



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE COMPUESTOS DE
COORDINACIÓN DE COBRE (II) CON ADN POR DICROÍSMO
CIRCULAR**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

KAREN RESENDIZ ACEVEDO

MÉXICO, D.F.

AÑO 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Lena Ruiz Azuara
VOCAL: Sigfrido Escalante Tovar
SECRETARIO: Claudia Paola Chávez Gómez Tagle
1er. SUPLENTE: Luis Felipe Hernández Ayala
2° SUPLENTE: Silvia Graciela Dávila Manzanilla

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIOS 5, 210 Y CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA (CIDETEQ)

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

Dra. Lena Ruiz Azuara

ASESOR DE TESIS

Dra. Silvia Graciela Dávila Manzanilla

SUPERVISOR TÉCNICO

Karen Resendiz Acevedo

SUSTENTANTE

Dedicatorias

A mis abuelos, que me educaron, apoyaron en todo momento y me hicieron la persona que soy hoy. Los quiero.

A mi mamá, por acompañarme incondicionalmente a lo largo de este camino, impulsarme y estar conmigo en todo momento. Te quiero.

A mis tíos, Jose, Javier, Mónica, Yofo y Edith, por hacerme reír en toda situación y ser los mejores tíos del mundo.

A Yari y Jorge. Los sueños se hacen realidad cuando trabajas duro por ellos, a pesar de lo difícil que parezca el camino.

A Jesús, el amor de mi vida, por estar conmigo siempre, por no dejar que me rindiera y por nunca soltar mi mano. Gracias por todo.

A Cynthia. Te agradezco por todo, por confiar en mí, por motivarme, por todos los momentos juntas, por estar conmigo cuando más lo necesité y por ser mi amiga incondicional.

A Alfon y Fany, por los cafés, por sacarme cientos de sonrisas y ser increíbles personas, compañeras e invaluableles amigas.

Agradecimientos

A la Dra. Lena, por recibirme en su increíble grupo de trabajo, por todo su apoyo y por dirigir este proyecto.

A CONACyT por la beca SNI-III otorgada con número de ayudante 14341.

A la red de Farmoquímicos por el apoyo otorgado.

Al Proyecto Ciencias Básicas 179119 por el apoyo otorgado.

Al Dr. Luis Ortiz Frade por permitirme usar su equipo de Dicroísmo Circular en CIDETEQ.

A la Dra. Silvia Dávila Manzanilla, por ayudarme la planeación de los experimentos, por ser mi guía, amiga y brindarme su ayuda en todo momento.

A la M. en C. Yeshenia Figueroa de Paz, por la asesoría durante este trabajo, el apoyo para la realización de los experimentos y por su linda amistad.

A la M. en C. Maricela Cruz por su apoyo técnico durante la estancia en CIDETEQ.

Al M. en C. Juan Pablo Rebolledo Chávez por su apoyo técnico durante la estancia en CIDETEQ.

Al M. en C. Adrián Espinoza Guillén, por la supervisión, apoyo técnico y su linda amistad.

A la Q. Areli Silva Becerril, por el apoyo brindado en el laboratorio 210, por los buenos momentos en Querétaro y por su amistad.

A mis compañeros del laboratorio 210, por sus aportaciones y observaciones para la realización de este trabajo.

Contenido

Abreviaturas

Índice de figuras

Índice de tablas

Índice de gráficas

1. Introducción	
1.1. Cáncer	1
1.2. Quimioterapia	4
1.3. ADN como blanco de agentes antineoplásicos	7
1.3.1. Alquilación	10
1.3.2. Intercalación	12
1.3.3. Interacción en los surcos	
1.4. Técnicas para evaluar la interacción del ADN con agentes antineoplásicos	14
2. Antecedentes	
2.1. Compuestos de cobre con actividad antitumoral	20
2.2. Casiopeínas[®]	21
2.2.1. Mecanismo de acción de las Casiopeínas[®]	23
2.2.2. Casiopeínas[®] y su interacción con ADN	24
3. Justificación	27
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	29
6. Material y métodos	30
7. Resultados	37
8. Análisis y discusión de resultados	51
9. Conclusiones	56

10. Referencias	57
11. Anexo A. Espectros de DC de las Casiopeínas® del grupo 1 y 2 con ADN.....	70
12. Anexo B. Espectros de DC de las Casiopeínas® del grupo 1 y 2.....	78
13. Anexo C. Características fisicoquímicas de las Casiopeínas® del Grupo 1 y 2.....	93

Abreviaturas

acac	Acetilacetato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Análisis elemental
BrEt	Bromuro de Etidio
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media
CasIII-Ba	Nitrato de 1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II)
Cas-5a-Ma	Nitrato de 4-metil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II)
CasIII-ia	Nitrato de 4,4'-dimetil-2,2'-bipridina acetilacetato cobre(II) monohidratado
CasIII-Ea	Nitrato de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) monohidratado
CasIII-La	Nitrato de 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) dihidratado
CasIII-Ma	Nitrato de 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) monohidratado
CasIII-Ha	Nitrato de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II)
CasIII-5a-Cla	Nitrato de 5-cloro-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II)
Cas-5-Megly	Nitrato de 5-metil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II)
CasII-gly	Nitrato de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) dihidratado

CasVI-gly	Nitrato de 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) monohidratado
CasVIII-gly	Nitrato de acua 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) monohidratado
CasI-gly	Nitrato de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II)
CasV-NO ₂ a-gly	Nitrato de 5-nitro-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II)
DC	Dicroísmo Circular
DL ₅₀	Dosis letal media
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
gly	Glicina/glicinato
IR	Infrarrojo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species)
salal	Salicilaldehidato
SOD	Superóxido dismutasa
UV-vis	Ultravioleta-visible

Índice de figuras

Figura 1. Aparición de células cancerosas hasta la formación de un tumor sólido maligno	2
Figura 2. Incidencia del cáncer a nivel mundial en 2012.....	3
Figura 3. Estructuras del 1) carboplatino, 2) oxaliplatino y 3) cisplatino.....	8
Figura 4. Mecanismo de acción del cisplatino con el ADN	9
Figura 5. Unión del cisplatino al ADN	9
Figura 6. Deformación de la doble hélice del ADN por acción de un agente intercalante	10
Figura 7. Estructuras de la 1) actinomicina, 2) daunorrubicina y 3) pirarubicina.....	11
Figura 8. Acomodo de la actinomicina con el ADN.....	12
Figura 9. Estructuras de la 1) distamicina y 2) netropsina.....	13
Figura 10. Acomodo de la distamicina en el ADN.....	13
Figura 11. Representación gráfica de la definición de elipticidad.....	16
Figura 12. Instrumentación del equipo de DC.....	17
Figura 13. Plásmido en su forma circular y superenrollada.....	19
Figura 14. Estructuras generales de las familias de las Casiopeínas®	21
Figura 15. Tipos de interacción entre las Casiopeínas® y el ADN, mediante dinámicamolecular.....	26
Figura 16. Estructuras de las Casiopeínas® del Grupo 1	33

Figura 17. Estructuras de las Casiopeínas[®] del Grupo 2.....34

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de las subfamilias de las Casiopeínas® con su fórmula general.....	23
Tabla 2. Controles positivos utilizados en el análisis por DC	32
Tabla 3. Claves y fórmulas condensadas de las Casiopeínas® del Grupo 1 a evaluar	33
Tabla 4. Claves y fórmulas condensadas de las Casiopeínas® del Grupo 1 a evaluar	34
Tabla 5. Concentración de las disoluciones de los blancos y controles positivo para el estudio por DC	36
Tabla 6. Valores de elipticidad para la banda de 240 nm de los controles positivos evaluados.....	51
Tabla 7. Valores de elipticidad para la banda de 270 nm de los controles positivos evaluados.....	51
Tabla 8. Valores de elipticidad para la banda de 240 nm de las Casiopeínas® evaluadas.....	52
Tabla 9. Valores de elipticidad para la banda de 270 nm de las Casiopeínas® evaluadas.....	52

Índice de gráficas

Gráfica 1. Espectro de UV visible del plásmido pBR322.....	38
Gráfica 2. Espectro de DC del ADN pBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación.....	40
Gráfica 3. Espectro de DC del cisplatino (200 μM) con ADN pBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación.....	41
Gráfica 4. Espectro de DC del BrET (70 μM) con ADN pBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación	42
Gráfica 5. Espectro de DC de la bleomicina (70 μM) con ADN pBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación	43
Gráfica 6. Espectro de DC de la Cas-IIgly (70 μM) con ADN pBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación	44
Gráfica 7. Espectro de DC de la Cas-5a-Cla (70 μM) con ADN pBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación	45
Gráfica 8. Espectro de DC de la CasIII-ia (70 μM) con ADN pBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación	46
Gráfica 9. Espectro de DC de la CasIII-Ba (70 μM) con ADN PBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación	47
Gráfica 10. Espectro de DC de la CasIII-Ma (70 μM) con ADN PBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación	48
Gráfica 11. Espectro de DC de la Cas-5a-Ma (70 μM) con ADN pBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación.....	49
Gráfica 12. Espectro de DC de la Cas-5-Megly (70 μM) con ADN pBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación.....	50
Gráfica 13. Espectro de DC de la CasIII-Ea (70 μM) con ADN pBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación.....	71
Gráfica 14. Espectro de DC de la CasIII-La (70 μM) con ADN pBR322 (40 ng/μL) a diferentes tiempos de incubación.....	72

Gráfica 15. Espectro de DC de la CasIII-Ha (70 μ M) con ADN pBR322 (40 ng/ μ L) a diferentes tiempos de incubación.....	73
Gráfica 16. Espectro de DC de la CasVI-gly (70 μ M) con ADN pBR322 (40 ng/ μ L) a diferentes tiempos de incubación.....	74
Gráfica 17. Espectro de DC de la CasVIII-gly (70 μ M) con ADN pBR322 (40 ng/ μ L) a diferentes tiempos de incubación.....	75
Gráfica 18. Espectro de DC de la Cas-I-gly (70 μ M) con ADN pBR322 (40 ng/ μ L) a diferentes tiempos de incubación.....	76
Gráfica 19. Espectro de DC de la Cas-V-NO2a-gly (70 μ M) con ADN pBR322 (40 ng/ μ L) a diferentes tiempos de incubación.....	77
Gráfica 19. Espectro de DC de la CasIII-Ba (70 μ M)	79
Gráfica 20. Espectro de DC de la Cas-5a-Ma (70 μ M)	79
Gráfica 21. Espectro de DC de la CasIII-ia (70 μ M)	80
Gráfica 22. Espectro de DC de la CasIII-Ea (70 μ M)	80
Gráfica 23. Espectro de DC de la CasIII-La (70 μ M)	81
Gráfica 24. Espectro de DC de la CasIII-Ma (70 μ M)	81
Gráfica 25. Espectro de DC de la CasIII-Ha (70 μ M)	82
Gráfica 26. Espectro de DC de la CasIII-5a-Cla (70 μ M)	82
Gráfica 27. Espectro de DC de la Cas-5-Megly (70 μ M)	83
Gráfica 28. Espectro de DC de la CasII-gly (70 μ M)	83
Gráfica 29. Espectro de DC de la CasVI-gly (70 μ M)	84
Gráfica 30. Espectro de DC de la CasVIII-gly (70 μ M)	84
Gráfica 31. Espectro de DC de la CasI-gly (70 μ M)	85
Gráfica 32. Espectro de DC de la CasV-NO2a-gly (70 μ M)	85

Capítulo 1

Introducción

1.1 Cáncer

El cáncer engloba a un conjunto de enfermedades relacionadas a la división descontrolada de células anormales, que crecen e invaden las células sanas del cuerpo. Normalmente, las células, cuando el cuerpo lo requiere, crecen y se dividen para formar nuevas y células demasiado viejas o dañadas, mueren, tomando las células nuevas su lugar. Cuando el cáncer se desarrolla, este proceso ordenado se ve alterado y las células comienzan a crecer incontrolablemente generando un tumor. [1,2].

Un tumor es una masa de tejido que posee un crecimiento anormal de células en alguna parte del organismo y no tiene ninguna función fisiológica, éste puede ser inofensivo o maligno [3,4]. En la **Figura 1**, se ilustra el proceso, de la formación de un tumor maligno desde la aparición de células cancerosas, hasta la formación de un tumor maligno. Por otro lado, si los tumores sólidos son inofensivos y permanecen en su lugar de origen, generalmente pueden ser removidos y no plantean amenaza a largo plazo, se consideran tumores benignos.

Un tumor canceroso es maligno cuando puede propagarse o invadir tejidos cercanos; lo que significa que a medida que estos tumores crecen, algunas células cancerosas pueden separarse y viajar a lugares distantes del cuerpo a través de la sangre o el sistema linfático y formar nuevos tumores lejos del tumor original (metástasis) [3,4].

La mayoría de los tipos de cáncer forman tumores sólidos, excepto los tipos de cáncer asociados a sangre, como las leucemias originadas generalmente en los glóbulos blancos [5].

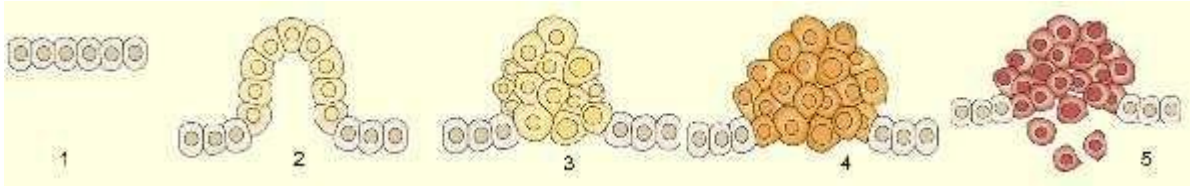


Figura 1. Formación de un tumor sólido: 1) células sanas, 2) aparición de las primeras células cancerosas, 3) formación de un cúmulo de células dañadas, 4) acumulación de mayor número de células cancerosas, 5) Aparición del tumor maligno.

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Este puede desarrollarse por diversos factores asociados al estilo de vida tales como tabaquismo, consumo de alcohol en exceso, exposición a radiación ultravioleta, sobrepeso, obesidad o por antecedentes familiares [6].

En 2015 se le atribuyeron 8,8 millones de muertes a nivel mundial, siendo el cáncer de pulmón, hígado, estómago, colon y mama los que causan mayor número de decesos, además aparecen aproximadamente, 14 millones de casos nuevos [7].

La **Figura 2**, muestra un estimado de 2012 sobre la incidencia y mortalidad causada por diferentes tipos de cáncer en México, tanto en hombres como en mujeres. Se observa que entre los tipos de cáncer de mayor incidencia se encuentran el de mama, cervicouterino y próstata; en contraste, los que causan un mayor número de decesos son el cáncer de colon, pulmón y estómago [8].

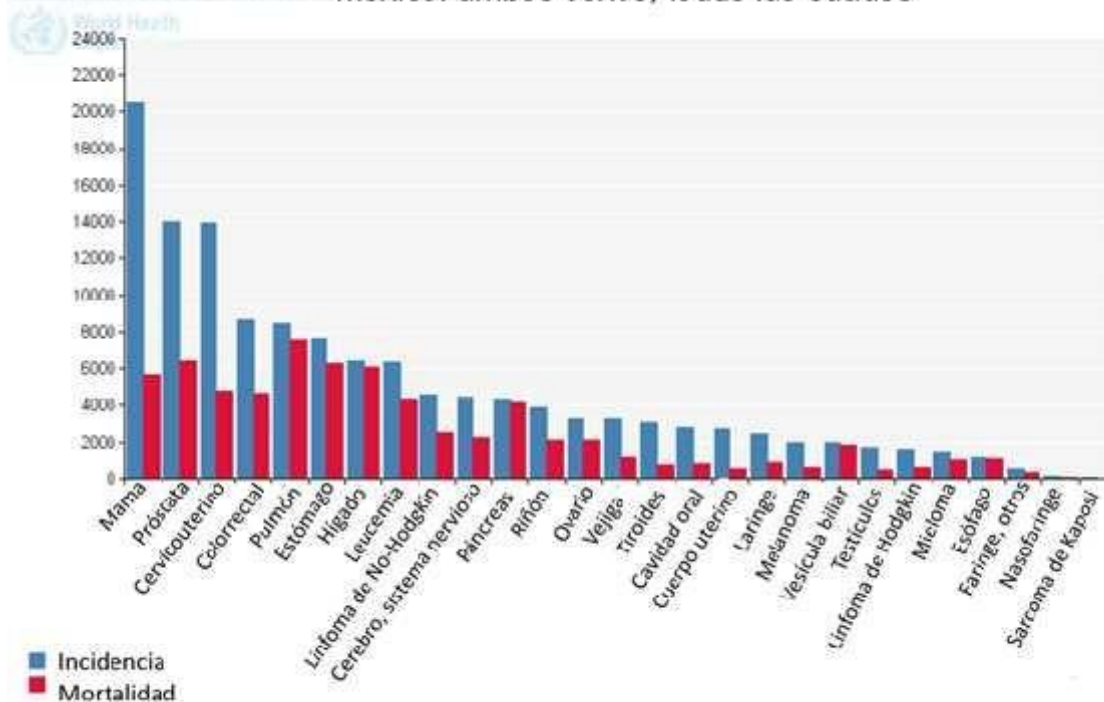


Figura 2. Estimado de incidencia y mortalidad por diferentes tipos de cáncer en México año 2012 (tasa por 100 000 habitantes). Figura traducida de la Globocan: Incidencia estimada del cáncer,OMS [8].

Existen diferentes tratamientos contra el cáncer, el uso de uno u otro depende del tipo de cáncer y del nivel de avance de éste. Entre ellos se encuentran [9, 10]:

Cirugía. El cáncer es eliminado del cuerpo por medio de una intervención quirúrgica.

Radioterapia. En ella se utiliza radiación para reducir tumores y destruir células cancerosas y retrasar el crecimiento del tumor sin dañar tejido sano cercano.

Inmunoterapia. Tipo de tratamiento para el cáncer que estimula las defensas naturales del cuerpo a fin de combatir el cáncer. Utiliza sustancias producidas por

el cuerpo o fabricadas en un laboratorio para mejorar o restaurar la función del sistema inmunológico.

Terapia dirigida. Actúa sobre proteínas o genes específicos asociados a los cambios en las células cancerosas, que les ayudan a crecer, dividirse y propagarse, deteniendo la diseminación de éstas.

Terapia hormonal. Tratamiento que frena o detiene el crecimiento de los tipos de cáncer mama y próstata que utilizan hormonas para detener su crecimiento y proliferación.

Medicina de precisión. Se dirige hacia el cuidado del cáncer que permite a los médicos a seleccionar los tratamientos que son más propensos a ayudar a los pacientes, basados en una comprensión genética de su enfermedad.

Quimioterapia. Tipo de tratamiento sistémico contra el cáncer que utiliza medicamentos para eliminar la población de las células cancerosas.

La Quimioterapia es uno de los tratamientos mayormente utilizados a nivel mundial, ya que es una opción para combatir, controlar y aliviar algunos de los síntomas causados por la enfermedad (tratamiento paliativo) [11].

1.2. Quimioterapia

La quimioterapia es el tratamiento para muchos tipos de cáncer; en él, los medicamentos viajan a través de todo el cuerpo hasta llegar a las células cancerosas en cualquier lugar en el que se hayan propagado (tratamiento sistémico) [10].

Los fármacos quimioterapéuticos se clasifican según: la función de su mecanismo de acción, su estructura química, su sitio de acción o el efecto que tienen sobre las células cancerosas [10, 12, 13, 14].

El estudio del mecanismo de acción de los fármacos requiere el conocimiento de los procesos químicos que tienen lugar entre él y su diana biológica o blanco molecular que puede definirse como el lugar del organismo en el que el fármaco ejerce su acción [15].

Las dianas biológicas de los fármacos antineoplásicos pueden ser diversas, siendo los principales objetivos las biomoléculas tales como: el ADN, proteínas o enzimas [16].

De acuerdo con su mecanismo de acción se clasifican principalmente en: 1) inhibidores de angiogénesis, 2) inhibidores de síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), 3) inhibidores enzimáticos, 4) reguladores de genes, 5) reguladores de ciclo celular y 6) agentes intercalantes e interacción en los surcos del ADN [14], estos se describen a continuación.

1) Inhibidores de la angiogénesis: La angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos nuevos, por la migración y crecimiento de células endoteliales. El organismo regula este proceso por medio de señales químicas que estimulan la formación o reparación vasos sanguíneos. Las moléculas que actúan a este nivel interfieren con la formación de éstos, ya que, en enfermedades como el cáncer, provoca que células dañadas se distribuyan en el cuerpo, previniendo una metástasis de este [17,18]. Por ejemplo, el medicamento bevacizumab (Avastin®) es un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a receptores en la superficie de células endoteliales [19].

2) Inhibidores de síntesis de ADN: La característica principal que define al cáncer es la división incontrolable de células dañadas. Para inhibir este proceso, la replicación del ADN de células afectadas debe detenerse por lo que la molécula blanco será la enzima ADN polimerasa, encargada de la replicación del ADN [19]. Algunos compuestos que actúan mediante este mecanismo son: 5-fluorouracilo, mitomicina C, entre otros [14,16, 20].

- 3) Inhibidores enzimáticos:** Los agentes antineoplásicos que funcionan por medio de este mecanismo buscan retrasar y prevenir el crecimiento tumoral a través de la inhibición de enzimas. Una de ellas es la topoisomerasa, enzima responsable del desenrollamiento del ADN durante la replicación. Fármacos que actúan por este mecanismo son: actinomicina D, daunorubicina, doxorubicina, idarrubicina entre otros [17].
- 4) Reguladores de genes:** Las alteraciones epigenéticas en el ADN, están involucradas en las primeras etapas donde las células sanas, se transforman en células tumorales. Se ha propuesto que en las alteraciones genéticas se producen genes que favorecen la proliferación celular, diferenciación y la pérdida o ganancia de funciones anormales en las células. Los cambios epigenéticos relevantes para el cáncer ocurren en genes que codifican proteínas y dan como resultado una expresión de estas con una secuencia errónea [21].
- 5) Agentes reguladores del ciclo celular:** Las células normales, al presentar un daño al ADN, son capaces de detener el ciclo celular con el propósito de que se mantenga la integridad de la información genética. Cuando los genes que regulan el ciclo celular se ven afectados, las células dañadas proliferan y producen la enfermedad. Por lo que la búsqueda de antineoplásicos capaces de modular el ciclo celular se mantiene vigente [22].
- 6) Agentes alquilantes, intercalantes e interacción en los surcos del ADN:** Las moléculas pequeñas pueden interactuar o unirse con el ADN, alterando procesos de reconocimiento y función asociados a proteínas, entre ellas se encuentran, las polimerasas, topoisomerasas, factores de transcripción y sistemas de reparación de ADN [16].

1.3. ADN como blanco de agentes antineoplásicos

Desde el desarrollo del cisplatino, el ADN, se convirtió en uno de los principales objetivos biológicos para los compuestos antitumorales. Asimismo, la interacción de los fármacos con el ADN puede darse de manera directa o indirecta con él, además presentan diferentes modos de unión [23].

Las interacciones moleculares del ADN, con los fármacos antineoplásicos se pueden clasificar en dos modos de unión: covalente y no covalente. Éste tipo de uniones ADN-fármaco, puede conducir a una completa inhibición de los procesos celulares y llevar a una muerte por apoptosis [23].

Dentro de las interacciones covalentes al ADN se encuentra la alquilación que son generalmente uniones irreversibles. En las interacciones de tipo no covalente se encuentran: enlaces enzima topoisomerasa-ADN-fármaco, interacciones en los surcos, interacciones electrostáticas y enlaces por intercalación; siendo estas tres últimas las más frecuentes [15,24].

Las uniones de tipo no covalente con el ADN suelen ser reversibles y preferidas sobre las uniones covalentes, ya que estas últimas, pueden unirse a sitios no deseados quedando los fármacos inamovibles, provocando efectos tóxicos en el organismo [25].

1.3.1. Alquilación

Los agentes alquilantes, son compuestos fuertemente electrofílicos que forman enlaces covalentes con los grupos nucleofílicos del ADN. Evitan que la célula se replique inhibiendo los procesos de transcripción y traducción al dañar la doble hélice, lo que resulta en la muerte de la célula dañada. Son eficaces durante cada fase del ciclo de vida de una célula cancerosa [26], lo que significa que pueden actuar ante una amplia gama de tipos de cáncer [27,28].

En la **Figura 3** se presentan las estructuras del carboplatino [29], oxaliplatino [30] y cisplatino [31] estos compuestos se unen de manera covalente al ADN.

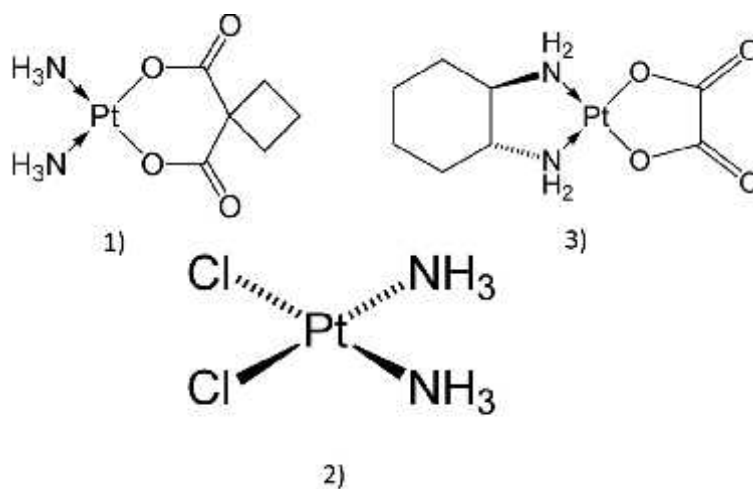


Figura 3. Estructuras del 1) carboplatino, 2) oxaliplatino y 3) cisplatino [29,30, 31]

El mecanismo de acción del cisplatino se ilustra en la **Figura 4**, donde después de su administración este atraviesa la membrana celular, sufre una hidrólisis y pierde dos átomos de cloro de su estructura, en consecuencia se convierte en una molécula electrofílica capaz de interactuar con los grupos nucleofílicos del ADN (pares de bases) y formar enlaces covalentes que llevan a la muerte celular [31].

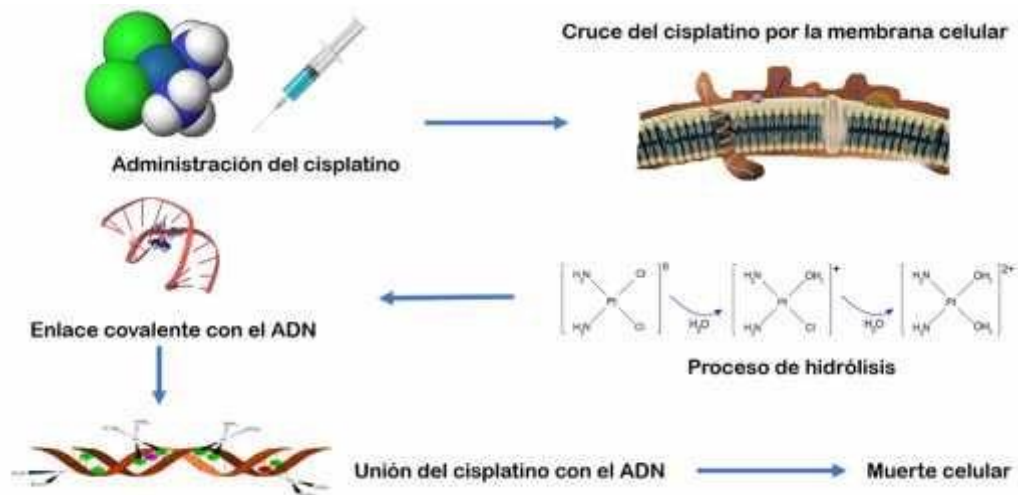


Figura 4. Mecanismo de acción del cisplatino con el ADN.

La unión del cisplatino con el ADN se muestra de forma más clara en la **Figura 5**.

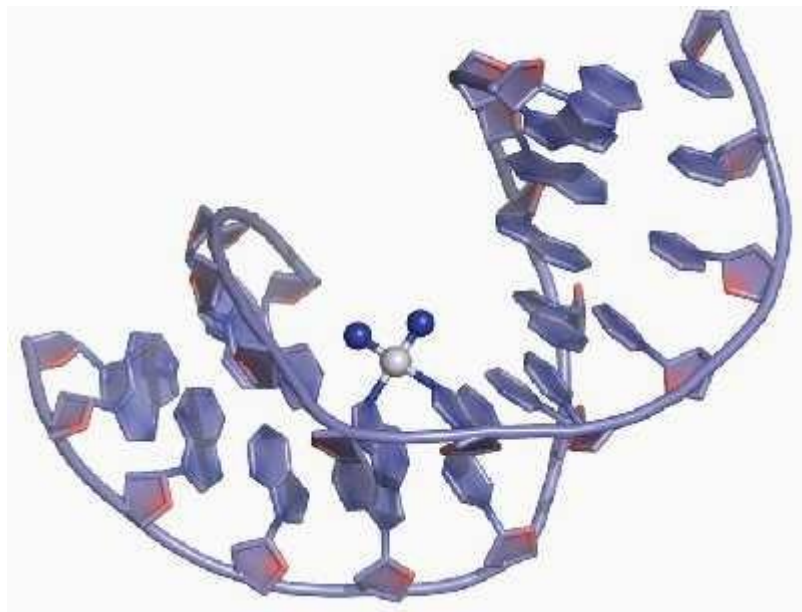


Figura 5. Unión del cisplatino al ADN. Imagen tomada de Atbio [32].

1.3.2. Intercalación

La intercalación implica la inserción de una molécula plana entre los pares de bases de ADN en el surco mayor o menor (**Figura 6**), lo que resulta en una disminución en el giro helicoidal y el alargamiento de la doble hélice [33].

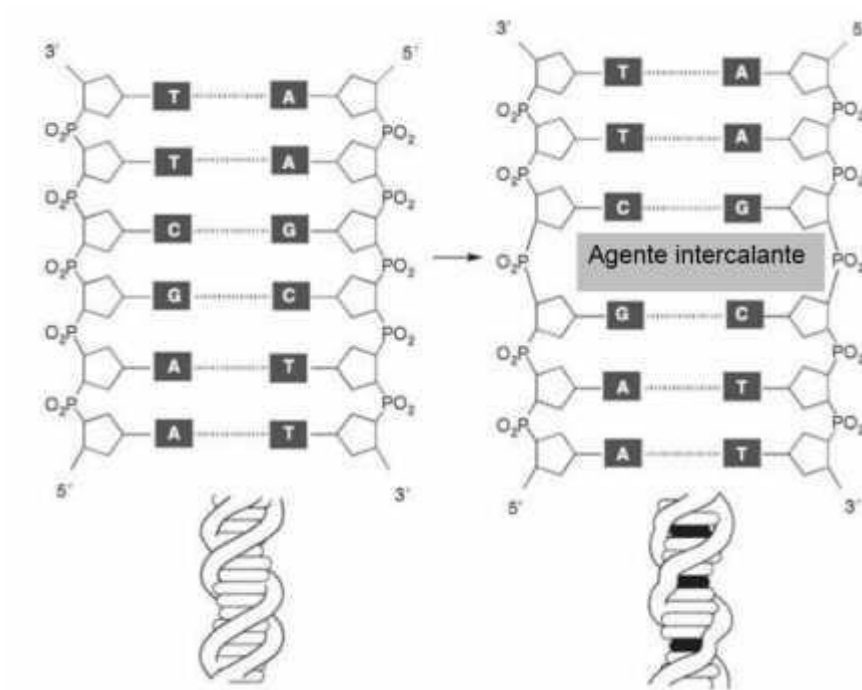


Figura 6. Deformación de la doble hélice del ADN por acción de un agente intercalante.

Para que el agente intercalante se ajuste, el ADN debe abrir un espacio entre sus pares de bases desenrollándose. El grado de desenrollamiento dependerá del intercalador; en el caso del cisplatino, muestra una preferencia por las regiones de guanina-citosina del ADN. Esta selectividad se debe principalmente a las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas de los sustituyentes unidos al intercalante hacia las pares bases de la doble hélice [34].

Los agentes intercalantes se usan en el tratamiento quimioterapéutico para inhibir la transcripción, la replicación y procesos de reparación del ADN, éste es considerado su principal modo de acción porque evita que las células afectadas sigan multiplicándose [2].

Generalmente, moléculas planas aromáticas o hetroaromáticas pueden unirse de forma intercalante al ADN. Ejemplos de fármacos antineoplásicos que se intercalan al ADN son la actinomicina, daunorrubicina y pirarubicina [35] sus estructuras se presentan en la **Figura 7**.

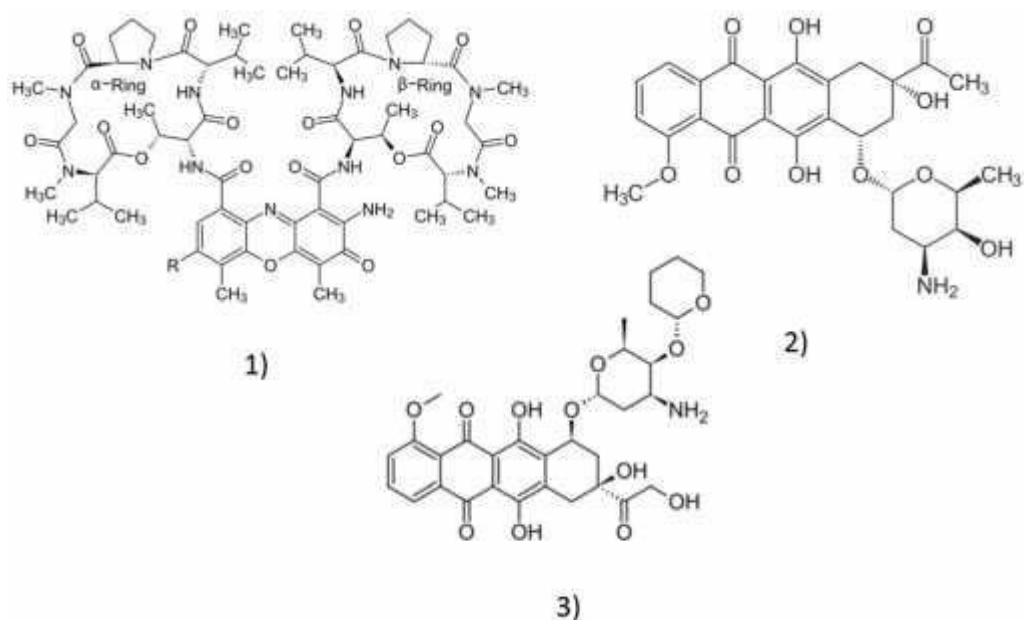


Figura 7. Estructuras de la 1) actinomicina, 2) daunorrubicina y 3) pirarubicina [35].

En la **Figura 8**, se muestra el acomodo de la actinomicina con el ADN.

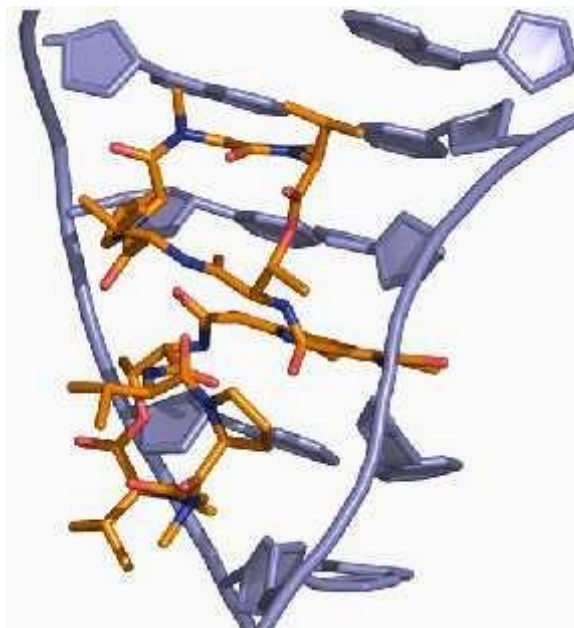


Figura 8. Acomodo de la actinomicina con el ADN. Imagen tomada de Atbio [32].

1.3.3. Interacción en los surcos

El modo de unión por interacción en surcos generalmente es más específico ya que prefieren regiones ricas en adenina y timina, además se ha observado que generalmente las estructuras de los fármacos coinciden con la forma del surco menor, por lo que fácilmente logran acoplarse a él generando interacciones de tipo Van der Waals o enlaces de hidrógeno lo que resulta en una menor toxicidad a comparación de la unión por intercalación [35]. Las moléculas que en la mayoría de los casos presentan este tipo de interacción con el ADN, se constituyen a partir de una serie de anillos de hidrocarburo heterocíclicos o aromáticos que poseen libertad de rotación, por ejemplo la distamicina, netropsina [36] en la **Figura 9**. se presentan sus estructuras.

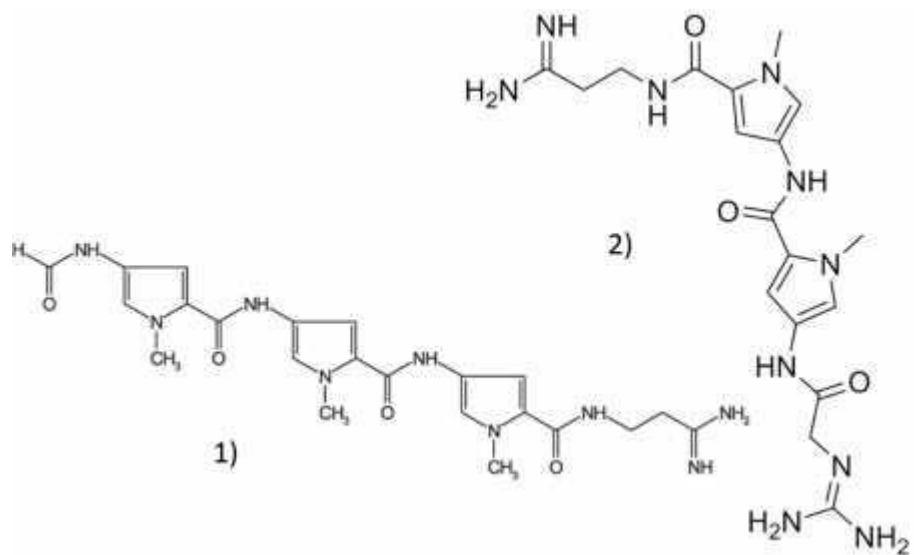


Figura 9. Estructuras de la 1) distamicina y 2) netropsina [36].

La **Figura 10** se muestra la unión de la distamicina al ADN.

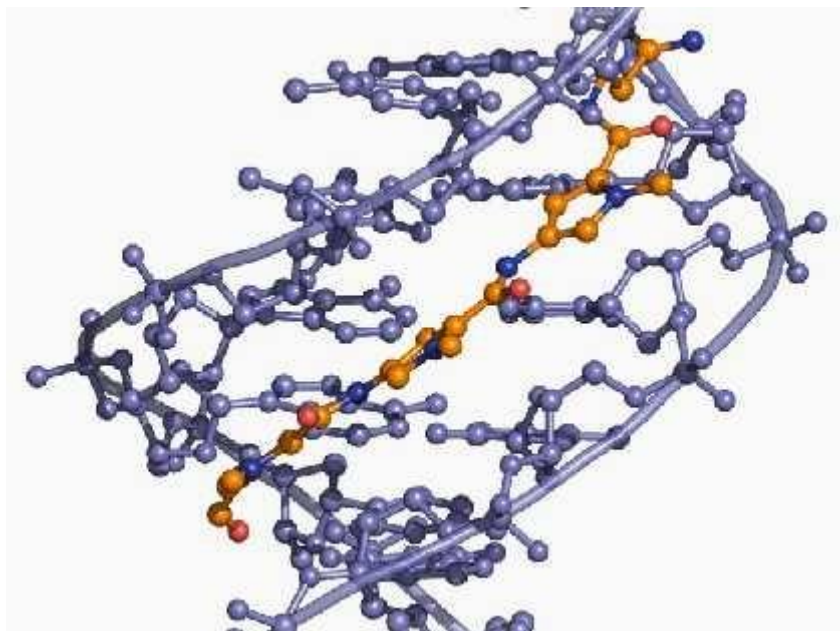


Figura 10. Acomodo de la distamicina en el ADN. Imagen tomada de Atbio [32].

En contraste las interacciones entre moléculas con potencial farmacológico al surco mayor no ha sido ampliamente explorado debido a la necesidad de diseñar moléculas más grandes capaces de unirse al él lo cual se traduce en una complejidad para sintetizarlos [37].

1.4. Técnicas para evaluar la interacción del ADN con agentes antineoplásicos

En los últimos años, se ha tenido un creciente interés en conocer cómo interactúan compuestos antineoplásicos con el ADN. Las herramientas analíticas, como son las técnicas espectroscópicas (UV-vis, fluorescencia y DC) y no espectroscópicas (voltamperometría cíclica y electroforesis) [38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45,46] han resultado de gran utilidad para la interpretar estas interacciones, gracias a que las uniones ADN-fármaco, pueden generar una absorción y/o emisión de radiación electromagnética, que a su vez se traduce en señales que se pueden asociar a una forma interacción u otra. Esto puede proporcionar información para el mejoramiento en el diseño de medicamentos y conducir a una mayor comprensión del mecanismo de interacción entre los medicamentos contra el cáncer y el ADN [39].

Espectroscopía de UV-vis

La espectroscopía de UV-vis es la técnica más sencilla para estudiar la estabilidad del ADN, así como las interacciones con las moléculas con las que se encuentre en contacto. El espectro de UV-vis del ADN muestra una amplia banda (200-350 nm), con una absorción máxima en 260 nm. Este máximo es consecuencia de transiciones electrónicas debidas a las propiedades cromóforas de las pares de bases del ADN, que además nos sirve para cuantificarlo y determinar si se

encuentra puro o no [40]. Los cambios en la absorción o el desplazamiento del máximo de esta banda son consecuencia de la interacción del ADN y el fármaco y la magnitud del desplazamiento de la misma puede asociarse también a la fuerza de la interacción entre las dos especies [40].

En los espectros de UV-vis del ADN, suelen apreciarse dos efectos: el hipocromismo y el hiperchromismo, resultantes de los cambios conformacionales de la doble hélice.

El hipocromismo (disminución de la absorbancia), se presenta por lo general en moléculas intercalantes debido a la desestabilización de la estructura del ADN, esto provoca que los orbitales π^* de los ligantes del fármaco se acoplen con los orbitales π de los pares de bases, debido a esto el orbital π^* del acoplamiento queda parcialmente lleno de electrones, lo que provoca la disminución de las probabilidades de transición de los mismos y resulte en un efecto de tipo hipocrómico [47].

Cuando el ADN interactúa con un fármaco, las interacciones entre los pares de bases que sostienen la estructura de la doble hélice se interrumpen y causa su separación en dos cadenas simples, por lo que la interacción base-base se reduce y provoca que estas queden libres y cargadas aumentando la absorbancia (efecto hiperocrómico) casi un 40 % a comparación del ADN bicatenario en la misma concentración [40].

Espectroscopía de Fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia también se usa para determinar el modo de unión de fármacos al ADN, basándose en las propiedades fluorescentes que pueden presentar los fármacos en cuestión [30]. Al existir una interacción, la fluorescencia de los espectros de emisión del fármaco se ve modificada dependiendo del tipo de modo de unión presente. Por ejemplo, en presencia de un agente que interacciona en el surco menor, se tienen una disminución de la fluorescencia, mientras que agentes intercalantes suelen incrementarla [40, 41, 43, 44].

Dicroísmo Circular

La espectroscopía de DC es una técnica óptica, que mide la diferencia de absorción de un analito de la luz polarizada hacia la izquierda y la luz polarizada hacia la derecha, que, en conjunto, componen un haz de luz [41]. Estos dos componentes, tienen la misma magnitud, pero al interactuar con un medio ópticamente activo (quiral), su comportamiento con la muestra será diferente y su magnitud cambiará, lo que provocará que el plano de polarización circular se distorsione y genere una elipse. La elipse formada, está constituida por un eje mayor y un eje menor, tal como se muestra en la **Figura 11**. El eje mayor, forma un ángulo con la tangente a los dos ejes, llamado elipticidad, parámetro asociado a la diferencia de absorción de la luz polarizada hacia la derecha y hacia la izquierda que nos dará la señal en DC. Los espectros de DC se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) [43,45].



Figura 11. Representación gráfica de la definición de elipticidad.

La instrumentación de DC, presentada en la **Figura 12**, está constituida por un haz de luz no polarizado, que posteriormente se hace pasar por un monocromador para

polarizarlo linealmente y finalmente por un polarizador circular, de donde saldrán los dos componentes polarizados de la luz (izquierdo y derecho) que interactuarán con la muestra ópticamente activa, para pasar finalmente por el detector [46].

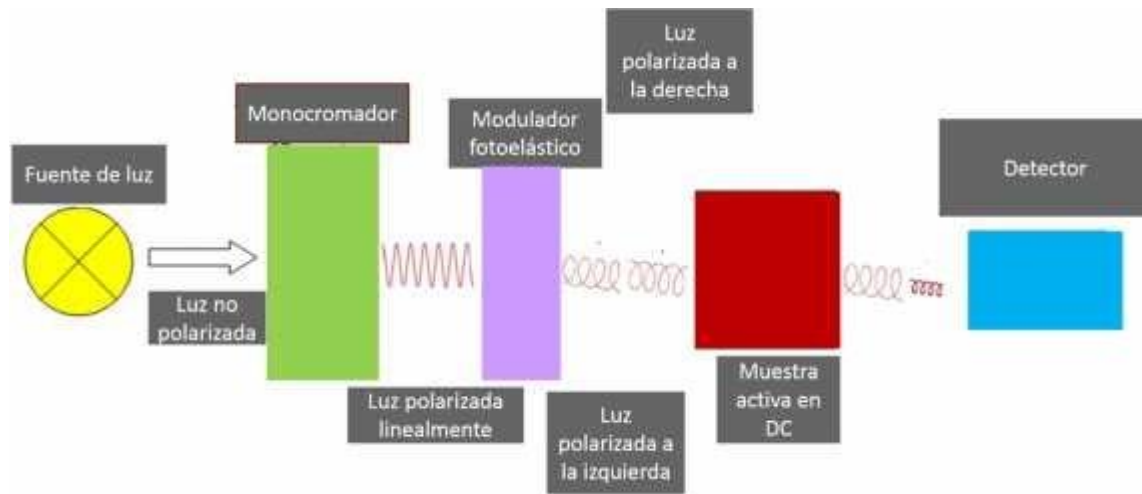


Figura 12. Instrumentación del equipo de DC.

El DC es una técnica muy sensible, que requiere de cantidades de muestra relativamente pequeñas y es utilizada para detectar cualquier cambio en la estructura secundaria del ADN y el modo de unión de moléculas al mismo [24]. Como se mencionó, para que una molécula sea activa mediante esta técnica, deben presentar quiralidad, generalmente, las moléculas que se enlazan al ADN, no la presentan y como tales, son ópticamente inactivas, pero al interactuar con la doble hélice del ADN pueden adquirir una señal en dicroísmo circular [45,46], por lo que se pueden obtener espectros de DC inducido [46].

En los espectros de DC se presentan dos bandas asociadas a la forma B del ADN, una positiva en 275 nm y una negativa en 245 nm, que se atribuyen al apilamiento de los pares de bases del ADN y a la helicidad del mismo, concepto que hace referencia a la torsión de la doble hélice del ADN. [46]

El cambio en la intensidad de las bandas o el desplazamiento de estas, aporta información acerca de la forma de interacción del fármaco con el ADN y de los cambios conformacionales del mismo [48]. Se ha observado que agentes que interactúan en el surco menor del ADN, suelen aumentar considerablemente la intensidad de la banda de 275 nm, asociada al apilamiento de los pares de bases del ADN, mientras que la banda de 245 nm asociada a la helicidad, disminuye su intensidad [49, 50]. Esta disminución es provocada por el rompimiento local del apilamiento de las bases de la doble hélice por la unión del fármaco [49]. En el caso de agentes intercalantes, la intensidad de ambas bandas presenta un efecto hipercrómico; cambios que se asocian a un desenrollamiento del ADN y, por lo tanto, una disminución en el giro helicoidal por acción de la molécula [49, 50].

Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica se utiliza principalmente en compuestos a base de metales con distintos estados de oxidación, que pueden sufrir reacciones redox.

En general, el cambio en el potencial máximo es útil para decidir el modo de interacción. En caso de unión covalente se produce un cambio en el número de picos y en el caso de interacción no covalente, el número de picos permanece sin cambios y el potencial máximo se desplaza. En una unión de tipo intercalante, el potencial redox normalmente aumenta debido a la inserción de moléculas en el ADN por lo que se vuelve difícil la transferencia de electrones entre el electrodo y el fármaco, en consecuencia, el potencial aumenta. En caso de interacciones electrostáticas con el ADN al tener especies ricas en electrones proporciona una carga negativa al fármaco y ocasiona que el potencial redox disminuya [51].

Electroforesis

La electroforesis en gel de agarosa ha demostrado ser una forma eficiente y efectiva de separar los ácidos nucleicos, además, es de utilidad para monitorear la degradación del ADN, por la presencia de compuestos externos [52].

El principio básico de la electroforesis consiste en la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de material poroso, en el cual, por acción de un campo eléctrico, las moléculas serán separadas de acuerdo con su tamaño y carga. La separación de la muestra en moléculas más pequeñas se visualiza gracias a la tinción con BrET. Adicionalmente se puede conocer la concentración de ADN presente en cualquiera de las bandas en el gel debido a que el BrET se intercala al ADN de una manera dependiente de la concentración [53].

Algunos estudios emplean ADN plasmídico, para el estudio de su degradación en presencia de fármacos. Un plásmido es una molécula circular de ADN de doble cadena que se encuentra superenrollada debido a la acción de la enzima girasa que la compacta hasta que el ADN no puede sufrir más giros de superenrollamiento. Cuando el plásmido superenrollado se une al fármaco este se “relaja” hasta llegar a la forma circular. Si se produce el corte en las dos hebras del ADN puede llegarse a la forma lineal del mismo [54].

Este superenrollamiento debido a su conformación compacta puede moverse a través del gel más rápido, siendo la forma circular la que viaja con mayor lentitud [52]. Una disminución en la forma superenrollada que conduzca al aumento de la forma circular indica la presencia de una interacción de tipo intercalante entre el ADN y las moléculas [55]. En la **Figura 13**, se muestra el superenrollamiento de un plásmido.

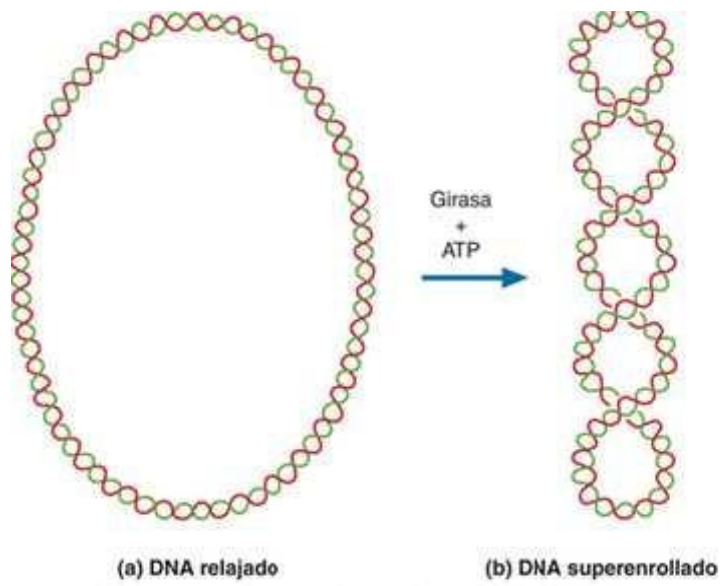


Figura 13. Plásmido en su forma a) circular y b) superenrollada [56].

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. Compuestos de cobre con actividad antitumoral

Algunos de los fármacos que se han diseñado para reemplazar al cisplatino, tienen en su estructura átomos metálicos que podría conducirlos a disminuir su toxicidad por el hecho de tener presentes elementos en su estructura que naturalmente se encuentran en el cuerpo humano (metales esenciales) [57].

Entre los compuestos que no son de platino, los complejos de cobre(II) son atractivos como agentes anticancerígenos, ya que el cobre, al ser un elemento esencial, puede ser menos tóxico para las células sanas que los compuestos de platino [58].

El cobre es un elemento esencial, este se encuentra en el cerebro, riñón, corazón e hígado del cuerpo humano [59]; es importante para la función de varias enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo energético, la respiración y la síntesis de ADN; en particular de la citocromo oxidasa y la superóxido dismutasa (SOD) [60]. Las principales funciones biológicas del cobre implican reacciones redox [61], como cofactor catalítico en la química redox de la mitocondria [62], respiración celular [63] en la absorción de hierro [64] y en la eliminación de radicales libres [65].

2.2. Casiopeínas®

En la búsqueda de una alternativa más efectiva y menos tóxica que los quimioterapéuticos actuales, en el grupo de trabajo se han desarrollado una serie de compuestos de coordinación denominados Casiopeínas®, los cuales son quelatos mixtos de cobre(II), cuya fórmula general es $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$ [49], donde N-N corresponde a bipyridinas o fenantrolinas sustituidas (ligantes primarios); N-O corresponde a aminoacidatos o péptidos, y O-O corresponde a acetilacetonato o salicilaldehidato (ligantes secundarios) [66,67,68].

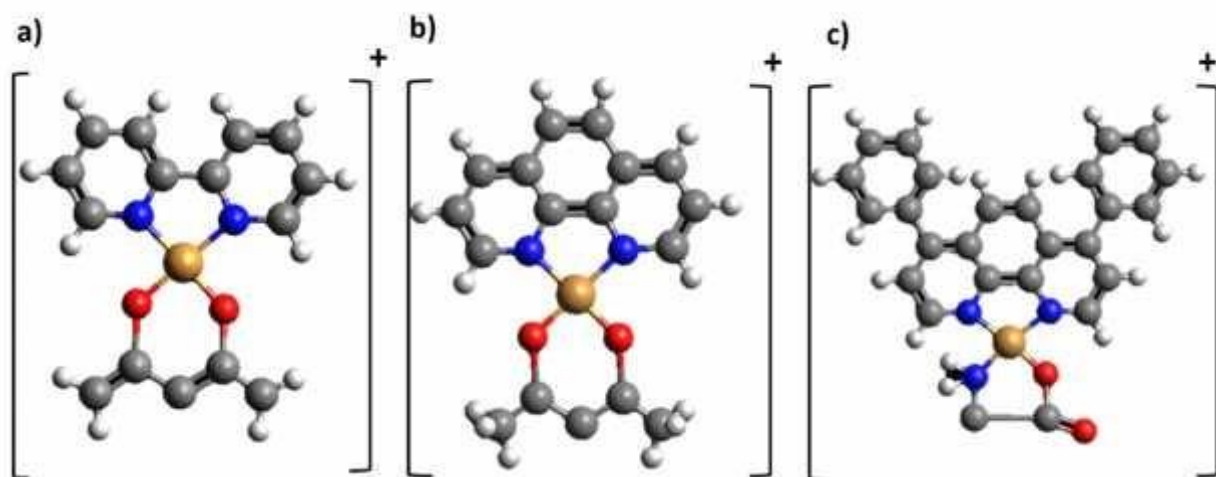


Figura 14. Estructuras generales de las familias de las Casiopeínas®. a) $\text{Cu}[2,2'$ -bipiridina)(acetilacetonato)] NO_3 , b) $\text{Cu}[(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetonato})]\text{NO}_3$ y c) $\text{Cu}[(4,7\text{-difenil-}1,10\text{-fenantrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$.

En la actualidad, se han sintetizado más de 100 Casiopeínas®, las cuales se pueden agrupar en subfamilias tal como se muestra en la **Tabla 1** [67].

Tabla 1. Resumen de las subfamilias de las Casiopeínas® con su fórmula general [67].

Subfamilia y clave		Fórmula general
I	CasI-(N-O)	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
II	CasII(N-O)	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
III	CasIII-Xa o xa	[Cu(N-N)(acac)]NO ₃
	CasIII-Xs o xs	[Cu(N-N)(salal)]NO ₃
IV	CasIV-(N-O)	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(N-O)]NO ₃
V	CasV-(N-O)	[Cu(5-R-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
VI	CasVI-(N-O)	[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
VII	CasVII-(N-O)	[Cu(1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
VIII	CasVIII-(N-O)	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
IX	CasIX-(N-O)	[Cu(2,2'-bipiridina)(N-O)]NO ₃

N-O: α-aminoacidoato; acac, **a**: acetilacetato, salal, **s**: salicilaldehidato; N-N: diimina sustituida, donde x = letra minúscula, bipiridina o X = letra mayúscula, fenantrolina. La molécula de agua coordinada ha sido eliminada de las fórmulas por claridad.

La caracterización y pruebas de estabilidad se han completado, así como los estudios preclínicos tales como la actividad biológica de las Casiopeínas®, mediante la determinación de concentraciones inhibitorias medias (IC₅₀) en líneas celulares tumorales [69], así como la evaluación *in vivo* para la determinación de la DL₅₀, la eficacia como antitumoral en ratas y los estudios cuantitativos de correlación estructura actividad (QSAR) [69, 70, 71, 72]. En estos estudios, se encontró que, presentan actividad genotóxica [73] citotóxica [74] y antitumoral [73,74]; además

que, aquellas Casiopeínas[®] que tienen como ligante primario la fenantrolina, presentan mayor actividad biológica que los que tienen como ligante primario bipyridina y se propone que, los tres anillos aromáticos de ese ligante permiten una mayor afinidad por el ADN. El ligante secundario, tiene una menor influencia en la actividad biológica cuando se cambia de acetilacetato a glicinato [74].

Una vez que se tuvo evidencia de que las Casiopeínas[®] presentan actividad antineoplásica en sistemas biológicos, ahora es necesario conocer los mecanismos por los cuales, los compuestos llevan a cabo esta función.

2.2.1. Mecanismo de acción de las Casiopeínas[®]

Las Casiopeínas[®] han sido estudiadas por diversas técnicas con el fin de elucidar su mecanismo de acción en el organismo humano. Hay evidencia que sugiere que estos compuestos son capaces de inhibir la proliferación celular e inducir a la muerte de la célula por apoptosis, además se observó que en presencia de la CasII-gly, en la línea tumoral HeLa, los procesos de crecimiento celular se ven apagados mientras que aquellos de muerte celular se encienden [75]. También se ha determinado que pueden conducir a la autofagia [76,77]. Se propone que estos compuestos tienen dos vías de acción principales, los cuales incluyen a la mitocondria [69] o al núcleo [78,79]. En diversos estudios se ha encontrado que hay generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), daño mitocondrial y daño al ADN en las células tumorales, a través de una interacción directa con las Casiopeínas[®] [80,81].

En los experimentos encaminados a obtener la IC₅₀ de diversas líneas cancerosas, se observó que algunos compuestos de la familia de las Casiopeínas[®], son capaces de consumir glutatión como fuente de electrones para catalizar reacciones de tipo Fenton, causando una sobreproducción de ROS y conduciendo por lo tanto a la disfunción mitocondrial y la muerte celular [81, 82].

Los mecanismos antes mencionados pueden jugar de manera aislada o cooperativamente un rol importante en la acción de estos compuestos.

2.2.2. Casiopeínas[®] y su interacción con ADN

Con respecto a la interacción de esta familia de compuestos con el ADN, el diseño de las Casiopeínas[®] consideró incluir ligantes bidentados aromáticos que tienen alta afinidad por el cobre(II) y que a su vez les permiten asociarse con el ADN. Mediante estudios a través de diferentes técnicas han permitido aproximarse cada vez más a la elucidación de las interacciones entre las Casiopeínas[®] y el ADN [83, 84, 85, 86, 87, 88].

Por ejemplo en experimentos de electroforesis, se ha observado que, las Casiopeínas[®] son capaces de provocar una escisión en el ADN, hecho que fue confirmado por microscopía de fuerza atómica al encontrar fragmentos de ADN después del tratamiento con los compuestos [84,85]. Por medio de dicroísmo circular se pudo mostrar que existe un cambio de la isoforma B a la Z del ADN en presencia de Casiopeínas[®] Cas-IIgly, CasIII-ia y CasIII-Ea empleando el plásmido pBSK, además de que se detectó la presencia de una banda en el espectro en un rango de 300-350 nm que se atribuyó a la formación de un aducto entre el ADN y estas Casiopeínas[®] [84].

Por su parte, a través de estudios teóricos (modelado molecular) se encontró que algunos de los compuestos, logran intercalarse por la parte aromática de su estructura [86]. Se propone además que hay una interacción en el surco menor y una apertura de hebras dependiendo de la estructura de las Casiopeínas[®] [86,87]. De este estudio se determinó que la estabilidad de la interacción de las Casiopeínas[®] con las bases del ADN tienen el siguiente orden: Citosina > Guanina > Adenina ≈ Timina [86].

Estos estudios han permitido proponer que las Casiopeínas[®] pueden interactuar con el ADN, sin embargo, se requiere saber qué tipo de unión se tiene entre la doble hélice y los compuestos. Hasta el momento se han hecho estudios teóricos con dinámica molecular [86,87, 88] y experimentales *in vitro* como microscopía de fuerza atómica, electroforesis y espectroscopía UV-visible con este propósito [83, 84, 85].

A continuación, se resumen los hallazgos más significativos de las técnicas antes mencionadas. Galindo y colaboradores mediante un estudio de dinámica molecular, clasificaron en A, B, C, D y E los diferentes tipos de interacción (**Figura 15**) entre el ADN y las Casiopeínas®.

Interacción de tipo A: Las Casiopeínas® se desprenden desde el surco menor y recorren la doble hélice del ADN hasta llegar a uno de los bordes de la cadena donde se apilan con los pares de bases terminales del ADN.

Interacción de tipo B: Las Casiopeínas® se unen al surco menor.

Interacción de tipo C: Se genera una eversión de pares de bases seguido de una apertura hacia el surco mayor y finaliza en la intercalación de las Casiopeínas®.

Interacción de tipo D: Unión de las Casiopeínas® al surco menor y apilamiento de una de las bases terminales con el compuesto.

Interacción de tipo E: intercalación cerca de los nucleótidos finales del fragmento de la doble hélice del ADN [78].

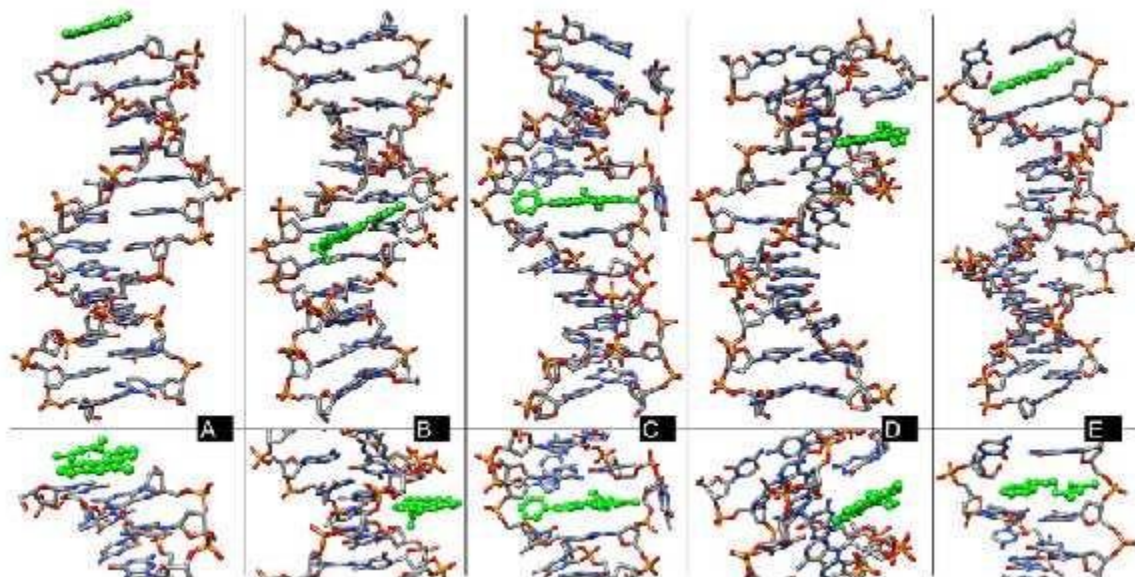


Figura 15. Tipos de interacción entre las Casiopeínas® y el ADN, mediante dinámica molecular [86].

Cabe señalar que biológicamente las interacciones **A**, **D** y **E**, no serían posibles debido a que no se tienen pares de bases terminales en el ADN.

Al evaluar experimentalmente por electroforesis y UV-vis la interacción y la integridad del ADN al exponerlo a las Casiopeínas[®], se encontró que los ligantes unidos a los compuestos de cobre(II) tienen una influencia importante en el mecanismo y la intensidad de la interacción entre el ADN [83]. De manera general, se encontró que las Casiopeínas[®] con bipyridinas y fenantrolinas como ligantes primarios y con sustituyentes como: -H, -Cl, -NO₂, acetilacetato o glicinato como ligantes secundarios, se propone que interaccionan en el surco menor, mientras que, las Casiopeínas[®] con fenantrolinas metiladas o dimetiladas y con glicinato como ligante secundario, se propone que interactúan por medio de una intercalación con el ADN. Además, los estudios de electroforesis muestran que hay ruptura del ADN superenrollado a ADN lineal y el desdoblamiento de ADN superenrollado a ADN circular [83].

Capítulo 3

Justificación

Las Casiopeínas[®], han demostrado ser una buena alternativa ante los antineoplásicos actuales, debido a la actividad biológica que presentan y además por la interacción directa que tienen con el ADN, lo que podría impedir la multiplicación de células cancerosas [84, 89, 90 ,91], sin embargo, es importante conocer el mecanismo de acción de estos compuestos a nivel biológico y molecular, para esto se han realizado estudios de dinámica molecular, de electroforesis y UV-vis, con la finalidad de establecer la interacción de las Casiopeínas[®] con el ADN, sin embargo, los resultados no han sido concluyentes. En este trabajo, se hará uso de la técnica de DC, en un estudio *in vitro*, la cual se espera que aporte información acerca del modo de unión de los compuestos con la doble hélice y nos permita distinguir o apoyar algunos de los mecanismos de interacción propuestos en los estudios teóricos y experimentales realizados hasta el momento.

Capítulo 4

Hipótesis

Al exponer ADN plásmidico con las Casiopeínas[®], estas promoverán un cambio conformacional en él que será posible seguir por DC y permitirá proponer cual es el modo de interacción de cada compuesto con ADN plasmídico al diferenciar a los agentes alquilantes de aquellos que se acomodan en el surco menor o se intercalan.

Capítulo 5

Objetivos

Objetivo general:

Establecer el modo de unión molecular de 14 Casiopeínas® con ADN plasmídico (pBR322) por medio de la técnica de dicroísmo circular.

Objetivos Particulares:

- Establecer las condiciones óptimas de trabajo y determinar las interacciones del plásmido pBR322 con los controles positivos BrET, bleomicina y cisplatino por medio de la obtención de sus espectros de DC.
- Evaluar la interacción de 14 Casiopeínas® con el plásmido PBR322, mediante dicroísmo circular, a diferentes tiempos de incubación.
- Proponer los posibles los modos de unión molecular de los compuestos con el plásmido y clasificarlos de acuerdo con el efecto observado en DC.
- Comparar los resultados de DC, con los resultados ya reportados (U.V. visible, dinámica molecular, fluorescencia y electroforesis).

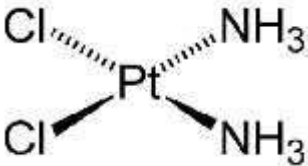
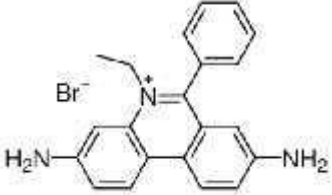
Capítulo 6

Material y métodos

Para el estudio de la interacción de los compuestos con ADN, se trabajó con plásmido pBR322, proveniente de *Escherichia coli* RRI (*E. coli*, Sigma-Aldrich), cuyo peso molecular es de 2.9×10^6 Da, y contiene 4,363 pares de bases en su secuencia.

Como controles positivos, se utilizaron fármacos o compuestos cuya interacción con el ADN es conocida y que son de utilidad para clasificar el comportamiento de compuestos cuya diana molecular también es el ADN. En la **Tabla 2**, se muestran los controles positivos, así como su mecanismo de acción con el ADN y su estructura.

Tabla 2. Controles positivos utilizados en el análisis por DC.

	Mecanismo de acción con el ADN	Estructura
Cisplatino	Agente que se coordina por medio del platino al ADN (aducto) y produce enlaces entrecruzados o sólo en la misma hebra [31].	
Bromuro de etidio (BrET)	Agente intercalante [92].	
Bleomicina	Puede actuar como agente intercalante o unirse al surco menor [93].	

Las 14 Casiopeínas[®] a evaluar, fueron previamente sintetizadas y caracterizadas mediante análisis elemental (AE), infrarrojo (IR) y UV-visible (UV) por Bravo-Gómez y Figueroa de Paz, de acuerdo con los procedimientos patentados¹ [66, 67, 68].

Los compuestos se dividieron en dos grupos de acuerdo con el ligante secundario que poseen. El **Grupo 1** se refiere a aquellas Casiopeínas[®] que contienen acetilacetato (**Tabla 3; Figura 16**); mientras que el **Grupo 2**, son Casiopeínas[®] cuyo ligante secundario es glicinato (**Tabla 4, Figura 17**).

Tabla 3. Claves y fórmulas condensadas de las Casiopeínas[®] del **Grupo 1** a evaluar.

Número	Clave del Compuesto	Sustituyentes del ligante primario	Fórmula condensada
1	CasIII-Ba	H	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₆ CuH ₂ O
2	Cas-5a-Ma	5-metil	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₆ CuH ₂ O
3	CasIII-ia	4,4-dimetil	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₅ Cu
4	CasIII-Ea	4,7-dimetil	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₆ CuH ₂ O
5	CasIII-La	5,6-dimetil	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₇ Cu2H ₂ O
6	CasIII-Ma	3,4,7,8-tetrametil	C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₅ CuH ₂ O
7	CasIII-Ha	4,7-difenil	C ₂₉ H ₂₅ N ₃ O ₆ CuH ₂ O
8	CasIII-5a-Cla	5-cloro	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₆ CuClH ₂ O

¹ Más información acerca de los compuestos del **Grupo 1** y del **Grupo 2**, se encuentra en el **Anexo C**.

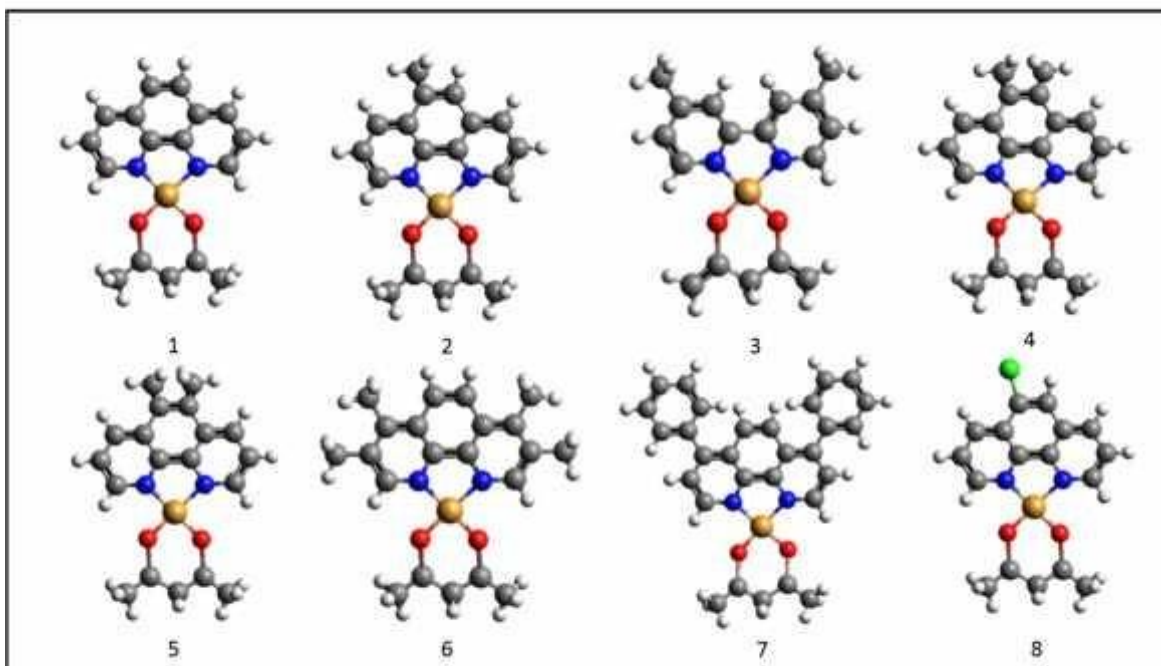


Figura 16. Estructuras de las Casiopeínas® del **Grupo 1**.

Tabla 4. Claves y fórmulas condensadas de las Casiopeínas® del **Grupo 2** a evaluar.

Número	Clave del Compuesto	Sustituyentes del ligante primario	Fórmula condensada
9	Cas-5-Megly	5-metil	$C_{15}H_{16}N_4O_6CuH_2O$
10	CasII-gly	4,7-dimetil	$C_{16}H_{20}N_4O_7Cu_2H_2O$
11	CasVI-gly	5,6-dimetil	$C_{16}H_{18}N_4O_6CuH_2O$
12	CasVIII-gly	3,4,7,8-tetrametil	$C_{16}H_{18}N_4O_6Cu$
13	CasI-gly	4,7-difenil	$C_{26}H_{22}N_4O_6CuH_2O$
14	CasV-NO₂a-gly	5-nitro	$C_{14}H_{13}N_5O_8CuH_2O$

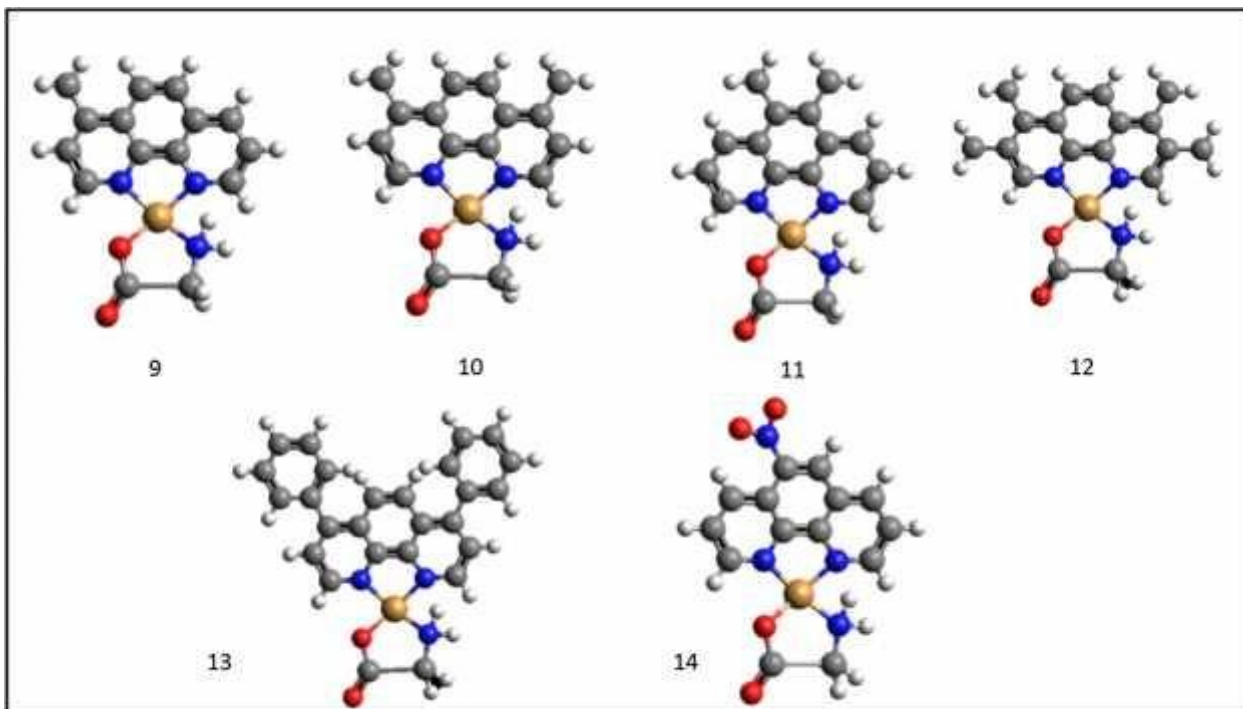


Figura 17. Estructuras de las Casiopeínas® del **Grupo 2.**

Posteriormente, se realizó el análisis espectroscópico por DC, mediante el equipo *Biologic Mos-500* en longitudes de onda entre 205 y 400 nm, con una microcelda de cuarzo de 1 mm.

6.1. Evaluación de la interacción de las Casiopeínas® con ADN plasmídico mediante DC

Para el desarrollo del experimento, primero se suspendió el plásmido en 1 mL de agua estéril y se cuantificó espectroscópicamente considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ reportada por el proveedor. Además, para verificar la pureza de este, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm y se calculó el cociente de ambos valores [94]. Si el cociente es

superior a 1.8 se considera que la muestra de ADN se encuentra libre de proteína [94].

Las disoluciones de los blancos y controles positivos, fueron preparadas en las concentraciones presentadas en la **Tabla 5**, y se incubaron durante 0, 5, 10, 20, 40 y 80 minutos a 37 °C, de acuerdo con el esquema experimental propuesto por Figueroa de Paz, 2017 [83].

Tabla 5. Concentración de las disoluciones de los blancos y controles positivo para el estudio por DC [83].

Control positivo	Concentración plásmido (ng/μL)	Concentración del compuesto (μM)
Plásmido (pBR322)	40	-----
Plásmido/BrET	40	70
Plásmido/Bleomicina	40	70
Plásmido/Cisplatino	40	200
Casiopéina®	-----	70

La evaluación de la interacciones Casiopéinas®- ADN plasmídico, se definió como control el plásmido pBR322 con agua estéril y se verificó si las Casiopéinas® por separado, presentaban señal en DC.

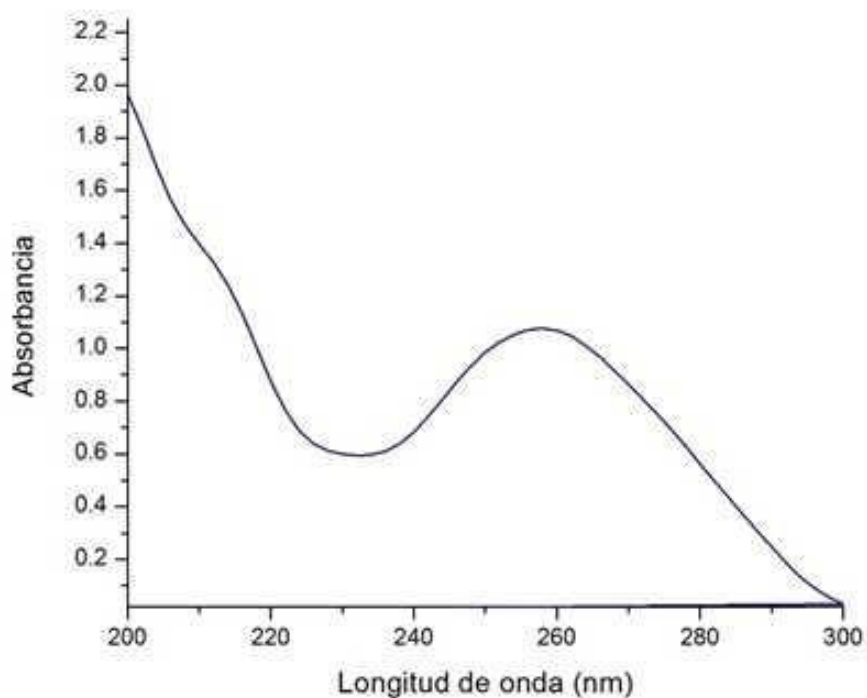
Se combinaron plásmido y Casiopéina®, ambos en concentraciones constantes de 40 ng/mL-70 μM y 40 ng/mL-200 μM en el caso del cisplatino. Las mezclas, se incubaron a 0, 5, 10, 20, 40 y 80 minutos, a una temperatura de 37°C y se obtuvieron sus espectros de DC. Las concentraciones y los tiempos se establecieron

previamente considerando la máxima concentración antes de la degradación del ADN por la presencia de las Casiopeínas® [83].

Capítulo 7

Resultados

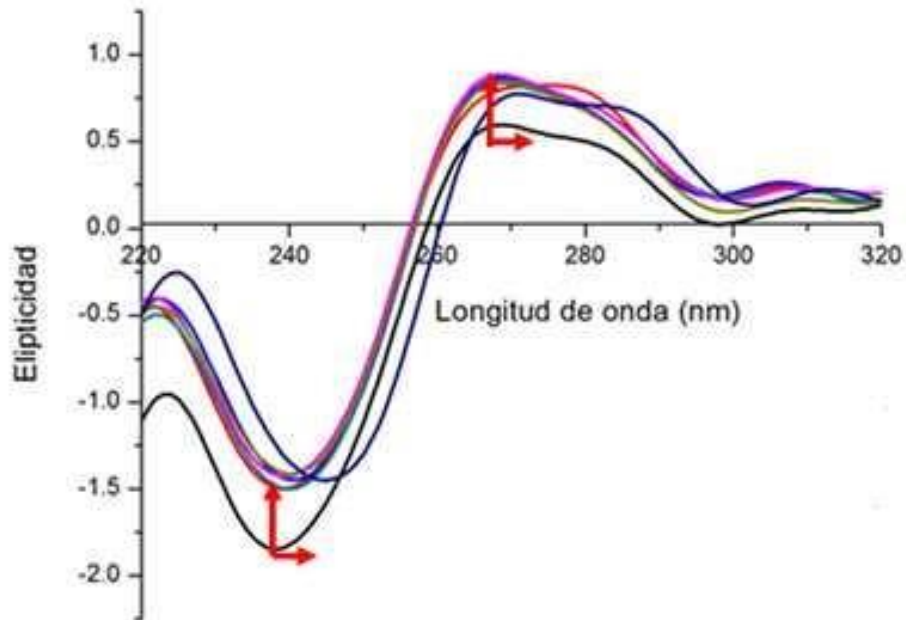
La pureza del plásmido pBR322 se determinó calculando el cociente de la absorbancia resultante a 260 nm: 1.0725 y de la absorbancia a 280 nm: 0.5632, dando como resultado 1,91; esto indica que la muestra de ADN plasmídico se encontraba libre de proteínas [94]. En la **Gráfica 1** se muestra el espectro de UV-vis obtenido y se puede observar sólo una banda en 260 nm, la cual es debida al ADN.



Gráfica 1. [—] Espectro de UV-vis de **ADN plasmídico pBR322**.

7.1. Espectro de DC del ADN

En la **Gráfica 2** se muestran los espectros de DC para el plásmido PBR322, registrados durante 0,5, 10, 20, 40, 80 y 120 min, en donde se aprecian las dos bandas características del mismo, debido a la helicidad (240 nm) y por el apilamiento de las bases en (270 nm); se aprecia que no hay cambio del ADN a cualquiera de sus otras dos formas (A o Z), evidenciada por Kypr (2009) [95]. Al aumentar el tiempo de incubación, las dos bandas, no tienen cambios considerables que pudieran sugerir la degradación del plásmido por efecto de la temperatura; aunque al minuto 120, se observa el desplazamiento batocrómicamente de las dos bandas, efecto que no fue observado en el resto de los tiempos y que podría sugerir un cambio posiblemente estructural de la doble hélice o la relajación del plásmido aún sin la presencia de un compuesto, por lo que para no afectar los resultados con este efecto, el análisis de los controles positivo-ADN y Casiopeínas[®]-ADN, sólo se realizaron hasta el minuto 80.



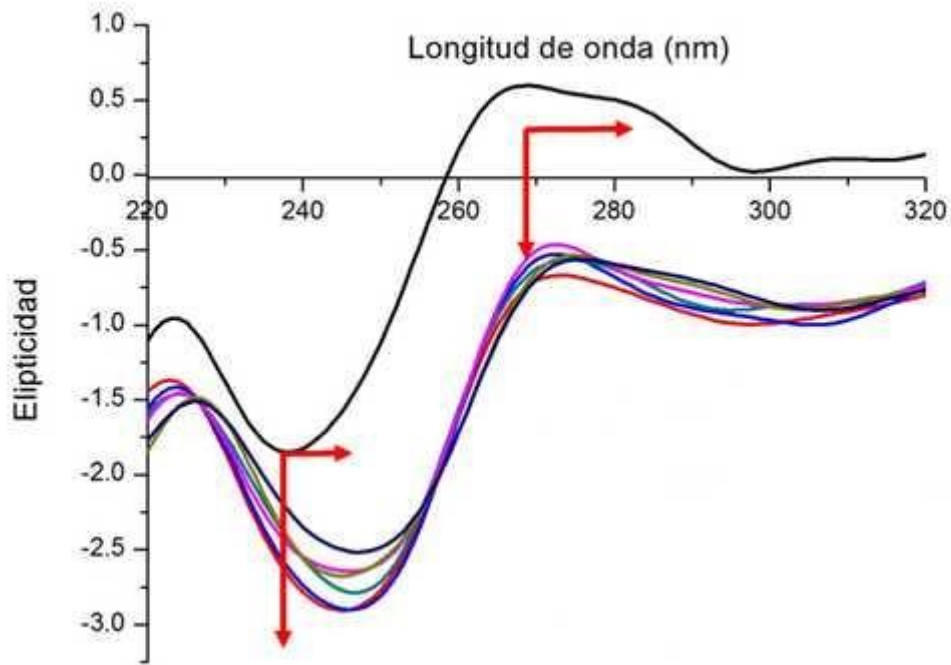
Gráfica 2. Espectro de DC del **ADN plasmídico pBR322** (40 ng/μL) incubado a diferentes tiempos:

0 — 5 — 10 — 20 — 40 — 80 — 120 minutos

Se obtuvieron los espectros de DC de los controles positivos bromuro de etidio y bleomicina en concentración de 70 μM con 40 ng/μL de plásmido; para el caso del cisplatino, se utilizó una concentración de 200 μM del compuesto con 40 ng/μL del plásmido. Estos compuestos han sido ampliamente estudiados y su interacción con el ADN, es plenamente conocida.

7.2. Interacción entre ADN plasmídico y cisplatino

En la **Gráfica 3** se muestra el espectro de DC obtenido de la interacción del plásmido con el **cisplatino**. Para el ADN plasmídico, se observan las dos bandas características en DC, a 240 y 270 nm, sin embargo, al adicionar el cisplatino, las dos bandas presentan un efecto hipocrómico acompañado de un desplazamiento batocrómico.

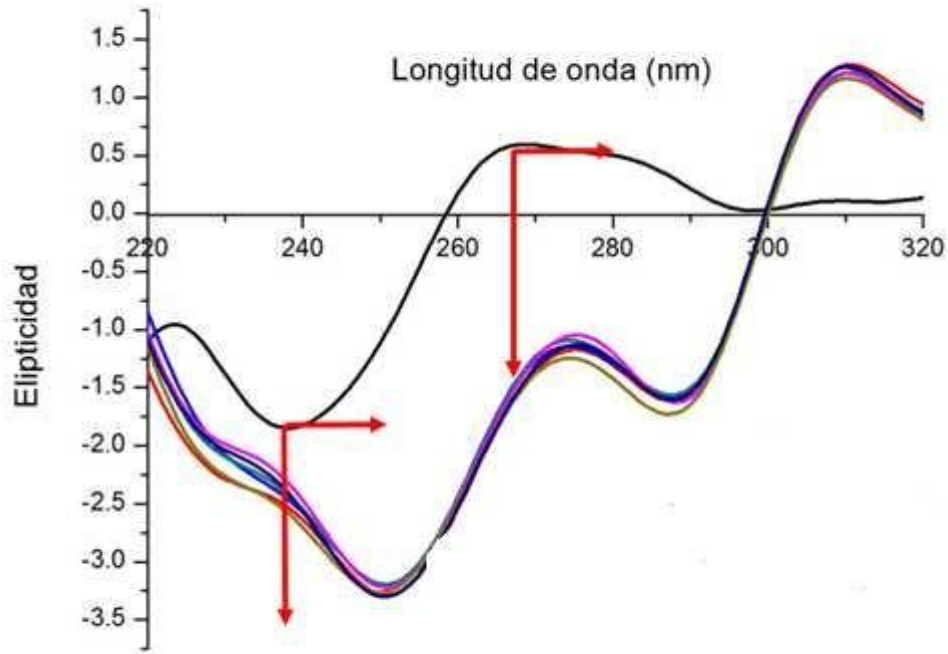


Gráfica 3. Espectro de DC del **cisplatino** (200 μM) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 $\text{ng}/\mu\text{L}$) donde:

ADN plasmídico — 0 —, 5 —, 10 —, 20 —, 40 —, 80 — minutos

7.3. Interacción entre ADN plasmídico y BrET

El bromuro de etidio es considerado un agente intercalante [87], por lo que se eligió en este estudio como control positivo. En la **Gráfica 4** se presenta el espectro de DC obtenido de la interacción del plásmido con **BrET**, se observa un desplazamiento batocrómico con un efecto hipocrómico en las dos bandas con respecto al control de ADN plasmídico, este efecto se mantiene constante con respecto al tiempo de incubación.

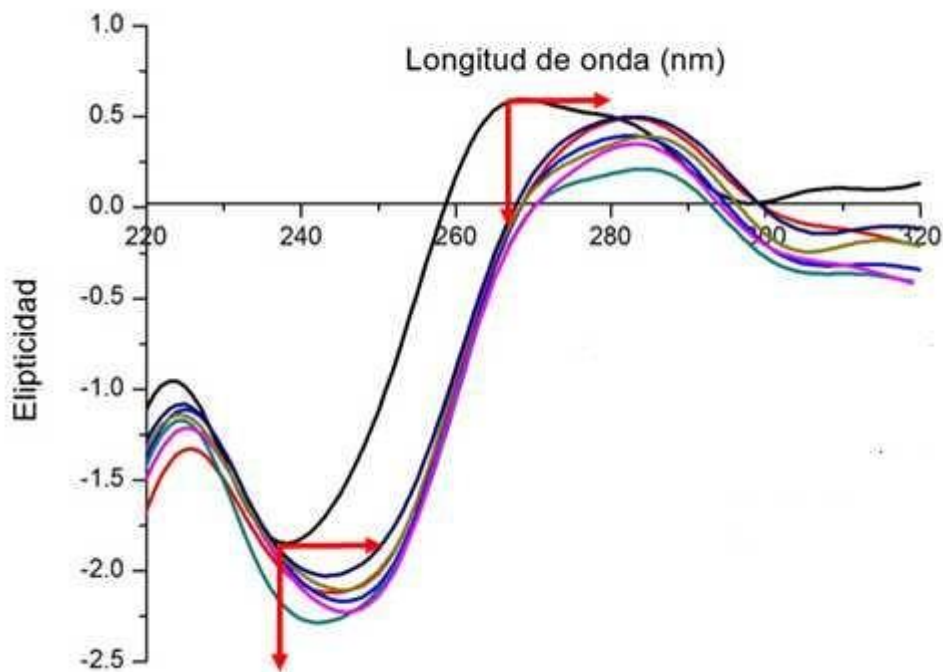


Gráfica 4. Espectro de DC del **BrET** (70 μM) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 $\text{ng}/\mu\text{L}$) donde:

ADN plasmídico — 0 (—) 5 (—) 10 (—) 20 (—) 40 (—) 80 minutos

7.4. Interacción entre ADN y bleomicina

La interacción de la bleomicina con el ADN puede darse de forma intercalante o en el surco menor [88]. En la **Gráfica 5** se muestra el espectro de DC obtenido de la interacción del plásmido con **bleomicina**. Una vez más se aprecian las dos bandas desplazadas batocrómicamente e hipocrómicamente con respecto al control. Se observa que su comportamiento es parecido al del cisplatino, aunque en este caso el desplazamiento de las bandas es menor.



Gráfica 5. Espectro de DC de la **bleomicina** (70 µM) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 ng/µL) donde:

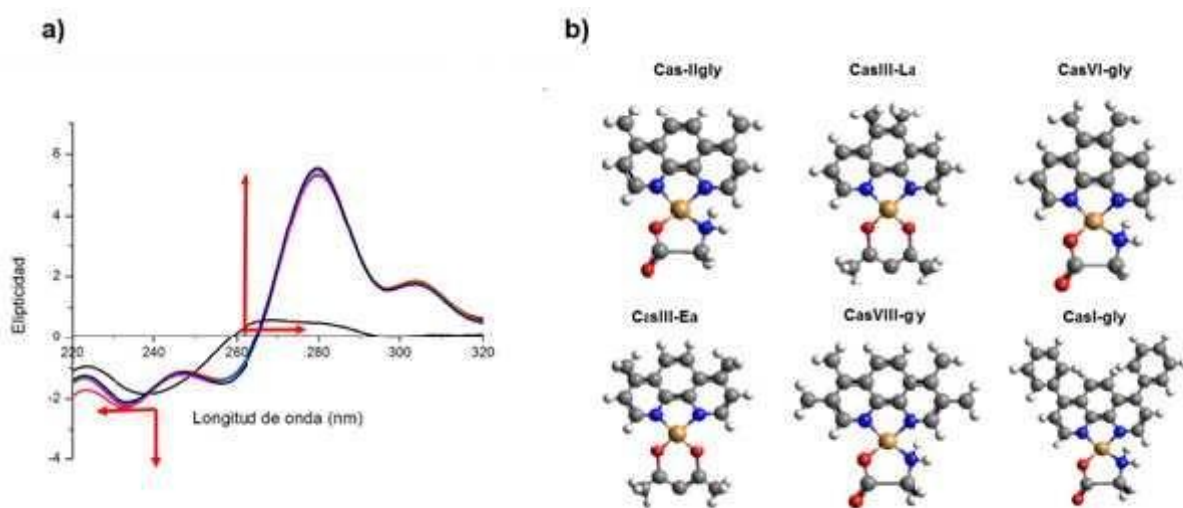
ADN plasmídico — 0 —, 5 —, 10 —, 20 —, 40 —, 80 — minutos

7.5. Interacción entre ADN plasmídico y Casiopeínas®

Se obtuvieron los espectros entre el ADN plasmídico pBR322 y 14 Casiopeínas® (**Figura 16 y 17**), durante diferentes tiempos de incubación (0, 5, 10, 20, 40 y 80 minutos) y empleando una concentración constante de plásmido y de compuesto.

De igual manera que con controles positivo, se siguió al ADN plasmídico, observando los cambios en las bandas debidas a la helicidad (240 nm) y al apilamiento de las bases (270 nm) del mismo; el efecto sobre estas dos bandas ayudó a determinar el o los tipos de unión de los compuestos a la doble hélice.

El espectro de DC que se presenta en la **Gráfica 6** corresponde a la **CasII-gly**, donde la banda de 240 nm presenta un desplazamiento hipsocrómico y ligeramente hipocrómico, mientras que la banda de 270 nm, un desplazamiento batocrómico acompañado de un efecto hipercrómico; se tiene, además, la aparición de una nueva banda a 260 nm. Este comportamiento se observó de manera similar a las Casiopeínas® **CasIII-Ea**, **CasIII-La**, **CasVI-gly**, **CasVIII-gly**, **CasI-gly**, **CasV-NO₂a-gly** (Gráficas 13, 14, 16, 17, 18, 19 del Anexo A).

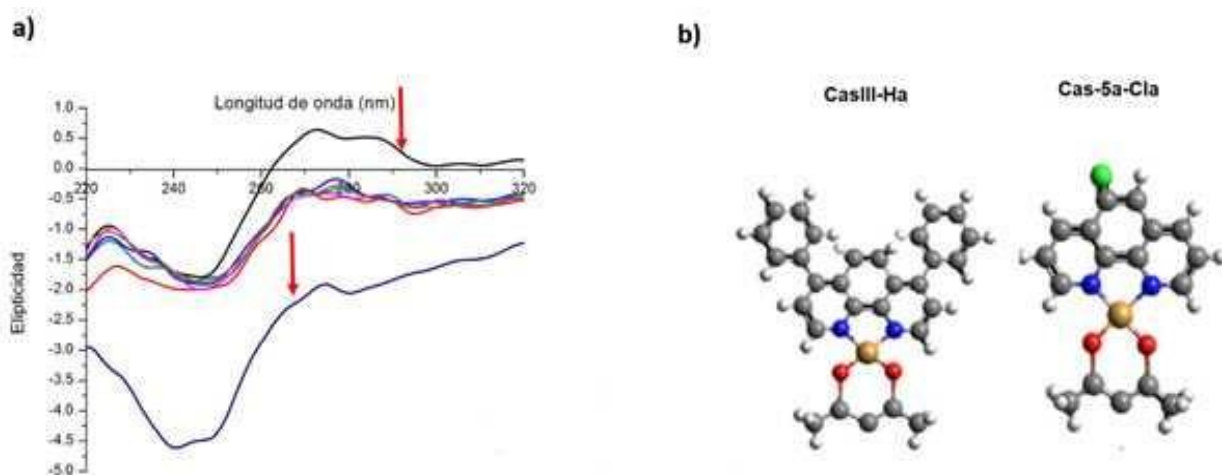


Gráfica 6. a) Espectro de DC de la **Cas-IIgly** (70 μM) incubado a diferentes tiempos con plásmido pBR322 (40 ng/μL) donde:

ADN plasmídico —, 0 —, 5 —, 10 —, 20 —, 40 —, 80 — minutos

b) Casiopeínas® que presentan efectos similares en DC a la **Cas-IIgly**.

En la **Gráfica 7** se presenta el espectro de DC para la **Cas-5a-Cla**, para las dos bandas se presenta un efecto hipocrómico sin desplazamiento y se observa que el minuto 80, se encuentra desplazado hacia valores menores de elipticidad, que el resto de los tiempos de incubación.

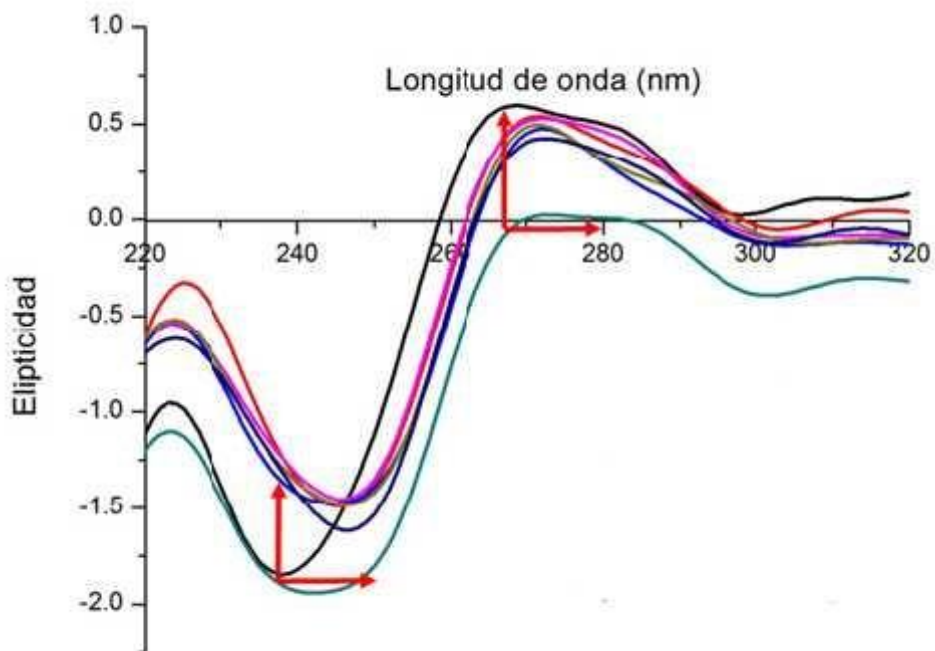


Gráfica 7. a) Espectro de DC de la **Cas-5a-Cla** (70 μ M) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 ng/ μ L) donde:

ADN plasmídico ———, 0 (—), 5 (—), 10 (—), 20 (—), 40 (—), 60 (—), 80 (—) minutos

b) Casiopeína[®] que presentó efectos similares en DC a la **Cas-5a-Cla**.

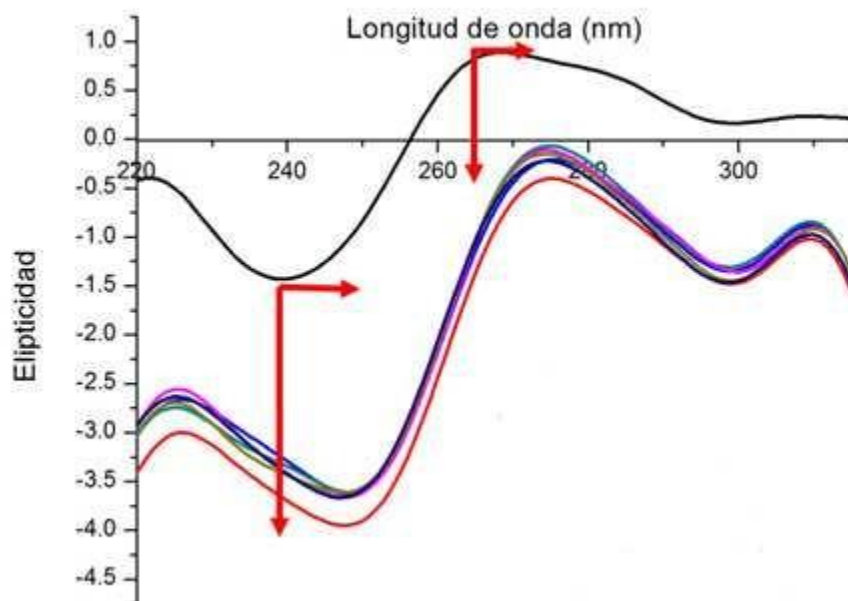
Por otro lado, en la **Gráfica 8**, se muestra el espectro de DC de la **CasIII-ia**. Se aprecia que la banda de 240 nm tiene un desplazamiento batocrómico, acompañado de un efecto hiperocrómico, excepto para el espectro al minuto 10, donde se observa un efecto hipocrómico; en la banda de 270 nm, se tiene un efecto batocrómico e hipocrómico a diferencia del espectro de DC del ADN plasmídico.



Gráfica 8. Espectro de DC de la **CasIII-ia** (70 μM) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 $\text{ng}/\mu\text{L}$) donde:

ADN plasmídico —, 0 —, 5 —, 10 —, 20 —, 40 —, 80 — minutos.

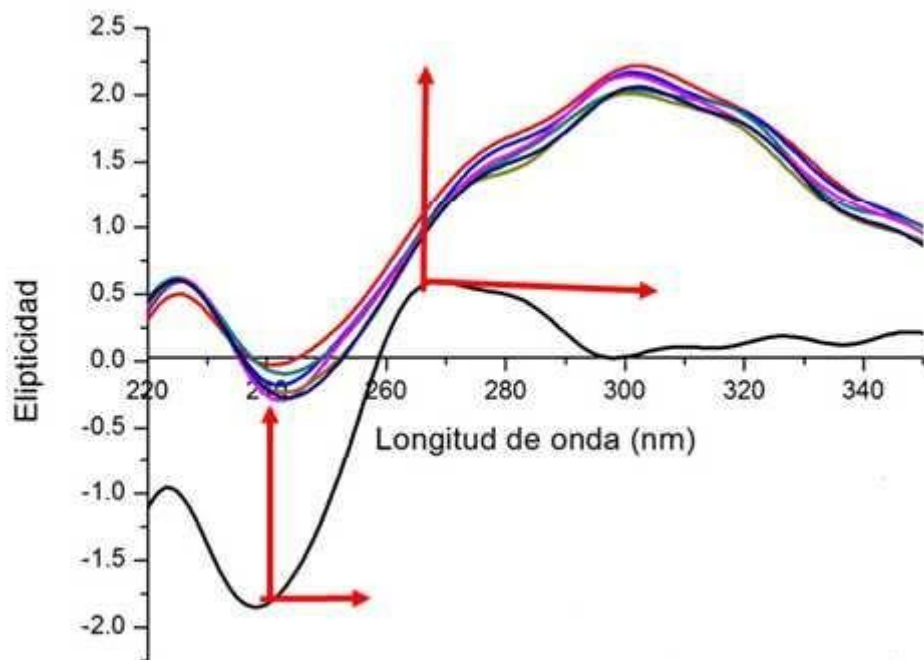
En la **Gráfica 9** se presenta el espectro de DC para la **CasIII-Ba**, el cual consiste en cobre(II) coordinado a 2,2'-bipiridina y acetilacetato. Se observa que las bandas asociadas al ADN plasmídico se encuentran desplazadas batocrómicamente acompañadas de un efecto hipocrómico, con la aparición de una nueva banda a 310 nm, siendo este el único compuesto que presenta este comportamiento.



Gráfica 9. Espectro de DC de la **CasIII-Ba** (70 μ M) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 ng/ μ L) donde:

ADN plasmídico —, 0 —, 5 —, 10 —, 20 —, 40 —, 80 — minutos

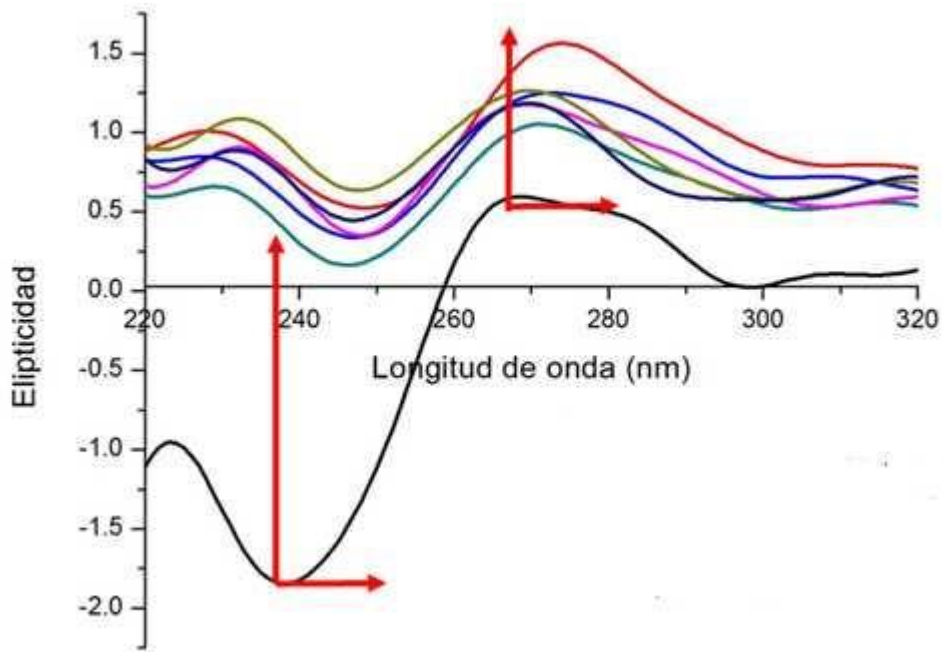
La presencia del tercer anillo central al emplear como ligante principal la fenantrolina con grupos metilo en las posiciones 3,4, 7 y 8 (**CasIII-Ma**, **Gráfica 10**), causa un efecto hiperocrómico y batocrómico de ambas bandas con respecto al ADN plasmídico. Este comportamiento fue único para este compuesto.



Gráfica 10. Espectro de DC de la **CasIII-Ma** (70 μM) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 $\text{ng}/\mu\text{L}$) donde:

ADN plasmídico — 0 — 5 — 10 — 20 — 40 — 80 — minutos

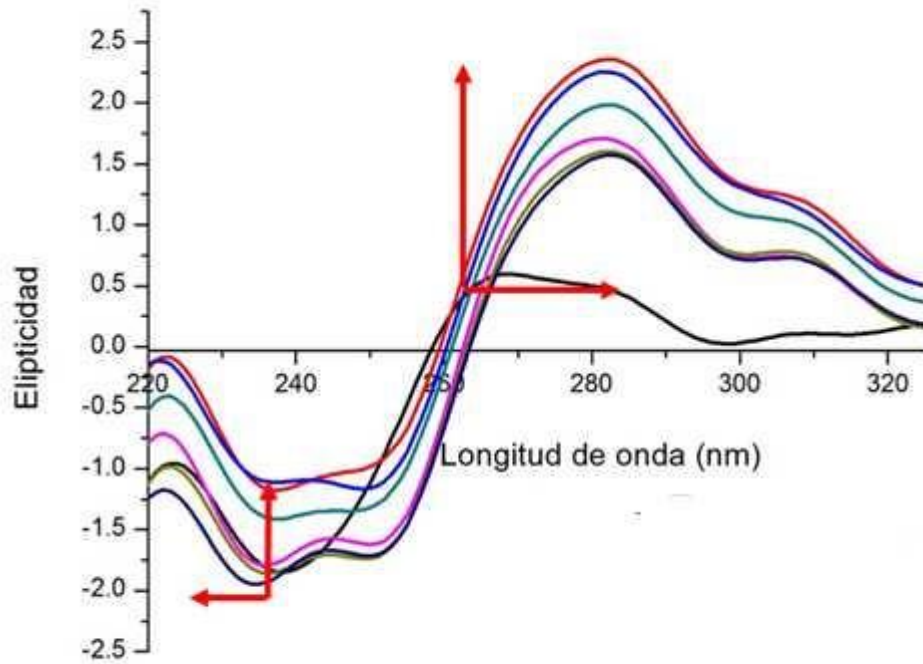
La Casiopeína® **Cas-5a-Ma**, presentó un espectro de DC, diferente al resto de los compuestos que se muestra en la **Gráfica 11** dónde se observa que las dos bandas presentan un efecto hiperocrómico y batocrómico en comparación con el ADN plasmídico y estas no se encuentran muy definidas.



Gráfica 11. Espectro de DC de la **Cas-5a-Ma** ($70 \mu\text{M}$) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** ($40 \text{ ng}/\mu\text{L}$) donde:

ADN plasmídico —, 0 (—), 5 (—), 10 (—), 20 (—), 40 (—), 80 (—) minutos

La **Cas-5-Megly**, también presentó un comportamiento único en comparación de los demás compuestos (**Gráfica 12**). La banda de 240 nm se desplaza hipsocrómicamente y presenta un efecto hipercrómico de 0 a 20 minutos, posteriormente en el minuto 40 y 80 se tiene un efecto hipocrómico. En cuanto a la banda de 270 nm, se observa un efecto batocrómico e hipercrómico con respecto al control, aunque al aumentar el tiempo de incubación el efecto hipercrómico va en descenso. Además, se tiene la aparición de una banda en 250 nm.



Gráfica 12. Espectro de DC de la **Cas-5-Megly** ($70 \mu\text{M}$) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** ($40 \text{ ng}/\mu\text{L}$) donde:

ADN plasmídico (—), 0 (—), 5 (—), 10 (—), 20 (—), 40 (—), 80 (—) minutos.


Control positivo	Elipticidad banda de 240 nm							Tiempo (min)
	0	5	10	20	40	80	120	
ADN	1.819	1.498	1.448	1.501	1.428	1.412	1.451	
Cisplatino	2.905	2.901	2.789	2.644	2.677	2.515		
BrET	3.286	3.198	3.193	3.220	3.262	3.302		
Bleomicina	2.180	2.108	2.284	2.227	2.105	2.027		

Tabla 6. Valores de elipticidad para la banda de 240 nm de los controles positivos evaluados;

 significa que la medición no se realizó a ese tiempo.

Control positivo	Elipticidad banda 270 nm							Tiempo (min)
	0	5	10	20	40	80	120	
ADN	0.596	0.826	0.868	0.838	0.886	0.848	0.776	
Cisplatino	-0.669	-0.528	-0.565	-0.464	-0.534	-0.563		
BrET	1.281	1.260	1.213	1.209	1.164	1.269		
Bleomicina	0.493	0.395	0.212	0.352	0.391	0.499		

Tabla 7. Valores de elipticidad para la banda de 270 nm de los controles positivos evaluados;

 significa que la medición no se realizó a ese tiempo.

Compuesto	Elipticidad banda de 240 nm						Tiempo (min)
	0	5	10	20	40	80	
CasIII-Ba	-4.250	-3.830	-3.798	-3.846	-3.830	-3.716	
Cas-5a-Ma	0.522	0.340	0.163	0.352	0.579	0.447	
CasIII-ia	-1.490	-1.479	0.000	-1.456	-1.485	-1.618	
CasIII-Ea	-3.721	-3.134	-3.264	-3.346	-3.127	-3.481	
CasIII-La	-1.526	-0.759	-0.798	-0.682	-0.802	-0.731	
CasIII-Ma	-0.123	-0.178	-0.093	-0.290	-0.232	-0.271	
CasIII-Ha	-3.759	-3.479	-2.519	-2.444	-2.479	-2.561	
CasIII-5a-Cla	-2.657	-1.913	-1.860	-1.999	-1.868	-4.613	
Cas-5-Megly	-1.250	-1.166	-1.549	-1.793	-1.990	-1.988	
CasII-gly	-3.112	-2.632	-2.495	-2.620	-2.618	-2.563	
CasVI-gly	-1.059	-0.881	-0.896	-0.837	-0.905	-0.918	
CasVIII-gly	-1.886	-1.668	-1.887	-2.046	-2.170	-1.974	
CasI-gly	-1.945	-1.734	-1.885	-1.992	-2.197	-1.986	
CasV-NO ₂ a-gly	-0.981	-1.139	-1.113	-0.976	-0.934	-1.063	

Tabla 8. Valores de Elipticidad para la banda de 240 nm de las Casiopeínas® evaluadas.

Compuesto	Elipticidad banda 270 nm						Tiempo (min)
	0	5	10	20	40	80	
CasIII-Ba	-0.401	-0.210	-0.038	-0.113	-0.150	-0.224	
Cas-5a-Ma	1.564	1.250	1.052	1.177	1.344	1.412	
CasIII-ia	0.540	0.476	0.000	0.528	0.495	0.424	
CasIII-Ea	4.225	4.355	4.365	4.540	4.509	4.664	
CasIII-La	1.076	1.780	1.784	1.710	1.681	1.744	
CasIII-Ma	2.219	2.171	2.038	2.145	2.014	2.062	
CasIII-Ha	-1.119	-1.061	-0.521	-0.470	-0.490	-0.491	
CasIII-5a-Cla	-0.330	-0.170	-0.330	-0.355	-0.224	-1.230	
Cas-5-Megly	2.360	2.254	1.986	1.708	1.604	1.573	
CasII-gly	5.577	5.520	5.373	5.319	5.507	5.506	
CasVI-gly	1.080	1.171	1.162	1.214	1.253	1.308	
CasVIII-gly	5.863	5.855	5.775	5.509	5.731	5.814	
CasI-gly	6.161	6.162	6.127	5.810	6.017	6.109	
CasV-NO ₂ a-gly	0.747	0.502	0.559	0.719	0.717	0.634	

Capítulo 8

Análisis de Resultados

La finalidad de este trabajo fue proponer el posible o posibles modos de unión de catorce Casiopeínas[®] al ADN para complementar los resultados obtenidos con estudios realizados previamente que ayuden a tener una mejor comprensión del efecto que tienen los compuestos con la doble hélice desde el punto de vista de diferentes técnicas experimentales. Para esto, se obtuvieron los espectros de DC de compuestos de los cuales se conoce su interacción con el ADN (controles positivos) y del plásmido pBR322 incubado a diferentes tiempos, a una

Tabla 9. Valores de Elipticidad para la banda de 270 nm de las Casiopeínas[®] evaluadas. concentración constante en presencia de las diferentes Casiopeínas[®].

Para establecer los diversos modos de unión de los compuestos de cobre(II), se evaluó, inicialmente el comportamiento de moléculas ya conocidas y cuyo mecanismo de acción se propone actúa a través de la interacción con el ADN, como lo son el Cisplatino, BrEt y la Bleomicina [31,92,93]. Para estos controles positivos, se observaron los mismos efectos en ambas bandas (hipocrómico y batocrómico), pero cabe señalar que para el BrET estos desplazamientos son mayores, seguido del cisplatino y la bleomicina, la cual presenta un menor desplazamiento de ambas bandas. Además, en el caso del BrET, se tiene la aparición de una nueva banda a 310 nm. Esta variación de los efectos de las bandas del ADN, puede ser el reflejo de qué tanto está afectando a la doble hélice la presencia de estas moléculas, siendo que para un agente intercalante como lo es el BrET, se observa un cambio mayor en los valores de Elipticidad (**Tablas 6 y 7**), lo cual coincide con el hecho de que aquellos compuestos que se intercalan al ADN, suelen deformar en mayor medida la doble hélice a diferencia de los que interaccionan en el surco menor o forman enlaces covalentes [46,84].

El comportamiento en DC de estas moléculas, se procedió a compararlo con lo observado para las Casiopeínas®.

Al evaluar las interacciones Casiopeínas-ADN se encontró que once de los compuestos evaluados, presentan un comportamiento similar al de los controles positivos y tres de ellos se comportan de manera diferente.

Para las Casiopeínas®: **CasIII-La**, **CasIII-Ea**, **CasII-gly**, **CasVI-gly**, **CasVIII-gly** y **CasI-gly** se tiene la disminución considerable de la banda debida a la helicidad del ADN (240 nm), acompañado de un hipercromismo en la banda asociada al apilamiento de las bases (270 nm). Este comportamiento, ha sido relacionado a interacciones en el surco menor, debido a que, al unirse el fármaco a la doble hélice, provoca un rompimiento local del apilamiento de las bases, que se traduce en el aumento considerable de esta banda [50]. También, para estos compuestos, se tiene la aparición de una nueva banda a 260 nm aproximadamente; esta aparición de bandas se ha asociado a cambios conformacionales del ADN [96].

En el caso de la **CasIII-Ha**, se observa que, a partir de los 10 minutos, las dos bandas se desplazan a valores mayores de elipticidad como se muestra en las **Tablas 8 y 9**. Este cambio en la elipticidad en ambas bandas se propone que puede deberse a un proceso de reconocimiento por parte de la molécula hacia al ADN y cuando logra estabilizarse, es cuando los valores de elipticidad permanecen casi constantes. Para la **CasIII-5a-Cla**, se tiene el mismo fenómeno. En ambos casos, los efectos de ambas bandas son similares a los observados para el cisplatino, al presentar un efecto hipocrómico en ambas sin desplazamiento del máximo, por lo que se propone que estas Casiopeínas® pueden encontrarse interaccionando de forma covalente con el ADN, se propone que esta unión covalente, puede estarse dando entre el Cu y los fosfatos del ADN, como lo propusieron Galindo-Murillo y García-Ramos [87,97].

Se propone que la **CasIII-ia** y la **CasV-NO2-a-gly**, interactúen de forma mixta, interacción en surco menor e intercalante con el ADN, por los efectos observados en DC y por su comportamiento similar al de la bleomicina, la cual como se mencionó puede presentar cualquiera de estas dos interacciones [93].

La **CasIII-Ba**, se comporta de manera similar al BrET, dónde ambas bandas se desplazan hipocrómicamente y batocrómicamente, con la aparición de una nueva a 320 nm.

Para las Casiopeínas[®] **CasIII-Ma**, **Cas-5-Megly** y **Cas-5a-Ma**, no se tuvo un comportamiento similar ni al de los controles positivo ni al del resto de la serie de compuestos, por lo que no fue posible asignar un modo de unión para las mismas en este trabajo y se propone que su interacción pueda ser diferente y/o más compleja que las formas de unión evaluadas con los controles positivos seleccionados.

En resumen podemos decir que la mayoría Casiopeínas[®] que presentan efectos que sugieren una interacción en el surco menor, como lo son la **CasIII-La**, **CasIII-Ea**, **CasII-gly**, **CasVI-gly**, **CasVIII-gly** y **CasI-gly**, tienen una doble sustitución en su ligante primario y contienen a la glicina como ligante secundario. Este hecho puede sugerir que el ligante primario al encontrarse sustituido, hace en principio más difícil que la molécula pudiera intercalarse y además, al tener la glicina en su estructura átomos de N y O, pudiera encontrarse formando puentes de hidrógeno con las bases del ADN. Esto es relevante ya que se llega a la misma conclusión en estudios de dinámica molecular, donde los compuestos con glicina tuvieron mayor preferencia hacia el surco menor [87,88].

Por otro lado los compuestos **CasIII-Ha** y **CasIII-5a-Cl**, que presentaron efectos en DC similares a los del cisplatino; se observa que la **CasIII-5a-Cl** contiene un átomo de Cl como sustituyente, mientras que la **CasIII-Ha** tiene a dos fenilos como sustituyentes del ligante primario y ambos el acetilacetato como ligante secundario. Esta interacción pudiera deberse a la atracción entre los grupos fosfato

del ADN y el cobre de las Casiopeínas[®] por efectos de las cargas de ambas especies. El estudio por dinámica molecular de esta propuesta se encuentra en proceso.

La **CasIII-Ba**, fue la única en presentar una interacción de tipo intercalante como la tiene el BrET. En su estructura, no tiene sustituciones en el ligante primario e incluye al acetilacetato como ligante secundario. El no tener ningún grupo sustituyente en la fenatrolina (ligante primario), podría facilitar la inserción, estabilización y apilamiento de los anillos de la fenatrolina con las bases del ADN y confirmar la propuesta de que los sustituyentes pudieran estar impidiendo estéricamente una intercalación. Además, por estudios teóricos, se observó que compuestos con acetilacetato (ligante secundario), prefieren la intercalación al ADN [88].

Al tener una interacción de tipo mixta como lo presentó la **CasIII-ia** y la **CasV-NO2-a-gly**, podría sugerir que las Casiopeínas[®] no tienen un modo de unión único con el ADN, sino que, la interacción observada puede ser la más favorecida energéticamente.

Estos resultado son evidencia de que aunque ambos ligantes están influyendo en el modo de unión que presentan las Casiopeínas[®] con el ADN, unos de los factores más importantes a considerar son los sustituyentes del ligante primario. Este hecho podría coincidir con lo reportado por Figueroa de Paz [83], donde se plantea que la interacción de las Casiopeínas[®] con la doble hélice se lleva a cabo entre el ligante primario y los pares de bases del ADN.

Por otro lado, las Casiopeínas[®] que se unen al surco menor presentan valores menores de CI_{50} en la línea tumoral HeLa (cáncer cervicouterino) según lo reportado por Bravo-Gómez [74], esto quiere decir que son más activas en contraste por ejemplo con la **CasIII-Ba** que es la única que se intercala al ADN plasmídico y de las Casiopeínas[®] **CasIII-Ha** y **CasIII-5a-Cla** que tuvieron un comportamiento similar al cisplatino. Se propone que en el caso de que el mecanismo de acción de las Casiopeínas[®] sea vía unión al ADN, aquellas que interaccionan en el surco menor

sean más activas debido a que como se mencionó anteriormente esta unión resulta ser más específica que la unión por intercalación y alquilación.

Capítulo 9

Conclusiones

Al evaluar la interacción entre el plásmido pBR322 y las Casiopeínas[®] se propone que:

La **CasIII-La**, **CasIII-Ea**, **CasII-gly**, **CasVI-gly**, **CasVIII-gly** y **CasI-gly**, interactúen en el surco menor del ADN, debido al aumento en DC de la banda por apilamiento de bases.

Las Casiopeínas[®]: **CasIII-Ha** y **CasIII-5a-Cla**, al presentar efectos similares al cisplatino en DC, se unan de manera covalente al ADN.

La **CasIII-Ba**, al presentar un comportamiento similar al del BrET, se una de manera intercalante a la doble hélice.

Para la **CasIII-ia** y la **CasV-NO2-a-gly**, existe una interacción mixta (surco menor e intercalante), al presentar un comportamiento parecido al de la bleomicina.

Las Casiopeínas[®] **CasIII-Ma**, **Cas-5-Megly** y **Cas-5a-Ma**, presentan un modo de unión diferente a los evaluados en este trabajo, por lo que no fue posible clasificar su interacción con el ADN.

La doble sustitución del ligante primario y la presencia de la glicina en la estructura de las Casiopeínas[®], favorece la interacción en surco menor; mientras que la ausencia de sustituyentes en el ligante primario acompañado del acetilacetato como ligante secundario, la intercalación.

Capítulo 10

Referencias

- [1] Asco Cancer.Net Doctor-approved patient information. Revisado el día: 23-01-18. <http://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/what-cancer>
- [2] National breast cáncer foundation, inc. Revisado el día: 23-01-18. <http://www.nationalbreastcancer.org/what-is-cancer>
- [3] Mehdipour P., *Cancer genetics and psychotherapy*, Springer, **2017**, 400-402.
- [4] Cancers, solid tumor. Revisado el día: 24-01-18. http://oirm.ca/sites/default/files/disease-cancer-solid_tumour.pdf
- [5] Cancer research UK. Revisado el día: 28-01-18. <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer>
- [6] Cancer Institute NSW. Revisado el día: 25-04-18. <https://www.cancerinstitute.org.au/understanding-cancer/what-causes-cancer>
- [7] Organización mundial de la salud. Cáncer. Revisado el día: 28-01-18. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- [8] Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence. Revisado el día: 26-04-18. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- [9] Bhosle J., Hall J. *Principles of cancer therapy*, Surgery, **2009**, 27, 173–177.
- [10] Thripathi K., *Essentials of Medical Pharmacology*, **2008**.
- [11] American Cancer Society. Cómo la quimioterapia es usada para tratar el cáncer. Revisado el día: 24-01-18. <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y->

efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-la-quimioterapia-es-usada-para-tratar-el-cancer.html

[12] Ranade, Vasant V., *Cancer, Topics in Medicinal Chemistry*, American Journal of Therapeutics, **2007**, 14, 593.

[13] Steel R.T., Khleif S.N., *Handbook of Cancer Chemotherapy*, **2011**, 693.

[14] Kumar R., Kaleem M., Waseem M., Pandey A., *Drug Targets for Cancer Treatment: An Overview*, Medicinal Chemistry, **2015**, 5, 115-123.

[15] Tessler J., Varela Y., Rosso D., *Manual de Farmacología II. Quimioterapéuticos antineoplásicos e inmunosupresores*, **2004**, 2-8.

[16] Caley A., Jones R., *The principles of cancer treatment by chemotherapy*, Cancer Treatment, **2012**, 186-190.

[17] Durrant L., Scholefield J., *Principles of cancer treatment by immunotherapy*, Cancer Treatment, **2009**, 161-164.

[18] Rajabi M., Mousa S., *The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment*, Biomedicines, **2017**, 5.

[19] Kramer I., Lipp H., *Bevacizumab, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer*, Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, **2007**, 32, 1–14.

[20] Berdis A., *DNA polymerases as therapeutic targets*, Biochemistry, **2008**, 32, 8253-2260.

[21] Delgado M., León J., *Gene expression regulation and cancer*, Clinical and Translational Oncology, **2006**, 11, 780.

[22] Johansson M., Persson J., *Cancer therapy: targeting cell cycle regulators*, Bentham Science, **2008**, 7, 723 – 731.

- [23] Ramos J., Murillo R., Cortés F., Ruiz-Azuara L., *Metal-Based Drug-DNA Interactions*, Journal of the Mexican Chemical Society. **2013**, 3, 245-259
- [24] Rehman S., Sarwar T., Husain M., Ishgi H., Tabish M., *Studying non-covalent drug-DNA interactions*, Archives of Biochemistry and Biophysics, **2015**, 576, 49-60.
- [25] Sheng J., Huang Z., *Structure-based DNA-targeting strategies with small molecule ligands for drug discovery*, Medicinal Research Reviews, **2013**, 5, 1119-73.
- [26] Colvin M., *Alkylating agents. Encyclopedia of Cancer (Second Edition)*, **2002**.
- [27] Bailly C., Chaires J., *Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues*, Bioconjugate chemistry, **1998**, 5, 513-538.
- [28] Siddik Z., *Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: DNA-Interactive Alkylating Agents and Antitumour Platinum-Based Drugs*, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA, **2002**.
- [29] Deepak K., Gunjan T., Ranjana M., Suman K., *Carboplatin interaction with calf-thymus DNA: A FTIR spectroscopic approach*, Journal of Molecular Structure, **2010**, 969, 126–129.
- [30] Runting Y., Shaohua G., Xia L., Liguang L., *Antitumor activities and interaction with DNA of oxaliplatin-type platinum complexes with linear or branched alkoxyacetates as leaving groups*, Journal of Inorganic Biochemistry, **2011**, 105, 1095–1101.
- [31] Onoa G., Cervantes G., Moreno V., Prieto J., *Study of the interaction of DNA with cisplatin and other Pd(II) and Pt(II) complexes by atomic force microscopy*, Nucleic Acids Research, **1998**, 26, 1473–1480.
- [32] Atbio Nucleic acid-drug interactions. Revisado el día 24-01-18. <http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions>

- [33] Palchaudhuri R., Hergenrother P., *DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action*, Current Opinion in Biotechnology, **2007**, 18, 497-503.
- [34] Sheng J., Francois J., Montenay T., Behmoaras T., Roig V., Thuongt N., Helene C., *Sequence-specific intercalating agents: Intercalation at specific sequences on duplex DNA via major groove recognition by oligonucleotide-intercalator conjugates*, Proceedings of the National Academy of Sciences, **1989**, 86, 9198-9202.
- [35] Mišković K. Bujak M., Baus M., Glavaš L., *Antineoplastic DNA-binding compounds: intercalating and minor groove binding drugs*, **2013**, 4, 593-602.
- [36] Wilson W., Nguyen B., Tanious F., Mathis A., Hall J., Stephens C., Boykin D., *Dications that target the DNA minor groove: compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological activity*, Current Medicinal Chemistry. Anti-cancer agents, **2005**, 4, 389-408.
- [37] Sheng J., Gan J., Huan Z., *Structure-Based DNA-Targeting Strategies with Small Molecule Ligands for Drug Discovery*, Medicinal Research Reviews, **2013**, 5, 1119–1173.
- [38] Onoa G., Cervantes G., Moreno V., Prieto J., *Study of the interaction of DNA with cisplatin and other Pd(II) and Pt(II) complexes by atomic force microscopy*, Nucleic Acids Research, **1998**, 26, 1473–1480.
- [39] Raufa S., Goodingb J., Akhtara K., Ghauria M., Rahmana M., Anwara M., Khalida M., *Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2005**, 37, 205–217.
- [40] Muhammad S., Saqib A., Amin B., *Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **2013**, 124,1-19.
- [41] Sayeed U., Tarique S., Mohammed A., Hassan M., Mohammad T., *Studying non-covalent drug–DNA interactions*, Archives of Biochemistry and Biophysics **2015**, 576. 49-60.

- [42] Akdi K., Vilaplana R., Kamah S., González F., *Effects of Tris and Hepes buffers on the interaction of palladium-diaminopropane complexes with DNA*, Journal of Inorganic Biochemistry **2005**, 6, 1360-1368.
- [43] Li N., Ma Y., Yang C, Guo L, Yang X., *Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods*, Biophysical chemistry, **2005**, 3, 199-205.
- [44] Foteeva L., Matczuk M., Timerbaev A., *Analytical methodology for determination of interactions between metallodrugs and DNA: A critical examination*, Trends in Analytical Chemistry, **2017**, 90, 107-113.
- [45] Ahmad K., Arjmanda F., Tabassuma S., Monari M., Marchetti F., Pettinari C., *Organometallic ruthenium(II) scorpionate as topoisomerase II inhibitor; in vitro binding studies with DNA, HPLC analysis and its anticancer activity*, Journal of Organometallic Chemistry, **2014**, 771, 47-58.
- [46] Aleksi M., Kapetanovi V., *An Overview of the Optical and Electrochemical Methods for Detection of DNA – Drug Interactions*, Acta Chimica Slovenica, **2014**, 61, 555–573.
- [47] Chuan J., An-Guo Z., Chui-Li Y., Xiao Z., Wang K., *The interesting DNA-binding properties of three novel dinuclear Ru(II) complexes with varied lengths of flexible bridges*, **2011**, 105, 435-443.
- [48] Deiana M., Matczyszyn K., Massin J., Olesiak J., Andraud C., Samoc M., *Interactions of Isophorone Derivatives with DNA: Spectroscopic Studies*, Plos one, **2015**.
- [49] Agarwal S., Kumar D., Mehrotra R., *Spectroscopic studies of the effects of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf-thymus DNA*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **2013**, 120, 177–182.

- [50] Reza H., Parvin H., Zahra M., Pei M., Nafiseh S., *DNA-binding studies of valrubicin as a chemotherapy drug using spectroscopy and electrochemical techniques*, Journal of Pharmaceutical Analysis, **2017**, 7, 176-180.
- [51] Ataf A., Bhajan L., Nasir K., Badshah A., Shafiq U., Akbar K., *Spectroscopic, Electrochemical, and In Silico Characterization of Complex Formed between 2-Ferrocenylbenzoic Acid and DNA*, Journal of Chemistry, **2016**.
- [52] Lee P., Costumbrado J, Hsu C., Kim Y., *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments*, Journal of visualized experiments : JoVE., **2012**, 62.
- [53] Yábar C., *Manual de Procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*, Perú, **2003**.
- [54] Plásmidos en electroforesis. Revisado el día: 25-04-18.
<http://biomodel.uah.es/an/plasmido/inicio.htm>
- [55] Shahabadi N., Darabi F., Maghsudi M., Kashanian S., *DNA Binding and Gel Electrophoresis Studies of a Copper (II) Complex Containing Mixed Aliphatic and Aromatic Dinitrogen Ligands*, DNA and Cell Biology, **2010**, 29, 329-336.
- [56] Access Medicina. Revisado el día: 26-04-18
<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1960§ionid=148097228>
- [57] Nimse S., Palb D., *Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms*, Royal Society of Chemistry, **2015**, 5, 27986-28006.
- [58] Marzano C., Pellei M, Tisato F., Santini C., *Copper Complexes as Anticancer Agents*, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, **2009**, 9, 185-211.
- [59] Arredondo M., Núñez M., *Iron and copper metabolism*, Molecular Aspects of Medicine, **2005**, 26, 313-325.

- [60] Messerschmidt A., *Cooper Metalloenzymes*, El servier, **2010**, 489-545.
- [61] Osredkar J., Sustar N., *Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance*, Journal of Clinical Toxicology, **2011**.
- [62] Learya S., Winge D., Cobine P., *"Pulling the plug" on cellular copper: The role of mitochondria in copper export*, Biochimica et Biophysica Acta, **2009**, 1793, 146–153.
- [63] Festa R., Thiele D., *Copper: An essential metal in biology*, Current Biology, 21.
- [64] Chan W, Rennert M., *The role of copper in iron metabolism*, Annals of Clinical & Laboratory Science, **1980**, 10, 338-44.
- [65] Nimse S., Palb D., *Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms*, Royal Society of Chemistry, **2015**, 5, 27986-28006.
- [66] Ruiz-Azuara L., *Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos*, Tipo II S.18802 172248, **1993**.
- [67] Ruiz-Azuara L., *Process to obtain new mixed copper amino acidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents*, 07/628843, US5107005 A, 1992, RE 35458, US RE35,458E, **1997**.
- [68] Ruiz-Azuara L., *Process to obtain new mixed copper amino acidate complexes from methylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents*, 628628, 5576325, **1996**.
- [69] Robledo D., *Efecto sinérgico de la casiopeína II gly con drogas empleadas en el sector clínico sobre la proliferación del cáncer cervico-uterino (CCU) de HeLa*, Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, **2016**

[70] Carvallo F., Trejo C., Gómez C., Rodríguez E., Rosales L., Cortés E., Cedillo C., Gracia I., Ruiz-Azuara L., Marina V., Constantino F., *Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo*, *BioMetals*, **2008**, 21, 17–28.

[71] Marín-Hernández, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L. & Moreno-Sánchez, R. *Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®) on mitochondrial functions*. *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 65, 1979–1989.

[72] Bravo E., Hernández A., Gracia I., *Antineoplastic Evaluation of Two Mixed Chelate Copper Complexes (Casiopeínas®) in HCT-15 Xenograft Model*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, **2013**, 57, 205–211.

[73] Trejo C., Palencia g., Zúñiga S., Rodríguez A., Osorio L., Sánchez L., Gracia I., Márquez L., Sánchez A., Moreno M., Cruz A., Bravo E., Ruiz-Azuara L., Rodríguez S., Sotelo J., *Cas Ilgly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms*, *Neoplasia*, **2005**, 7, 563 – 574.

[74] Bravo E., García J., Gracia I., Ruiz-Azuara L., *Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N–N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N–N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®)*, **2009**, 103, 299-309.

[75] Valencia A., Uribe L., Galindo-Murillo R., Baca K., Gutiérrez A., Vázquez A., Ruiz-Azuara L., Lemus E., Mejía C., *Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals Casiopeína-Induced Apoptosis Pathways*, *PLOS ONE*, **2013**, 8, 1-18.

[76] Lemus E., Grizett A., Vázquez A., Palma L., Ruiz- Azuara L., Mejía C., *Analysis of Apoptotic and Autophagic Pathways in Neuroblastoma by Treatment with Copper Compounds*, *INTECH*, **2013**, 145-161.

- [77] Trejo C., Jiménez D., Rodríguez S., Fernández F., Cruz A., Ruiz- Azuara L., Sotelo L., *Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and jnk activation*, BioMed Central Cancer, **2012**, 156.
- [78] Rivero-Müller, A., De Vizcaya-Ruiz, A., Plant, N., Ruiz-Azuara L. & Dobrota, M. *Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly[®], binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity*. Chemico-Biological Interactions, **2007**, 165, 189–199.
- [79] Marín-Hernández, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L. & Moreno-Sánchez, R. *Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas[®]) on mitochondrial functions*. Biochemical Pharmacology, **2003**, 65, 1979–1989.
- [80] Guerrero S., Cano P., Reyes E., Velazquez F., Bravo M., Ruiz L., *Genotoxicity of the cooper antineoplastic coordination complexes Casiopeínas*, Toxicology in Vitro, **2011**, 25, 1376-1384.
- [81] Kachadourian R., Brechbuhl H., Ruiz-Azuara L., Gracia I., Day B., *Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells*, Toxicology, **2010**, 3, 176-183.
- [82] Sáenz A., *Estudio de la reactividad de la Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia, Cisteína, Glutación y 2-mercaptoetanol*, Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, **2013**.
- [83] Figueroa De Paz Y., *Estudio de la Interacción de Compuestos de Coordinación Quelatos Mixtos de Cobre (II) con ADN*, **2017**, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Tesis de Maestría.
- [84] Becco L., Rodríguez A., Bravo M., Prieto M., Ruiz-Azuara L., Garat B., Moreno V., Gambino D., *New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas[®]: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity*, Journal of Inorganic Biochemistry, **2012**, 109, 49–56.

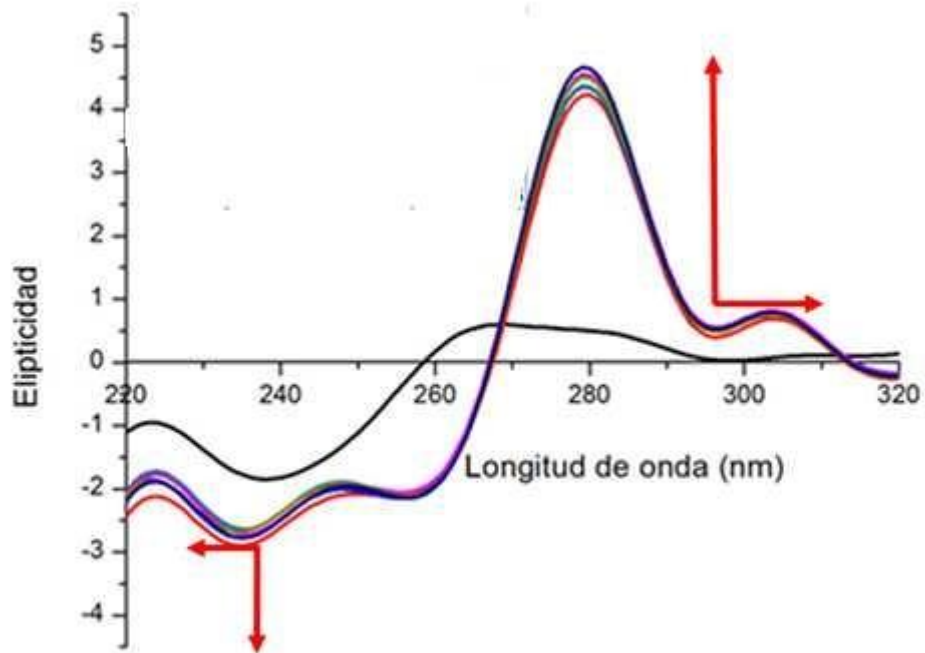
- [85] Becco L., García J., Ruiz-Azuara L., Gambino D., Garat B., *Analysis of the DNA Interaction of Copper Compounds Belonging to the Casiopeínas® Antitumoral Series*, Biological Trace Element Research, **2014**, 161,210–215.
- [86] Galindo R., Hernández J., González M., Cortés F., Ruiz-Azuara L., Moreno R., *π -Stacking between Casiopeinas and DNA bases*, Physical Chemistry Chemical Physics, **2011**, 13, 14510–14515.
- [87] Galindo R., Ruiz-Azuara L., Moreno R., Cortés F., *Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex*, Physical Chemistry Chemical Physics, **2012**, 14, 15539–15546.
- [88] Galindo R., García J., Ruiz-Azuara L., Cheatham T., Cortés F., *Intercalation processes of copper complexes in DNA*, Nucleic Acids Research, **2015**, 43, 5364-5376.
- [89] Müller A., De Vizcaya A., Plant, N., Ruiz- Azuara L. & Dobrota, M. *Mixed chelate copper complex, Casiopeina Ilgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity*. Chemico-Biological Interactions 165, 189–199 (2007).
- [90] Alemón R., Muñoz J., Ruiz- Azuara L., Gracia I. *Casiopeína Ilgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide*, Toxicology in Vitro, **2008**, 22, 710–715.
- [91] Serment J., Cano P., Reyes E., Velazquez F., Bravo M., Ruiz-Azuara L., *Genotoxicity of the cooper antineoplastic coordination complexes Casiopeínas*, Toxicology in Vitro, **2011**, 25, 1376-1384.
- [92] Sigmon J., Larcom L., *The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis*, Electrophoresis, **1996**, 10, 1524-1527.

- [93] Chen J., Stubbe J., *Bleomycins: towards better therapeutics*, Nature Reviews, **2005**, 5, 102-112.
- [94] Cornejo A., Serrato A., Rendón B., Rocha M., *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), **2014**, 27-52.
- [95] Kypr J., Kejnovska I., Renciuik D., Vorlickova M., *Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA*, Nucleic Acids Research, **2009**, 37, 61713–1725.
- [96] Gray D., Ratliff R., Vaughan M., *Circular dichroism spectroscopy of DNA*, Methods in enzymology, **1992**, 211, 389-406.
- [97] García Ramos J., *Estudio de la actividad nucleasa de quelatos mixtos de Cu(II): Casiopeínas*, **2015**, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Tesis de Doctorado.

Anexo A

**Espectros de DC de las Casiopeínas[®] evaluadas
con ADN plasmídico.**

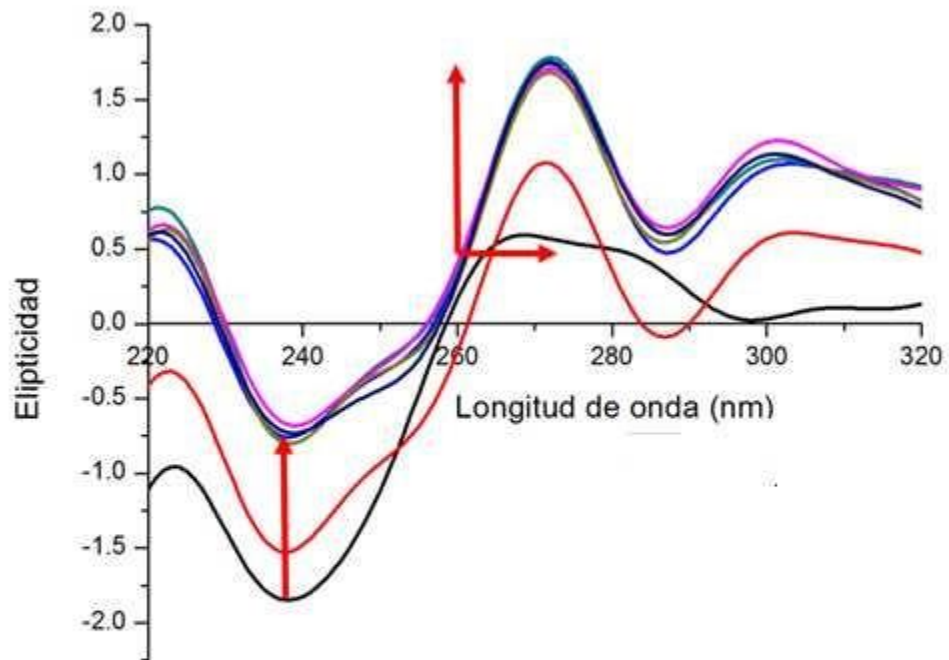
Espectro de DC de la CasIII-Ea con ADN



Gráfica 13. Espectro de DC de la **CasIII-Ea** ($70 \mu\text{M}$) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** ($40 \text{ ng}/\mu\text{L}$) donde:

ADN plasmídico — 0 — 5 — 10 — 20 — 40 — 80 — minutos

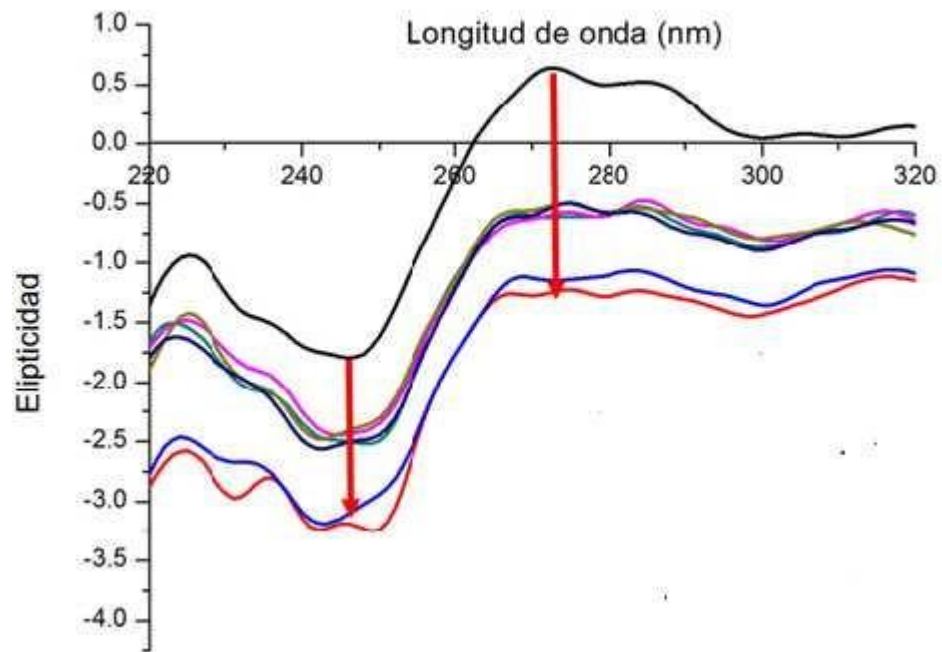
Espectro de DC de la CasIII-La con ADN



Gráfica 14. Espectro de DC de la **CasIII-La** (70 μM) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 $\text{ng}/\mu\text{L}$) donde:

ADN plasmídico — 0 (—) 5 (—) 10 (—) 20 (—) 40 (—) 80 minutos

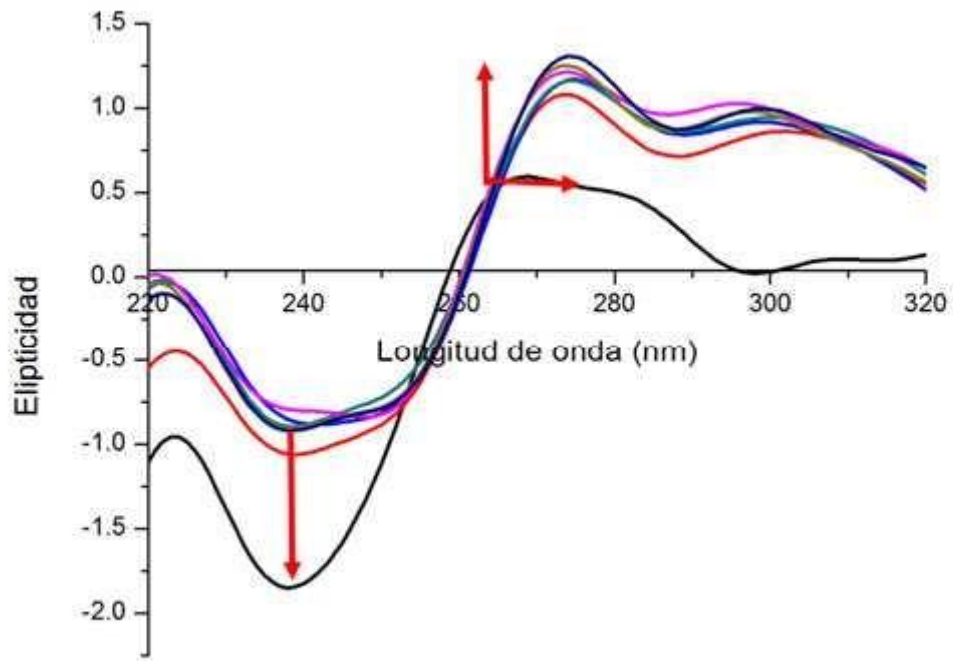
Espectro de DC de la CasIII-Ha con ADN



Gráfica 15. Espectro de DC de la **CasIII-Ha** (70 μM) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 $\text{ng}/\mu\text{L}$) donde:

ADN plasmídico — 0 — 5 — 10 — 20 — 40 — 80 — minutos

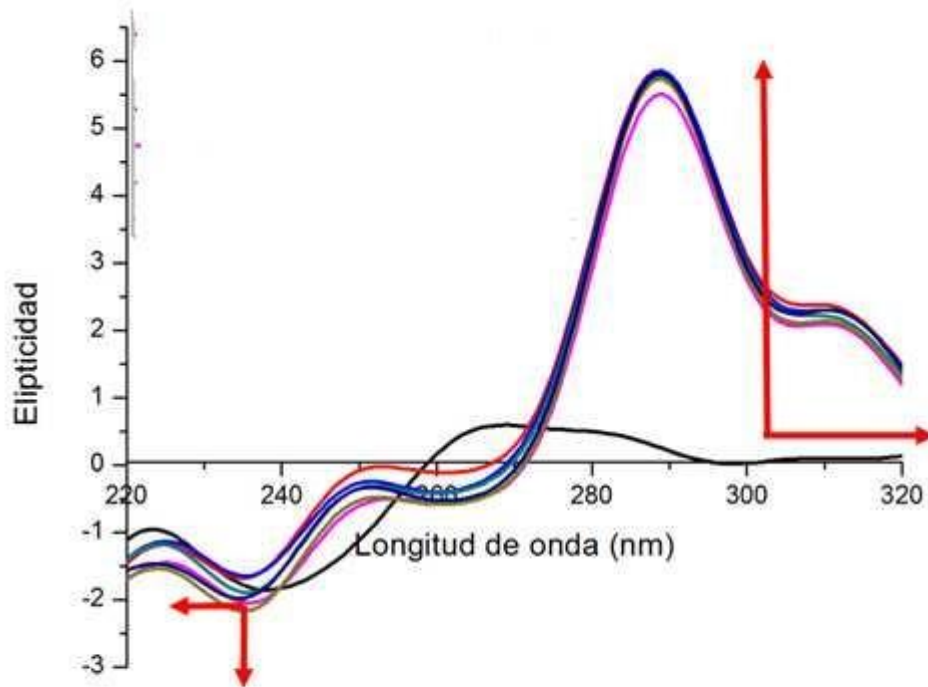
Espectro de DC de la CasVI-gly con ADN



Gráfica 16. Espectro de DC de la **CasVI-gly** (70 μM) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 $\text{ng}/\mu\text{L}$) donde:

ADN plasmídico [—], 0 [—], 5 [—], 10 [—], 20 [—], 40 [—], 80 [—] minutos

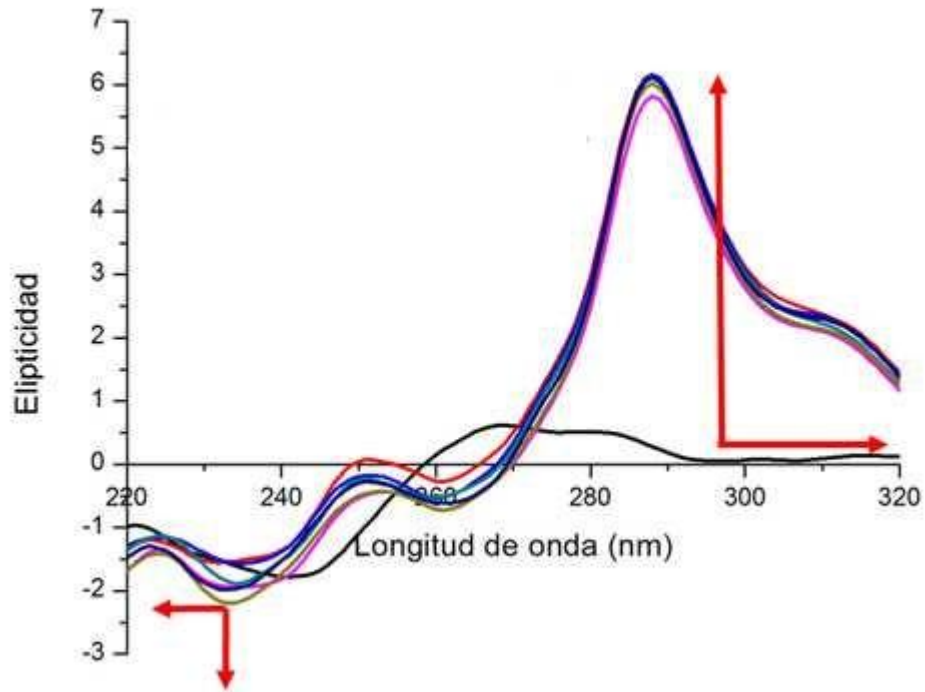
Espectro de DC de la CasVIII-gly con ADN



Gráfica 17. Espectro de DC de la **CasVIII-gly** (70 μ M) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 ng/ μ L) donde:

ADN plasmídico — 0 — 5 — 10 — 20 — 40 — 80 — minutos

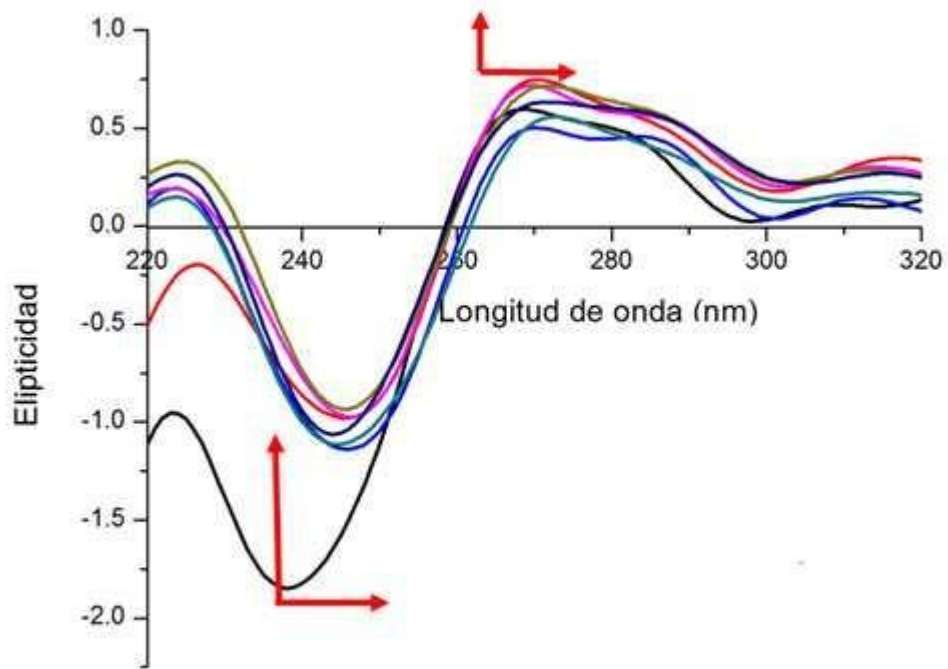
Espectro de DC de la Cas-I-gly con ADN



Gráfica 18. Espectro de DC de la **Cas-I-gly** (70 μM) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 ng/μL) donde:

ADN plasmídico — 0 — 5 — 10 — 20 — 40 — 80 — minutos

Espectro de DC de la Cas-V-NO₂a-gly con ADN



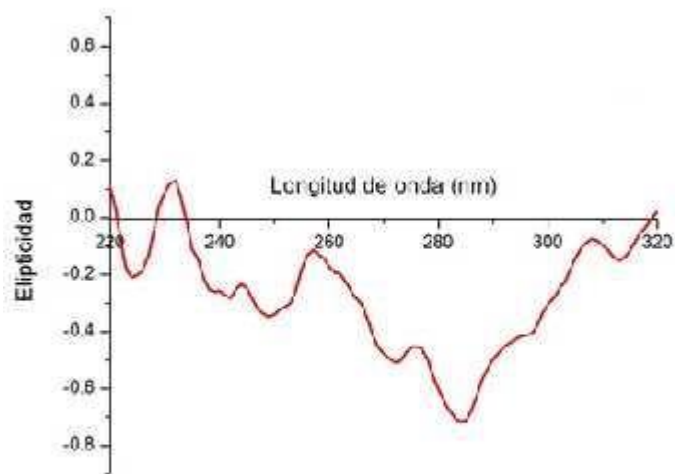
Gráfica 19. Espectro de DC de la **Cas-V-NO₂a-gly** (70 μ M) incubado a diferentes tiempos con **plásmido pBR322** (40 ng/ μ L) donde:

ADN plasmídico — 0 — 5 — 10 — 20 — 40 — 80 — minutos

Anexo B

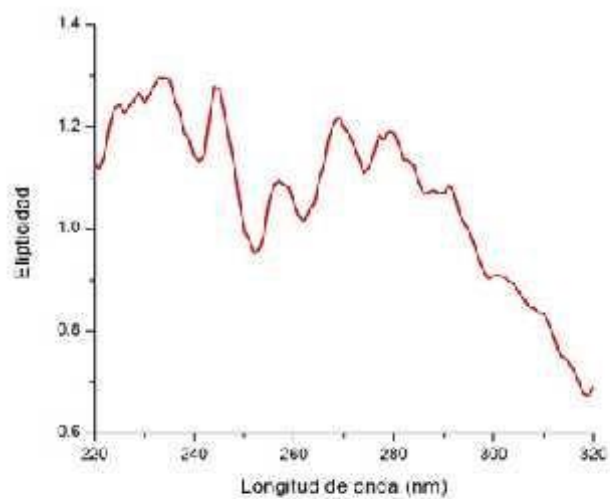
Espectros de DC de las Casiopeínas[®] evaluadas.

Espectro de DC de la CasIII-Ba



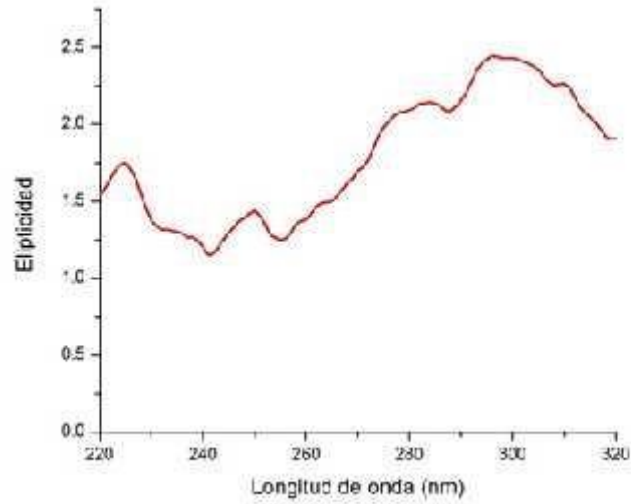
Gráfica 19. Espectro de DC de la **CasIII-Ba** (70 μ M).

Espectro de DC de la Cas-5a-Ma



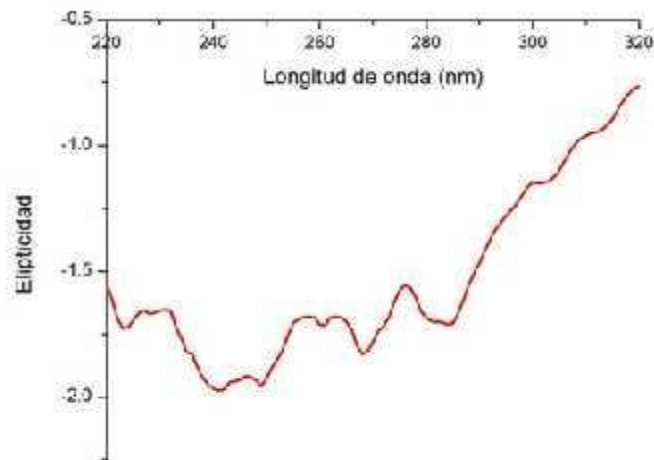
Gráfica 20. Espectro de DC de la **Cas-5a-Ma** (70 μ M).

Espectro de DC de la CasIII-ia



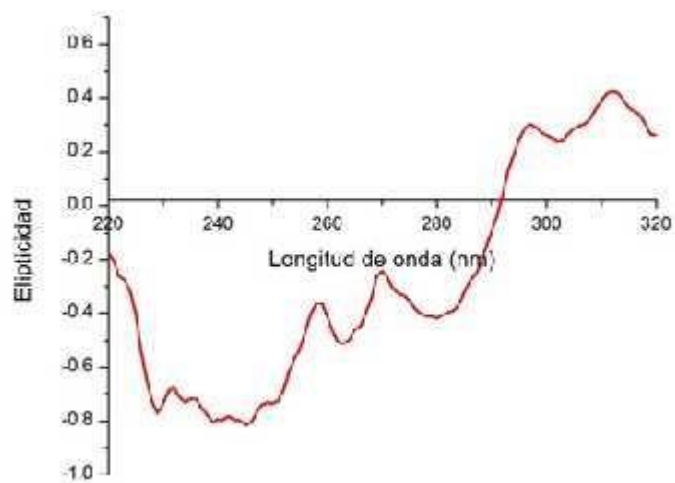
Gráfica 21. Espectro de DC de la **CasIII-ia** (70 μ M).

Espectro de DC de la CasIII-Ea



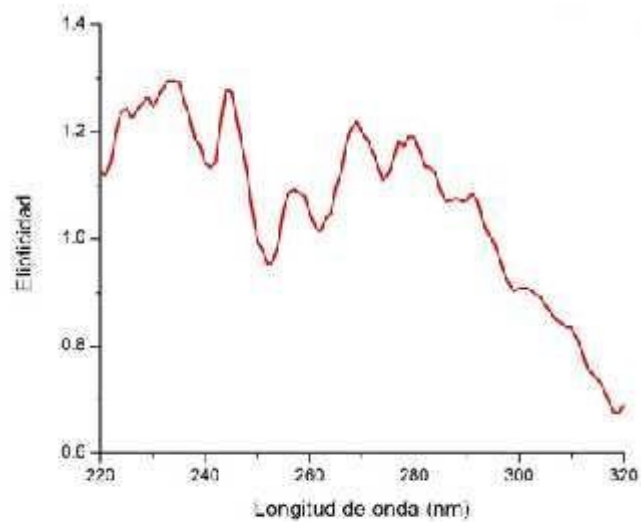
Gráfica 22. Espectro de DC de la **CasIII-Ea** (70 μ M).

Espectro de DC de la CasIII-La



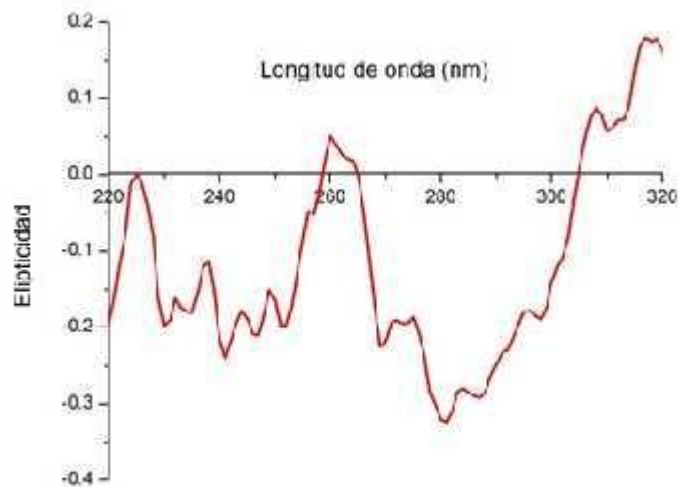
Gráfica 23. Espectro de DC de la **CasIII-La** (70 μ M).

Espectro de DC de la CasIII-Ma



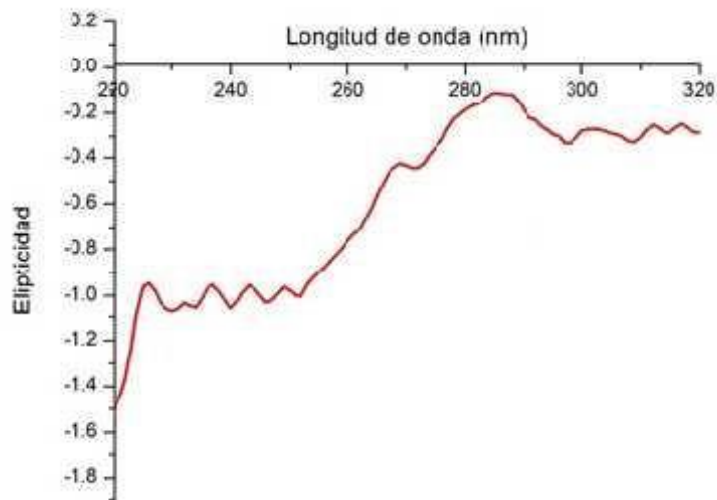
Gráfica 24. Espectro de DC de la **CasIII-Ma** (70 μ M).

Espectro de DC de la CasIII-Ha



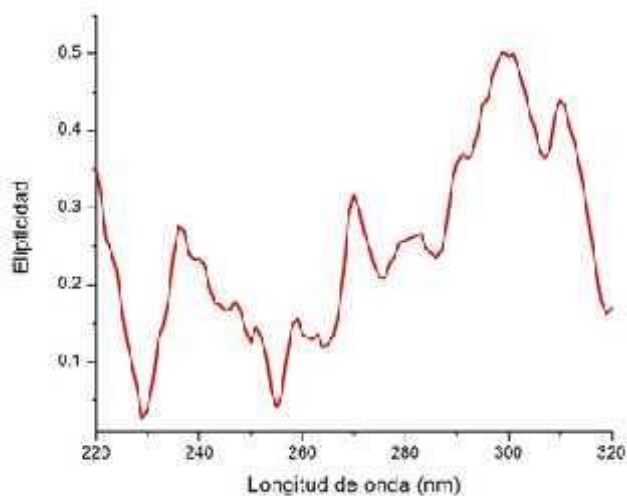
Gráfica 25. Espectro de DC de la **CasIII-Ha** (70 μ M).

Espectro de DC de la CasIII-5a-Cla



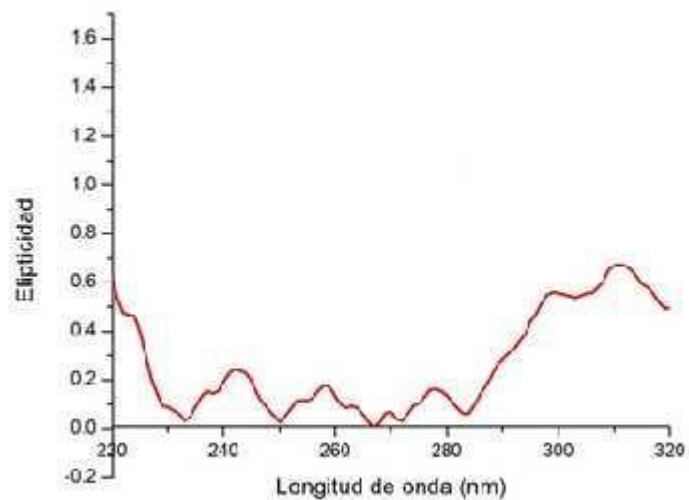
Gráfica 26. Espectro de DC de la **CasIII-5a-Cla** (70 μ M).

Espectro de DC de la Cas-5-Megly



Gráfica 27. Espectro de DC de la **Cas-5-Megly** (70 μ M).

Espectro de DC de la CasII-gly



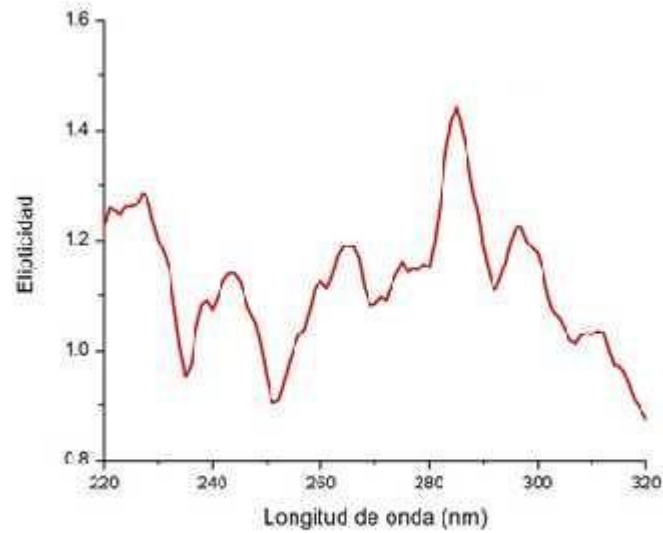
Gráfica 28. Espectro de DC de la **CasII-gly** (70 μ M).

Espectro de DC de la CasVI-gly



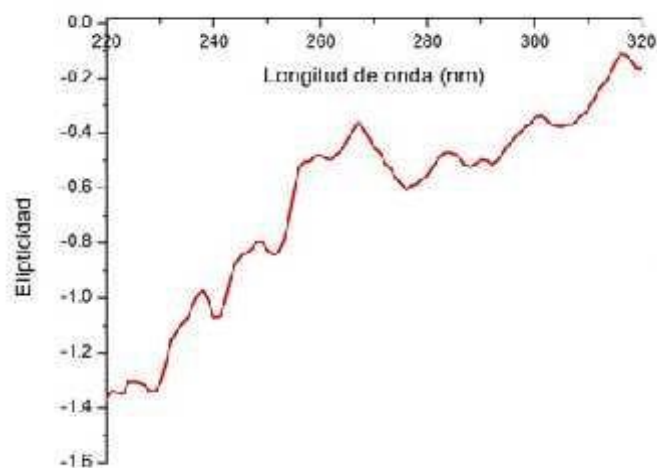
Gráfica 29. Espectro de DC de la **CasVI-gly** (70 μ M).

Espectro de DC de la CasVIII-gly



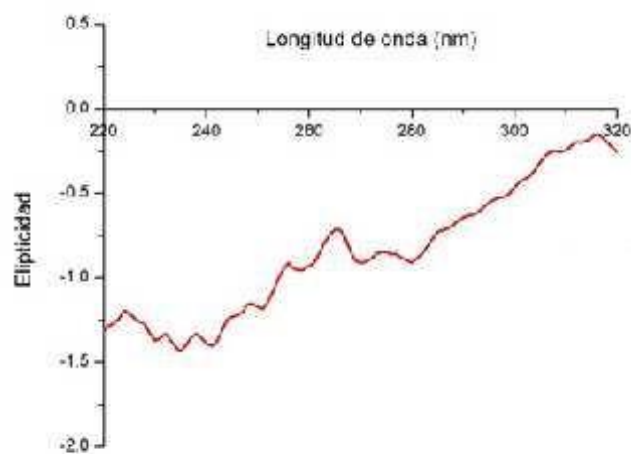
Gráfica 30. Espectro de DC de la **CasVIII-gly** (70 μ M).

Espectro de DC de la CasI-gly



Gráfica 31. Espectro de DC de la **CasI-gly** (70 μ M).

Espectro de DC de la CasV-NO₂a-gly



Gráfica 32. Espectro de DC de la **CasV-NO₂a-gly** (70 μ M).

Anexo C

Características fisicoquímicas de las Casiopeínas[®] del Grupo 1 y 2.

1. *Nitrato de 1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) (Casiopeína III-Ba o CasIII-Ba)*. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$: (PM = 422.87 g/mol): C, 47.01; N, 10.03; H, 4.03%. Experimental: C, 48.05; N, 9.88; H, 4.5%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1623.8, 1587.2, 1519.7, 1429.06, 1384.7 (NO_3^-), 725.14.
2. *Nitrato de 4-metil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) (Casiopeína-5a-Ma o Cas-5a-Ma)*. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$: (PM = 436.987 g/mol): C, 48.08; N, 10.14; H, 4.25%. Experimental: C, 49.48; N, 9.61; H, 4.38%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1623.8, 1577.6, 1518.6, 1428.3, 1384.7 (NO_3^-), 727.1.
3. *Nitrato de 4,4'-dimetil-2,2'-bipridina acetilacetato cobre(II) monohidratado (Casiopeína III-ia o CasIII-ia)*. Rendimiento: 90%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$: (PM = 426.92 g/mol): C, 47.83; N, 9.84; H, 4.96%. Experimental: C, 47.48; N, 9.97; H, 5.07%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1616.14, 1587.2, 1525.5, 1490.8, 1384.7 (NO_3^-), 730.9. $\mu_{\text{eff}} = 1.80$ BM. λ (1 mM disolución etanólica a 298 K) = 40.23 μS .
4. *Nitrato de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) monohidratado (Casiopeína III-Ea o CasIII-Ea)* Rendimiento: 86%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM = 450.94 g/mol): C, 50.61; N, 9.32; H, 4.69. Experimental: C, 50.23; N, 9.30; H, 4.55%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1622.2, 1577.6, 1521.6, 1425.2, 1384.7 (NO_3^-) 869.8, 725.1. $\mu_{\text{eff}} = 1.80$ BM. λ (1 mM disolución etanólica 298 K) = 38.48 μS .
5. *Nitrato de 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) dihidratado (Casiopeína III-La o CasIII-La)*. Rendimiento: 92%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM = 468.08 g/mol): C, 48.66; N, 8.96; H, 4.94%. Found:

C, 48.53; N, 9.15; H, 4.99%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3483, 3070, 1606, 1581, 1517, 1384 (NO_3^-), 1431, 817, 730. $\mu_{\text{eff}} = 1.82 \text{ BM}$. λ (1 mM disolución etanólica a 298 K) = 38.9 μS .

6. *Nitrato de 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) monohidratado (Casiopeína III-Ma o CasIII-Ma)*. Rendimiento: 85%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM = 478.98 g/mol): C, 52.66; N, 8.77; H, 5.26. Experimental: C, 52.77; N, 9.11; H, 5.18%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3338, 1618, 1583, 1519, 1431, 1384 (NO_3^-), 833, 727. $\mu_{\text{eff}} = 1.76 \text{ BM}$. λ (1 mM disolución etanólica a 298 K) = 37.32 μS .

7. *Nitrato de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) (Casiopeína III-Ha o CasIII-Ha)*. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$: (PM = 575.07 g/mol): C, 60.88; N, 7.24; H, 4.42%. Experimental: C, 60.46; N, 7.29; H, 4.54%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1620.0, 1585.3, 1517.8, 1427.1, 1384.7 (NO_3^-), 736.7.

8. *Nitrato de 5-cloro-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) (Casiopeína 5a-Cl o CasIII-5a-Cl)*. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$: (PM = 457.32 g/mol): C, 43.68; N, 9.05; H, 3.44%. Experimental: C, 44.64; N, 9.18; H, 3.52%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1614.2, 1577.6, 1517.6, 1423.3, 1384.7 (NO_3^-), 729.0.

9. *Nitrato de 5-metil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) (Casiopeína-5-Megly o Cas-5-Megly)*. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$: (PM = 411.85 g/mol): C, 42.01; N, 13.63; H, 3.88%. Experimental: C, 43.74; N, 13.6; H, 3.91%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1637, 1524, 1431, 1384.7 (NO_3^-), 729.0.

10. *Nitrato de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) dihidratado (Casiopeína II-gly o CasII-gly)* Rendimiento: 89%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM = 443.9 g/mol): C, 43.29; N, 12.62; H, 4.54.

Experimental: C, 43.53; N, 12.61; H, 4.70%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3305, 3253, 2945, 1600, 1579, 1383 (NO_3^-), 1430, 871, 726. $\mu_{\text{eff}} = 1.76 \text{ BM}$. λ (1 mM disolución etanólica a 298 K) = 38.8 μS .

11. Nitrato de 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) monohidratado (*Casiopeína VI-gly* o *CasVI-gly*). Rendimiento: 89%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM = 425.88 g/mol): C, 45.12; N, 13.16; H, 4.26%. Experimental: C, 45.55; N, 13.22.; H, 4.19%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3421, 3261, 2923, 1632, 1525, 1385 (NO_3^-), 1430, 822, 730. $\mu_{\text{eff}} = 1.71 \text{ BM}$. λ (1 mM disolución metanólica a 298 K) = 76.1 μS .

12. Nitrato de acua 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) monohidratado (*Casiopeína VIII-gly* o *CasVIII-gly*). Rendimiento: 83%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM = 453.94 g/mol): C, 47.63; N, 12.34; H, 4.88%. Experimental: C, 46.97; N, 12.67; H, 4.84%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3395, 3300, 2937, 1620, 1533, 1385 (NO_3^-), 1434, 896, 726. $\mu_{\text{eff}} = 1.78 \text{ BM}$. λ (1 mM disolución metanólica a 298 K) = 79.2 μS .

13. Nitrato de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) (*Casiopeína I-gly* o *CasI-gly*). Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$: (PM = 550.02 g/mol): C, 52.51; N, 9.75; H, 3.86%. Experimental: C, 56.77; N, 10.18; H, 4.03%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1605, 1524, 1429, 1384.7 (NO_3^-), 745.

14. Nitrato de 5-nitro-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) (*Casiopeína V-NO₂a-gly* o *CasV-NO₂a-gly*). Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$: (PM = 442.82g/mol): C, 35.12; N, 15.13; H, 3.03%. Experimental: C, 37.97; N, 15.81; H, 2.95%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1632, 1520, 1427, 1384.7 (NO_3^-), 723.

