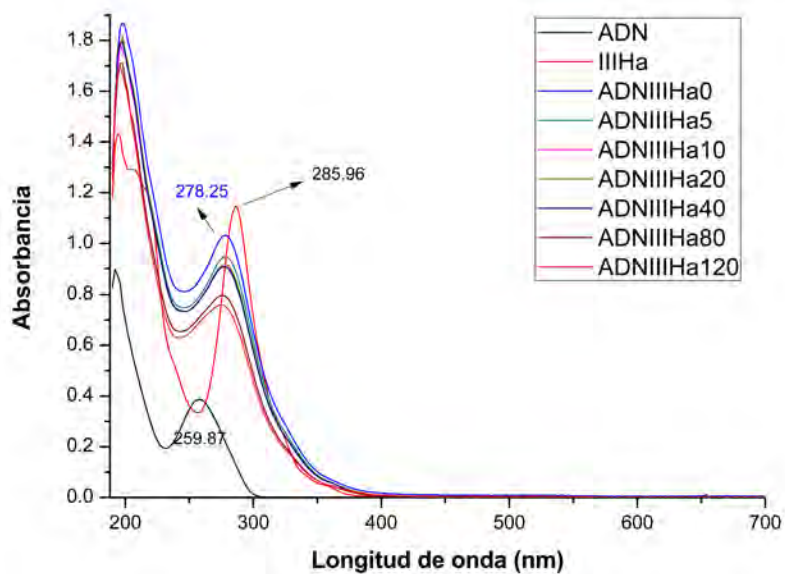
(a)



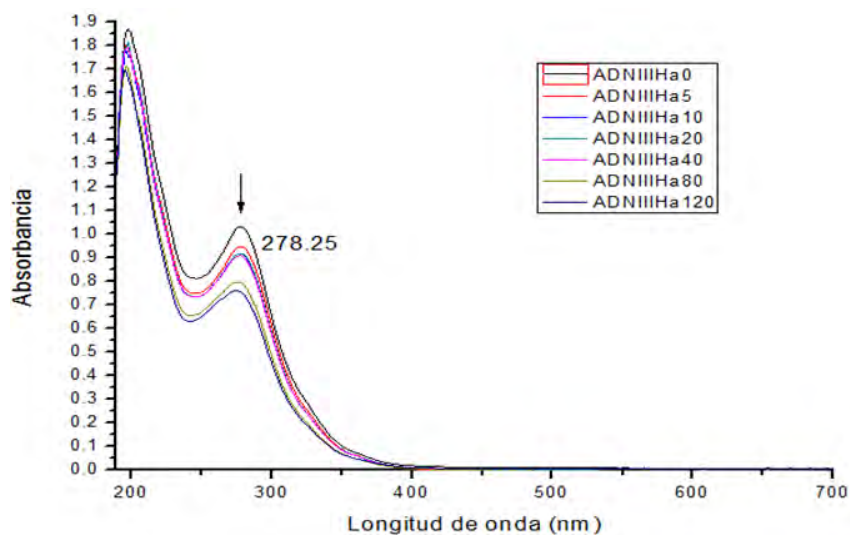
(b)

Figura 8.8: Espectro electrónico de Casiopeína-5-fen ( $35\mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20\text{ng}/\mu\text{l}$ ). a) Efecto hipocrómico debido a la interacción de casiopeína-5-fen con ADN. b) Seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi-\pi^*$  de la interacción Cas-5-fen-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.

## Cas-III-Ha



(a)



(b)

Figura 8.9: Espectro electrónico de Casiopeína-III-Ha ( $35\mu\text{M}$ ) con ADN PBR322 ( $20\text{ng}/\mu\text{l}$ ). a) Efecto hipocrómico debido a la interacción de casiopeína-III-Ha con ADN. b) Seguimiento de los cambios en las transiciones  $\pi-\pi^*$  de la interacción Cas-III-Ha-ADN. Los números en las acotaciones representan los minutos del tiempo de incubación.