



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFEECTO DE NUEVOS DERIVADOS DE TIAZOLO[5,4-*b*]QUINOLINA
SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ADN TOPOISOMERASA II EN
ENSAYOS *IN VITRO*.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

JOSÉ CARLOS PÁEZ FRANCO



MÉXICO, D.F.

2011



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: Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres.
VOCAL: Profesor: Mireya Rodríguez Penagos.
SECRETARIO: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra.
1er. SUPLENTE: Profesor: José Pedraza Chaverri.
2° SUPLENTE: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 115 del Edificio E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

ASESOR DEL TEMA: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres_____.

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: M en C. Ignacio Gonzales Sánchez_____.

(nombre y firma)

SUSTENTANTE: José Carlos Páez Franco_____.

(nombre (s) y firma (s))

Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en el 45 Congreso Mexicano de Química, Riviera Maya, Quintana Roo, Septiembre del 2010.

Agradecimientos

A mi Familia, Amigos y Maestros que ayudaron a la realización de la presente tesis.

Agradezco al proyecto DGAPA-PAPIIT IN218910 por la beca otorgada para la realización de la presente tesis.

"Nada está perdido si se tiene el valor de proclamar que todo está perdido y hay que empezar de nuevo".

Julio Cortázar

Índice

Índice de Figuras.....iii

Índice de Tablas.....iv

Capítulo 1. Introducción.....1

Capítulo 2. Antecedentes3

2.1 ADN Topoisomerasas.....3

2.2 Topología del ADN.....3

2.3 Topoisomerasas tipo I.....6

2.3.1 ADN topoisomerasas tipo I α6

2.3.2 ADN topoisomerasas I β6

2.3.3 Topoisomerasa V.....7

2.4 ADN topoisomerasa tipo II.....7

2.4.1 ADN Girasa.....8

2.4.2 DTi IV.....8

2.4.3 ADN Topoisomerasas II Eucariotas.....8

2.5 Análisis estructural de DTi II.....10

2.6 Ciclo catalítico de Topoisomerasa II.....13

2.7 Funciones biológicas de DTi II.....15

2.7.1 Duplicación.....15

2.7.2 Segregación de los cromosomas.....16

2.7.3 DTi II y estructura de los cromosomas.....17

2.7.4 Función de DTi II en Transcripción.....17

2.7.5 Checkpoint para asegurar la correcta función de DTi II.....18

2.8 Selectividad en el transporte de ADN con cromatina.....19

2.9 Agentes intercalantes.....21

2.10 Inhibidores específicos de DTi I.....23

2.10.1 Camptotecinas.....23

2.10.2 Inhibidores no Camptotecinas.....24

2.11 Inhibición DTi II.....24

2.11.1 Inhibidores catalíticos.....25

2.11.2 Venenos de DTi II.....	26
2.12 Derivados de Acridina.....	28
2.13 Efecto del superenrollamiento en la función de la ADN topoisomerasa y la acción de los fármacos anticancerígenos.....	30
2.14 DTi II como toxina celular.....	31
2.15 ATM e histona H2AX como mediadores clave en la respuesta a la ruptura de doble cadena.....	33
2.16 Escisión nucleolítica de los aductos proteicos.....	33
Capítulo 3. Planteamiento del problema.....	35
Capítulo 4. Hipótesis.....	37
Capítulo 5. Objetivos.....	38
Capítulo 6. Materiales y Métodos.....	39
6.1 Compuestos a evaluar.....	39
6.2 Métodos.....	41
6.2.1 Ensayo de decatenación para medir la actividad de Topoisomerasa II α en presencia de los compuestos.....	41
6.2.2 Materiales.....	42
6.3.1 Aislamiento de complejos ADN-Topoisomerasa in vivo. Ensayo ICE.....	43
6.3.2 Materiales.....	44
Capítulo 7. Resultados y Análisis.....	47
7.1 Ensayo de inhibición de la Topoisomerasa II humana in vitro.....	47
7.2 Ensayo ICE.....	51
Capítulo 8. Conclusiones.....	57
Capítulo 9. Perspectivas.....	58
Capítulo 10. Bibliografía.....	59

Índice de Figuras.

Figura 1. Esquema que ilustra las propiedades topológicas de la doble hélice de ADN.....	3
Figura 2. Tipos de cruzamientos que experimenta la doble hélice.....	5
Figura 3. Actividades de las ADN topoisomerasas.....	9
Figura 4. Estructura y dominios principales de DTi II.....	11
Figura 5. Modelo de dos puertas de DTi II.....	12
Figura 6. Modelo de ruptura por dos iones metálicos en el sitio activo.....	15
Figura 7. Acumulación de superenrollamientos y formación de preconcatenados durante la replicación.....	16
Figura 8. Formación de superenrollamientos durante la transcripción.....	18
Figura 9. Yuxtaposición de segmentos de ADN forzada por la arquitectura de la cromatina.....	21
Figura 10. Deformación que sufre el ADN por acción de agentes intercalantes.....	23
Figura 11. Complejo terciario formado por DTi I-CPT-ADN.....	24
Figura 12. Mecanismos de inhibición de DTi II.....	26
Figura 13. Estructura de fármacos anticancerígenos que actúan en contra de DTi II.....	27
Figura 14. Estructura de la Acridina.....	28
Figura 15. Estructuras de Daunomicina y 9 amino DACA intercaladas al ADN.....	29
Figura 16. Estructura de algunos fármacos anticancerígenos derivados del núcleo de acridina.....	30
Figura 17. Equilibrio entre los complejos de ruptura y religación.....	32
Figura 18. Micrografía de kADN mitocondrial de <i>Crithidia fasciculata</i>	42
Figura 19. Equilibrio de ruptura/ligación de las DTi.....	43
Figura 20. Disposición de las fracciones en el gradiente de CsCl.....	46
Figura 21. Actividad de decatenación de kADN por la ADN-topoisomerasa II humana en ausencia (DTi II) y en presencia de los inhibidores AMSA y los compuestos 1 al 11.....	48
Figura 22. Efecto sobre la actividad de la ADN topoisomerasa II de los derivados de tiazoloquinolina y m-AMSA como referencia.....	48
Figura 23. Actividad de decatenación de kADN por la ADN-topoisomerasa II humana en presencia de los inhibidores 1, 3, 4, 9 y AMSA.....	49
Figura 24. Actividad de decatenación de kADN en función de la concentración de inhibidores.....	49
Figura 25. Análisis de inmunoblot de complejos Top II-ADN estabilizados por fármacos en células de leucemia humana k-562.....	54
Figura 26. Determinación de la concentración de ADN en las fracciones para el experimento A.....	54
Figura 27. Determinación de la concentración de ADN en las fracciones para el experimento B.....	55

Índice de Tablas.

Tabla 1. Comparación de actividad citotóxica (CI 50 μM) en líneas celulares de derivados de 9-anilino-tiazolo (5,4-b) quinolina	35
Tabla 2. Estructura de los derivados de 9-anilino-tiazolo [5-4b] quinolina.....	39
Tabla 3. Estructuras de los derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina utilizados en los ensayos de decatenación de kADN.....	47
Tabla 4. Valores de CI ₅₀ (μM) estimados para los compuestos 1, 3, 4 y 9.....	48

1. Introducción

El cáncer es un término colectivo que engloba a un grupo de enfermedades caracterizadas por la pérdida de control del metabolismo y crecimiento celular, normalmente causado por mutaciones en el material genético, manteniéndose como una de las enfermedades más difíciles de tratar.

Los derivados de acridinas son un grupo de compuestos que poseen actividad antitumoral demostrada. Estos compuestos actúan como intercalantes en el ADN, pero ello no asegura su actividad antitumoral, ya que la evidencia sugiere que su acción *in vivo* está vinculada a su efecto inhibitorio sobre la actividad de la ADN topoisomerasa tipo II (DTi 2, 1). Las topoisomerasas tipo II catalizan la relajación del ADN superenrollado mediante un mecanismo que involucra cuatro etapas: i) la unión de la enzima a dos segmentos de doble hebra de ADN; ii) ruptura de ambas hebras en una doble cadena (generando una hebra rota en las dos cadenas y una hebra íntegra), formando un intermediario covalente Enzima-ADN. Este paso ocurre por el ataque nucleofílico de un residuo de tirosina del sitio activo sobre el enlace fosfodiéster del lado 5' (2), la ruptura es asimétrica generando extremos cohesivos; iii) el cruce de la doble hebra íntegra a través de la abertura y, iv) el resellado de las hebras rotas, por ataque de los extremos 3'OH libres sobre el fosfoéster de ADN-tirosilo de la enzima.

El mecanismo de acción de las acridinas parece residir en la estabilización de un complejo ternario entre el ADN, la DTi 2 y los derivados de acridinas, que impide el paso de la doble hebra íntegra por entre las hebras rotas (etapa iii). La DTi 2 es una enzima requerida para casi cualquier proceso que involucre lectura de ADN y su remodelación en la cromatina (3). Por tanto es esencial en la duplicación de ADN, su reparación y la transcripción. La reacción de ruptura/ligación que llevan a cabo las Topoisomerasas es diana de algunos de los fármacos anticancerígenos más efectivos que se usan actualmente (4). Sin embargo esta misma reacción también se ha relacionado con translocaciones cromosómicas que están asociadas con tipos específicos de leucemias (5).

Los compuestos aquí analizados son derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, que es un compuesto heterocíclico aromático, que se considera isómero con el anillo de acridina,

pero que, a diferencia de ésta, es heterotópico, es decir, que las caras del triciclo no son simétricas (6). Estos compuestos fueron sintetizados en el grupo de trabajo del Dr. Lira, y ensayos anteriores han demostrado la citotoxicidad que presentan estos derivados de tiazoloquinolinas. Poco se sabe del mecanismo de acción que desencadena la toxicidad, pero podría suponerse que actúan al igual que las acridinas, a través de la interacción que presentan con DTi 2. En este trabajo se reporta el efecto de los nuevos derivados tiazolo[5,4-*b*]quinolinas en la actividad de las ADN topoisomerasas II *in vitro* e *in vivo*.

Se evaluaron once compuestos derivados del núcleo de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, de los cuales el número 9 resultó ser un buen inhibidor de la actividad de DTi 2 en ensayos *in vitro*, no así en ensayos *in vivo*. Aunque se desconoce el mecanismo que provoca la citotoxicidad con los nuevos derivados de tiazoloquinolinas, por su naturaleza intercalante, se espera que actúen en el contexto de los ácidos nucleicos.

2. Antecedentes

2.1 ADN Topoisomerasas

Las ADN Topoisomerasas (DTi) son enzimas que actúan sobre la topología del ADN. Su actividad consiste en la interconversión de formas de ADN que difieren en su nivel de torsión interna de la doble hélice, a través de cambiar el llamado número de enlace del ADN (Fig.1). Dependiendo de si el número de enlace es modificado en pasos de 1 o de 2, estas enzimas se designan como DTi 1 y DTi 2.

Su actividad las hace esenciales para procesos tales como la duplicación del ADN, la transcripción y recombinación, así como también en la condensación y segregación de los cromosomas. En las teorías sobre el origen de la vida, se considera que estas enzimas habrían aparecido durante la formación del llamado mundo moderno de ADN (7), habiéndose diversificado en familias y subfamilias de proteínas con actividad de DTi, en ambos tipos de enzimas (I y II). Estas familias han sido descritas dentro de los tres tipos de dominios celulares (Archaea, Bacteria y Eukarya), así como también en genomas virales, tanto de virus que infectan eucariotes, como de bacteriófagos.

Las principales familias de ADN Topoisomerasas son las DTi 1A, DTi 1B, DTi 1C (también llamada DTi V); así como las DTi 2 α y DTi 2 β (también llamada DTi VI), las cuales no son homólogas entre sí, indicando un origen evolutivo independiente.

2.2 Topología del ADN

Por ser un helicoide, en la doble hélice del ADN se considera que las hebras están trenzadas. Además, los extremos del ADN están sujetos por su unión a las proteínas celulares, o bien, como en muchos plásmidos y cromosomas bacterianos, están cerrados circularmente por la unión del extremo 5' de cada hebra al extremo 3' de sí misma, generando dos moléculas circulares concatenadas. Por consiguiente, el trenzado de las hebras entre sí se encuentra constreñido, provocando que ciertas propiedades no puedan modificarse, a menos que se efectúe el rompimiento de un enlace y su posterior unión.

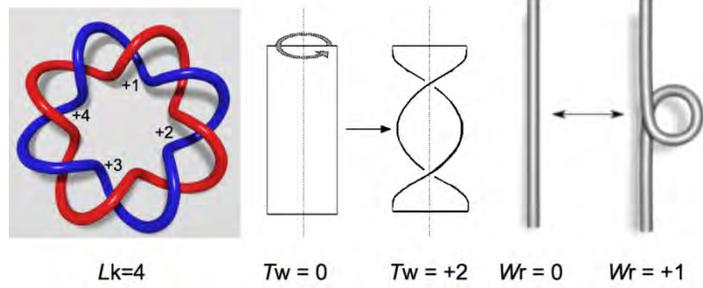


FIGURA 1. Esquema que ilustra las propiedades topológicas de la doble hélice de ADN. El número de enlace (Lk del inglés "linking number") es el número de veces que una hebra de ácido nucleico cruza encima de la otra. El Lk es necesariamente entero y está definido en ADN circular covalentemente cerrado, en el que este número es constante, mientras no se rompa un enlace fosfodiéster del ADN. El giro (Tw, "twist" en inglés) es el número de veces que una hebra gira alrededor de la otra. La torsión (Wr del inglés "writhe") es el número de veces que una hebra está embobinada alrededor de la otra. En general $Lk=Tw+Wr$. En la doble hélice relajada el Lk y el Tw son iguales, mientras que Wr es nulo (Wasserman SA, Cozzarelli NR. 1986. Biochemical topology: applications to DNA recombination and replication. Science.; 232(4753):951-60.)

En el contexto del ADN, el giro (*twist* en inglés) puede ser considerado como una medida de cuántas veces una cadena de doble hélice se envuelve alrededor de la otra a lo largo del eje central del dúplex. La torsión (*Writhe* en inglés) se relaciona con cuantas veces el eje formado por la doble hélice cruza sobre sí misma, formando un superenrollamiento. La suma de estos dos valores es igual al número de enlace (Lk. Ec.1) y juntas describen el número entero de veces en las que una hebra de ADN se enrolla alrededor de la otra. (8, Fig.1).

$$Lk=Tw+Wr \dots \dots \dots \text{Ecuación 1}$$

El giro y la torsión tienen designaciones positivas y negativas basadas en la dirección del cruzamiento del ADN. Por convención, una hélice a mano derecha como la exhibida en la forma B del ADN tiene un giro positivo mientras que un cruce a mano izquierda (ejemplo ADN-Z) tiene un giro negativo.

En contraste una torsión a mano derecha, en forma de superenrollamientos plectonómicos tiene un valor negativo, mientras que una a la izquierda tiene un valor positivo (Fig.2).

Los cruzamientos formados por enrollamientos plectonómicos tienen geometrías características, que pueden ser utilizadas por algunas DTi durante el reconocimiento al sustrato. Desde que la estructura del ADN fue determinada, se determinó que el número de enlace en el estado fundamental (Lk0) de cualquier ADN topológicamente limitado no superenrollado es el número de bases (N) dividido por la periodicidad de la hélice (cerca de 10.5 bp por vuelta (Ec.2., 9).

$$Lk_0 = N / 10.5 \dots \dots \dots \text{Ecuación 2}$$

Las desviaciones de Lk_0 son expresadas por el valor ΔLK , donde ΔLK es la suma de ΔW_r y ΔT_w . Estos valores son aplicables sólo en sistemas cerrados, como un cromosoma circular bacteriano o en un segmento lineal de ADN que se encuentra sujeto por ambos extremos. En estos sistemas, el giro y la torsión pueden interconvertirse para alterar la estructura del ADN, dejando al número de enlace como una constante (9).

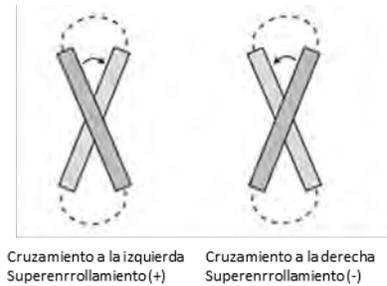


FIGURA 2. Tipos de cruzamientos que experimenta la doble hélice. Superenrollamientos positivos producen entrecruzamientos hacia la izquierda (+) mientras que superenrollamientos negativos producen cruzamientos hacia la derecha (-). (Schoeffler AJ, Berger JM. 2008. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. Quarterly Reviews of Biophysics. 41, 41–101)

La existencia de topoisomerasas es necesaria debido a la estructura de la doble hélice. Cada célula humana contiene dos metros de ADN que se encuentra compactado en un núcleo cercano a los 10 μm de diámetro (10). Aunque el ADN no se encuentre cerrado covalentemente, el material genético se encuentra anclado a un andamiaje de proteínas que forman estructuras llamadas cromosomas, por lo que las dobles cadenas pueden enrollarse plectonómicamente, en consecuencia, el acceso a la información del genoma está limitada (11). En otras palabras, cuando las hebras son separadas para exponer las bases, por acción de las enzimas llamadas helicasas, el giro tiende a desaparecer localmente, pero debido a que el Lk está limitado, el giro local no se pierde, sólo es desplazado hacia las regiones adyacentes generando un superenrollamiento positivo en dichas regiones. Así, en la mayoría de los sistemas vivos, el ADN está globalmente superenrollado negativamente alrededor de un 6% (12), de esta forma se compensa el superenrollamiento positivo generado al separar la hebras, facilitando la acción de las helicasas y la lectura de la información durante la replicación y la transcripción.

Dado que el giro característico de la forma B es muy estable, las desviaciones en Lk_0 son absorbidas principalmente (75%) por la torsión del ADN (9). La torsión brinda compactación al ADN, cuando hay cambios en el número de enlace.

2.3 Topoisomerasas tipo I

Las DTi I son enzimas que efectúan cambios topológicos al formar rupturas transitorias en una hebra de ADN por cada ciclo catalítico. Todas las topoisomerasas I usan el mismo mecanismo químico general para romper el enlace fosfodiéster. Un grupo tirosilo en el sitio catalítico de la enzima produce un ataque nucleofílico hacia el enlace fosfodiéster del ADN, formando una unión covalente con el ADN. El ataque hacia el enlace fosfotirosilo por el extremo hidroxilo de la hebra rota restaura el enlace fosfodiéster y libera la enzima para realizar un nuevo ciclo catalítico (9).

Las topoisomerasas tipo I han sido divididas dentro de dos familias: I α y I β . Esto con base en la polaridad de la ruptura de la hebra de ADN. DTi 1 α forma un intermediario transitorio 5'fosfotirosilo, liberando una cadena con un extremo 3'OH mientras que DTi 1 β forma un intermediario 3'fosfotirosilo y su consecuente cadena 5'OH. Las enzimas tipo I α promueven el paso de la cadena intacta a través de la ruptura de la otra cadena, mientras que las enzimas tipo I β dejan a la cadena rota girar libremente alrededor de la hebra intacta (1).

2.3.1 ADN topoisomerasas tipo I α

DTi 1 α cataliza la ruptura de una hebra de ADN, formando un complejo transitorio 5'fosfotirosina. Todas las DTi 1 α promueven una relajación parcial del ADN enrollado negativamente, no así con el positivo. Esto, probablemente, se debe a que estas enzimas requieren una región en el ADN que exponga una sola hebra. El ciclo de reacción general es dependiente de Mg²⁺ (11).

2.3.2 ADN topoisomerasas I β

Las DTi 1 β no tienen similitud en secuencia ni estructura con DTi 1 α . Usan un mecanismo distinto para relajar el ADN, que a diferencia de DTi 1 α , pueden relajar superenrollamientos positivos y negativos. Aunque el paso de ruptura implica una química similar que la usada por DTi 1 α , la relajación del ADN no requiere Mg²⁺ y la polaridad del complejo covalente es diferente.

La relajación ocurre por un mecanismo denominado "mecanismo de rotación controlada" (13), dado que la hebra con el extremo 5'OH es libre de girar antes de ser religada. Las

DTi 1 β son ubicuas en células Eucariotas y representan la mayor actividad de topoisomerasa. Dos diferentes DTi 1 β están presentes en vertebrados, una localizada en el núcleo y otra, en mitocondria (14).

2.3.3 Topoisomerasa V

El único miembro de una nueva familia de topoisomerasas I (familia IC) fue inicialmente encontrada en *Methanopyrus.kandleri* (Archaea), creciendo óptimamente alrededor de 100 a 105 °C. DTi V es una enzima grande (arriba de 100 KDa), siendo inicialmente clasificada como una enzima tipo I β , por su capacidad de relajar superenrollamientos positivos y negativos en ausencia de cationes divalentes (15) sin embargo, DTi V no muestra similitud en secuencia con otras DTi 1 β . La actividad de DTi V es óptima entre 70 y 90 °C.

2.4 ADN topoisomerasa tipo II

Las ADN topoisomerasas tipo II introducen rupturas en la doble cadena en un ADN dúplex, forzando el paso de otro dúplex a través de la ruptura (10). La ruptura del ADN, el almacenamiento de energía y las reacciones de religación son químicamente similares a las topoisomerasas tipo I, con la formación de la unión fosfotirosilo entre el ADN y la enzima. Sin embargo, en las DTi tipo 2, las dos cadenas del ADN dúplex son rotas en una reacción concertada. En tanto que las DTi 1 pueden unirse al extremo 5' (DTi 1 α) o al extremo 3' (DTi 1B y 1C), todas las DTi 2 se unen transitoriamente al extremo 5' del ADN. En la figura 3 se resumen las actividades de las diferentes familias de Topoisomerasas. Además, a diferencia de las DTi 1, todas las DTi 2 son dependientes de ATP y son multiméricas presentando una simetría idéntica.

Todas las DTi 2 pueden, desencadenar, formar y/o remover nudos en ADN dúplex circular y alterar la superhelicidad del ADN relajando superenrollamientos positivos o negativos. La girasa, una topoisomerasa II α en bacterias, parece ser la única que puede superenrollar negativamente un ADN dúplex covalentemente cerrado (16).

Las DTi 2 son esenciales en todas las células para llevar a cabo la segregación cromosómica, después de la duplicación del ADN y antes de la división celular, siendo algunas de ellas blancos terapéuticos para el tratamiento contra el cáncer. Las DTi 2 están organizadas dentro de dos familias, Topoisomerasa II α y II β . (7)

2.4.1 ADN Girasa.

Las girasas son las únicas topoisomerasas que introducen superenrollamientos negativos en moléculas de ADN relajadas o superenrolladas positivamente. La actividad única de las ADN girasas es debida probablemente a su habilidad de atrapar ADN alrededor de su dominio C-terminal (CTD), realizando de esta forma un superenrollamiento negativo, un fenómeno conocido como apresamiento quiral (17). Una secuencia conservada de siete aminoácidos en todas las girasas es esencial para el atrapamiento quiral del ADN alrededor de la girasa (18).

Las ADN girasas se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias y, en consecuencia, la mayoría de las bacterias cuentan con cromosomas y plásmidos superenrollados negativamente. Los pasos de iniciación en la replicación y la correcta expresión de varios promotores en bacterias requieren el superenrollamiento negativo para facilitar la apertura de la doble hélice. Por estas razones, las girasas son enzimas esenciales y sus inhibidores, tales como los derivados de las quinolonas, son poderosos antibióticos.

2.4.2 DTi IV

Al igual que la girasa, DTi IV es sensible a los mismos grupos de inhibidores, como lo son las familias de quinolonas y cumarinas (19). Sin embargo, estas enzimas son mecanísticamente diferentes, dado que DTi IV no tiene actividad de superenrollamiento negativo. La principal diferencia entre la girasa y la DTi IV reside en su CTD. Aunque DTi IV puede unir ADN en su CTD, esta no puede realizar el atrapamiento quiral, explicando la falta de actividad de girasa de esta enzima. La estructura de la región CTD de DTi IV ha sido descrita como la “forma rota o truncada” de la región CTD de la girasa, sugiriendo que esta enzima evolucionó a través de la ablación del gen completo de una ADN girasa (20).

2.4.3 ADN Topoisomerasas II Eucariotas

En contraste con la DTi α bacteriana, la DTi 2α eucariótica es homodimérica. Mientras que, eucariotas inferiores como levaduras y *Drosophila* codifican un sólo tipo de DTi 2, las especies vertebradas expresan dos formas de DTi 2: α y β (9). Estas enzimas muestran un alto grado de homología en secuencia (70%), sin embargo, difieren en sus masas moleculares (170 vs.180 kDa, respectivamente) y son codificadas por genes separados. A

pesar de sus similitudes, las dos enzimas tienen distintos patrones de expresión y funciones fisiológicas diferentes en células de vertebrados (Fig. 3, 7)

Al igual que DTi IV, DTi 2 no tiene actividad de girasa. Las DTi 2 albergan una región CTD ampliamente variable, que no guarda similitud en secuencia con las regiones CTD en bacterias. La región CTD de DTi 2 es blanco de eventos de fosforilación que regulan su actividad (11). DTi 2 es esencial en todos los Eucariotas, ya que es la única enzima que puede desconcatenar ADN, un evento esencial para la correcta segregación cromosómica (21).

Adicionalmente, DTi 2 puede cooperar con DTi 1 β en relajar los superenrollamientos positivos producidos por la horquilla de duplicación o durante la formación de los nucleosomas (22). DTi 2 es blanco de importantes agentes antitumorales en Eucariotes, como la m-AMSA o las epipodofilotoxinas, que atrapan a la enzima covalentemente unida al extremo 5' del ADN roto. La DTi 2 α es esencial para la supervivencia de células crecientes activamente, presentando concentraciones incrementadas durante periodos de proliferación celular. Los niveles de DTi 2 α se incrementan durante el ciclo celular, alcanzando su nivel máximo en la transición de G2/M, estando estrechamente asociada con los cromosomas durante la mitosis (13,23). Con estas observaciones se manifiesta que la DTi 2 α es la isoforma que funciona en procesos que dependen del crecimiento celular, como la replicación y la segregación cromosómica (7,12).

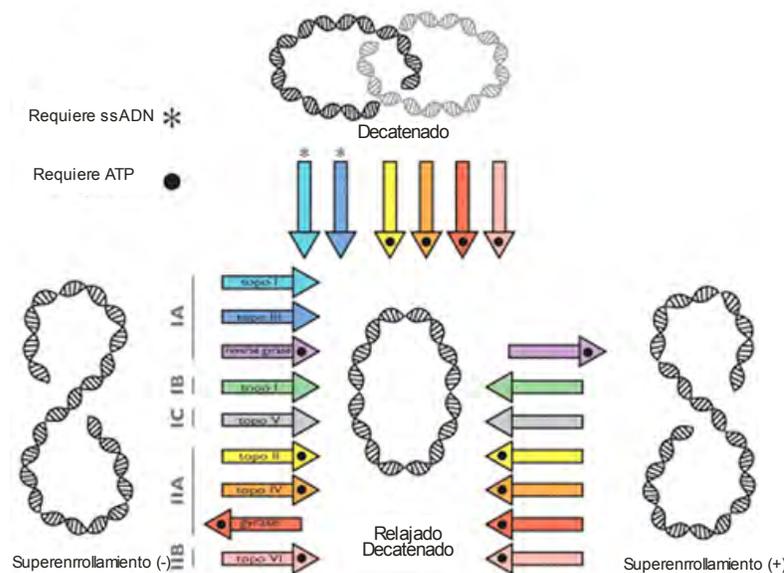


FIGURA 3. Actividades de las ADN topoisomerasas.

Miembros de los cinco tipos de familias de DTi se representan como flechas indicando sus actividades etiquetadas a la izquierda. Las DTi son capaces de relajar superenrollamientos negativos (de la izquierda al centro), relajar superenrollamientos positivos (de la derecha al centro), decatenados de ADN entrecruzado (de arriba al centro) e introduciendo enrollamientos positivos o negativos (del centro a la derecha o izquierda). El requerimiento de ATP como cofactor o la presencia de ADN de una sola cadena son indicados. (Schoeffler AJ, Berger JM. 2008. DNA topoisomerasas: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. Quarterly Reviews of Biophysics. 41, 41–101)

En contraste, la expresión de la isoforma β es independiente del estado proliferativo. La DTi 2 β no puede compensar la pérdida de DTi 2 α en células de mamíferos (9).

2.5 Análisis estructural de DTi 2.

El modelo empleado para muchos estudios estructurales ha sido principalmente la DTi 2 de levadura. Sin embargo, las DTi 2 eucariotas están ampliamente conservadas, por lo que los puntos de vista estructurales de DTi 2 de levadura son también aplicables a la DTi 2 humana.

El ensamblaje cuaternario de las DTi 2 α produce al menos tres puertas que unen dos cavidades separadas en la enzima. La puerta N terminal (llamado dominio N o puerta ATP) está formada por dos elementos: un sitio de unión e hidrólisis de ATP y una región adyacente llamada “dominio transductor” (24).

El dominio N-terminal de la región ATPasa consiste en un dobléz llamado GHKI que es encontrado en una gran variedad de ATPasas, tales como la girasa, HSP90, la histidina cinasa y MutI (5). Después de la hidrólisis de ATP y la liberación de ADP y fosfato inorgánico, la dimerización en la región N-terminal se vuelve inestable.

El dominio transductor señala desde la unión de ATP a la región de ruptura de ADN. Tal parece que la región transductora sufre un cambio en su posición cuando se une ATP, provocando otros cambios conformacionales en la región de ruptura. Es importante destacar que el dominio transductor contribuye con aminoácidos que participan en la unión de ATP y la hidrólisis del mismo.

El dominio transductor contiene una rara conexión cruzada α/β que gira a la izquierda, la cual se cree transmite señales de la puerta N a la puerta central, a la región en la que el ADN se une para ser cortado (llamada puerta ADN (25)). La puerta ADN está formada por un dominio TOPRIM y un dominio WHD similar al tipificado en la proteína activadora del catabolismo.

El dominio WHD alberga la tirosina catalítica y coopera con el dobléz TOPRIM para romper el ADN, generando un par de cortes 5' separados entre sí por 4 pares de bases (26). Adyacente al dominio WHD hay un dobléz α/β denominado “hombro” o “torre” que también participa en la unión al ADN. De la torre se extiende un espiral enrollado con un

pequeño dominio globular que forma una tercer interfase de la proteína: la puerta C (Fig.4)

El dominio C-terminal de la proteína no está conservado entre las DTi 2 de diferentes especies, siendo diferente también entre DTi 2 α y DTi 2 β . El tamaño y flexibilidad de la DTi 2 ha impedido la determinación de la estructura completa de la enzima, por tanto, mucha de la información estructural ha sido obtenida a partir de la cristalización de porciones separadas de la proteína.

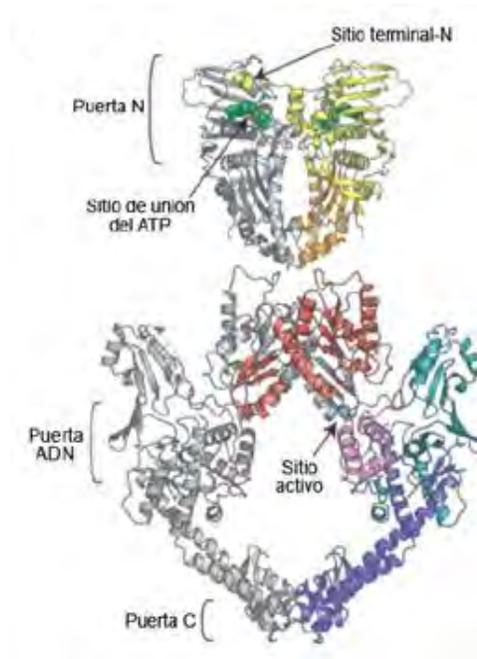


FIGURA 4. Estructura y dominios principales de DTi 2. Las regiones ATPasa, de unión al ADN y de ruptura del ADN están presentes en DTi 2 de *S. cerevisiae* y en la Girasa de *E.coli*. La mitad de cada dímero está representado en gris por claridad. El dominio GHKL y el dominio transductor están mostrados en amarillo y naranja (topo II PDB ID 1PVG). Las moléculas de ADP están mostradas como esferas verdes. Los dominios TOPRIM, hélice alada, hombro o torre y el espiral enrollado están mostrados en rojo, púrpura, verdiazul y azul respectivamente (Dti 2: PDBID1BGW; gyrase (inset): PDB ID 1AB4) Las tirosinas catalíticas (Y) son mostradas como esferas color cian. (Nitiss JL. 2009. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. Nature Reviews. 9, 327-337)

La enzima asume dos conformaciones diferentes: parecida a una abrazadera abierta en la ausencia de ATP y cerrada en presencia de ATP. La conformación abierta puede unir dos segmentos de ADN, formando el precomplejo de ruptura. Uno de estos segmentos será roto por la enzima (segmento G) y el otro será transportado (segmento T).

Posteriormente, dos moléculas de ATP se unen provocando la dimerización de los dominios ATPasa y por tanto un cambio en la conformación de la abrazadera abierta a su forma cerrada (Fig.5). Inmediatamente toman lugar las reacciones que rompen ambas

cadena del segmento G generando el complejo de post-ruptura. Esto permite el paso del segmento T a través del hueco producido, requiriendo la hidrólisis de una molécula de ATP. El extremo roto del segmento G es ligado y la molécula de ATP restante es hidrolizada. Tras la disociación de las dos moléculas de ADP, el segmento T es transportado a través de la apertura en la región C terminal de la enzima, siendo entonces cerrada. Finalmente la enzima regresa a su conformación abierta, liberando el segmento G.

La relajación y remoción de nudos se produce cuando el segmento-T y el segmento G pertenecen a la misma molécula de ADN, mientras que la decatenación se produce cuando el segmento-T y el segmento- G corresponden a ADN de doble cadena de moléculas diferentes (9).

La estructura exhibe muchas características consistentes con un modelo de dos puertas, especialmente en la región C-terminal que probablemente representa el punto de salida del segmento T.

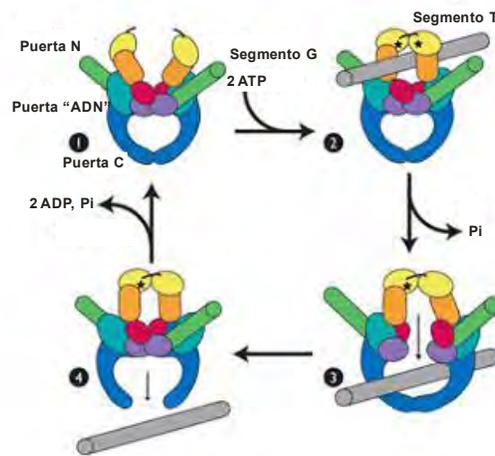


FIGURA 5. Modelo de dos puertas de DTi 2. Los dominios tienen el mismo patrón de color que en la Fig. 4. La enzima primero se une al segmento G en la puerta de ADN (1). La unión de ATP (estrellas negras) en cada dominio GHKL cierra la puerta N, capturando un segmento T (2). La hidrólisis de un ATP y la liberación de fosfato inorgánico ocurren concomitantemente al paso del segmento T a través de la puerta de ADN (3). El ATP restante previene la apertura de la puerta N y el escape del segmento T. Una vez que se religa el segmento G, la puerta C se abre, permitiendo al segmento T salir de la enzima (4). La hidrólisis del ATP restante abre la puerta N, reiniciando el ciclo para otra ronda de paso de hebra. (Schoeffler AJ, Berger JM. 2008. DNA topoisomerasas: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. Quarterly Reviews of Biophysics. 41, 41–101)

Se ha visto que el dominio C-terminal es vital para la viabilidad celular, sin embargo, a pesar de que esta región sufra mutaciones la enzima mantiene su actividad *in vitro*, por lo cual, se estima que la naturaleza de la región C-terminal de la enzima está relacionada con su regulación. La fosforilación es la principal forma de regulación en DTi 2 humanas.

Algunas de estas fosforilaciones son específicas en el ciclo celular y se ve estimulada durante la mitosis la fosforilación de los aminoácidos S1354, S1357, S1364 y T1366, por otro lado los residuos T1259, S1273, S1270 y S1267 son fosforilados en G1. Muchos estudios han vinculado la fosforilación a eventos mitóticos, siendo la fosforilación de aS1212 exclusiva de la mitosis (27).

Adicionalmente, se sabe que DTi 2 sufre modificaciones por sumoilación en metafase y se propone que son esenciales para la cohesión centromérica (28). Una característica encontrada en el dominio C-terminal de las DTi 2 son las secuencias de localización y exportación nuclear (NLSs y NESs respectivamente). Sin estas señales, la enzima no es capaz de ingresar al núcleo, perdiendo su función esencial durante la duplicación del ADN.

2.6 Ciclo catalítico de Topoisomerasa II

Como se mencionó en el apartado anterior, las topoisomerasas humanas funcionan como homodímeros interconvirtiendo diferentes formas topológicas de ADN por una “reacción de paso de doble cadena de ADN”. Durante el evento de ruptura, DTi 2 se une covalentemente al extremo 5´ recién generado. Este complejo Enzima- ADN es conocido como “complejo de ruptura”.

DTi 2 requiere de dos requerimientos esenciales para llevar a cabo la actividad catalítica en su ciclo de reacción. Primero, se necesita un catión divalente para todos los pasos más allá de la unión del ADN a la enzima. Evidencia reciente indica que la DTi 2 humana utiliza un mecanismo de “dos iones metálicos” en que uno de los iones se une al oxígeno 5´ del enlace a escindir (Fig. 6, 29). Esta interacción acelera notablemente la velocidad de ruptura mediada por la enzima y muy probablemente es utilizada para estabilizar la salida del extremo 3´OH. La función del segundo ión metálico no es clara, sin embargo, se cree que puede realizar contactos importantes con el sitio activo de tirosinas pudiendo estabilizar la transición del ADN y ayudando a desprotonar la tirosina del sitio activo. El Mg^{2+} parece ser el catión divalente que la enzima usa *in vivo*.

Segundo, DTi 2 usa la energía del ATP para impulsar la reacción general del paso de hebra de ADN. El ATP no es requerido para las funciones de ruptura-ligación, la unión de este nucleósido promueve la translocación del ADN a través de la puerta formada por la ruptura del enlace fosfodiéster. Normalmente, las DTi 2 unen dos moléculas de ATP por

ciclo de reacción. La hidrólisis de ambas moléculas de ATP es necesaria para completar el ciclo catalítico de la enzima (30).

Las puertas de la proteína descritas anteriormente regulan el paso del ADN por un mecanismo general de dos puertas. El modelo plantea que al menos dos interfases proteicas controlan el acceso a la cavidad central.

Primero, la DTi 2 se une a un segmento de doble cadena llamada “puerta” o segmento G, el cual será roto. La unión toma lugar en la puerta de ADN, dentro de la autollamada “reunión de ruptura” (31).

Después, la DTi 2 se asocia con un segundo segmento de ADN (segmento T). La asociación de la enzima con ATP induce la dimerización de los motivos GHKL, cerrando la puerta N alrededor del segmento T. La hidrólisis de una molécula de ATP a ADP y la liberación del fosfato resultante produce un cambio conformacional en la enzima provocando la apertura de la puerta de ADN (30).

Dado que DTi 2 inicia la ruptura del ADN por un ataque nucleofílico del sitio activo de tirosinas en el fosfato de los ácidos nucleicos (Figura 6), la reacción de transesterificación resultante provoca la formación de un enlace covalente fosfotirosilo que une la proteína al recién generado extremo 5' de la cadena del ADN. Esto también genera una fracción 3' OH en el término opuesto de la cadena de ADN recién rota.

De esta forma, DTi 2 genera moléculas rotas de ADN con cuatro bases de extremos cohesivos, cada una unida a la enzima covalentemente, generando un espacio a través del cual pasará la hebra intacta. (32).

Los complejos DTi 2-ADN normalmente tienen vidas muy cortas y son fácilmente reversibles. Ya en el equilibrio ruptura/ligación se favorece enormemente la ligación. Bajo condiciones de equilibrio 0.5 a 1 % de las DTi 2 en una reacción de escisión existen como complejos de ruptura (5).

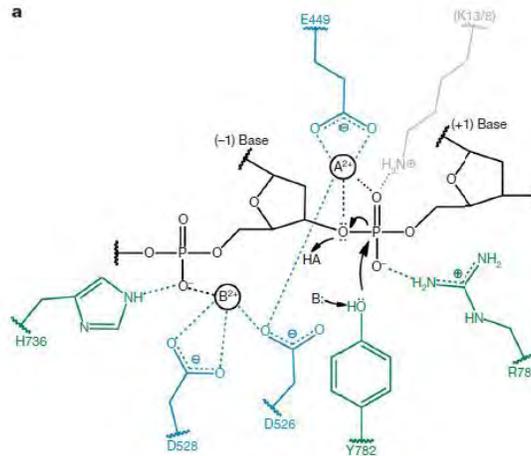


FIGURA 6. Modelo de ruptura por dos iones metálicos en el sitio activo. (Schmidt BH, Burgin AB, Deweese JE, Osheroff N, Berger JM. 2010. A novel and unified two-metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerasas. *Nature*. 465. 641-645)

Es de notar que la estructura química del ADN religado es idéntica al sustrato original, sólo las propiedades topológicas de la doble hélice son alteradas por acción de la enzima.

2.7 Funciones biológicas de DTi 2

2.7.1 Duplicación

La replicación semiconservativa involucra la separación de la doble hélice del ADN y el copiado de ambas cadenas. En ausencia de la actividad de DTi 2, la apertura de la doble cadena produciría la acumulación del superenrollamiento positivo frente a la horquilla de duplicación. Además de la generación de superenrollamientos frente a la horquilla de duplicación, el superenrollamiento positivo puede isomerizarse mediante la migración de los enrollamientos, atrapando las dos hebras recién replicadas (Fig. 8). Esta estructura llamada preconcatenado, es sustrato también de DTi 2, y representa un mecanismo plausible para la acción de estas enzimas durante la elongación de la doble cadena durante la duplicación (33).

Estudios durante la duplicación de ADN en bacterias proveen clara evidencia de la formación de preconcatenados (34) siendo probable que este mecanismo también se presente en células eucariotas.

En las partes finales de la fase S, cuando las dos horquillas de duplicación coinciden una con otra, no existe el suficiente espacio para que DTi 1 pueda relajar los superenrollamientos positivos, aunado a que la terminación de la duplicación produce

encadenamientos entre ambas cromosomas. Este dímero concatenado requiere de DTi 2 para su correcta separación (Fig. 3).

Usando una mutante condicional, temperatura sensible, es posible tener células desprovistas de DTi 2. Estas células son capaces de completar la duplicación, pero no la decatenación de los cromosomas, perdiendo viabilidad en la mitosis. Es decir, en completa ausencia de la DTi 2, la duplicación del ADN puede ser completada, dejando como productos finales de reacción cromátidas hermanas concatenadas o encadenadas una a otra (35). Muchos tipos celulares pueden ser recuperados y cultivados de un ratón knockout homocigoto a DTi 2 β , por lo que se considera poco probable que DTi 2 β tenga una función crucial durante la duplicación (36).

Análisis bioquímicos de DTi 2 α han mostrado que esta proteína es más activa relajando superenrollamientos positivos que relajando superenrollamientos negativos. Dado que el superenrollamiento positivo es generado por la horquilla de duplicación, se sugiere que DTi 2 α tiene una función importante en algún punto a lo largo de la duplicación.

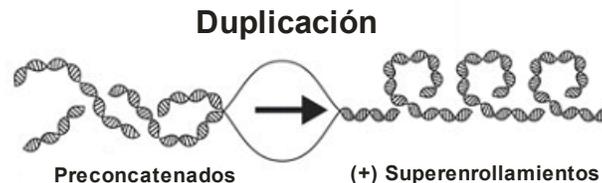


FIGURA 7. Acumulación de superenrollamientos y formación de preconcatenados durante la replicación. Durante la replicación, enrollamientos positivos se pueden acumular enfrente de la horquilla de replicación, mientras que los cromosomas resultantes quedan enredados detrás de él. (Schoeffler AJ, Berger JM. 2008. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. Quarterly Reviews of Biophysics. 41, 41–101)

2.7.2 Segregación de los cromosomas.

Aunque el encadenamiento de los cromosomas replicados es presentado como un problema, la generación de cromátidas hermanas encadenadas puede contribuir a la adecuada segregación de los cromosomas duplicados (35). Después de la duplicación, las cromátidas hermanas deben permanecer juntas hasta la mitosis. La separación temprana produce una transmisión cromosómica inexacta. Aunque los primeros modelos de cohesión de cromátidas hermanas han puesto a los concatenados en un papel importante en el mantenimiento de la cohesión, subsecuentes estudios han mostrado que hay complejos proteicos llamados cohesinas que son esenciales para mantener las

cromátidas hermanas unidas (37). Sorprendentemente, aunque se produzcan mutaciones en estas proteínas (provocando una disminución en la cohesión), un grado de unión se mantiene evidente (38). Una posible explicación para estos resultados es que la cohesión puede ser mantenida con los concatenados, representando éste uno de muchos mecanismos.

El programa preciso que implica la decatenación de los cromosomas probablemente requiere que DTi 2 actúe en regiones específicas del cromosoma siguiendo un proceso muy preciso en su acción.

La localización de DTi 2 en regiones específicas del cromosoma, se basa en interacciones proteína-proteína y en modificaciones postraduccionales de DTi 2. Estudios recientes han observado la localización de DTi 2 α en regiones centroméricas del cromosoma (39, 40). La habilidad para depletar isoenzimas de DTi 2 en sistemas que son susceptibles de análisis citológicos han sido cruciales para evaluar cuando y donde actúa la enzima durante la mitosis.

Por ejemplo, células S2 de *Drosophila melanogaster* con ARNi dirigidos en contra de DTi 2 muestran falla en la separación cromosómica, localización anormal de los brazos de los cromosomas y falla en establecer la unión anfitélica de los *kinetocore* (41).

2.7.3 DTi 2 y estructura de los cromosomas

Estudios indican que DTi 2 juega un rol clave en la estructura del cromosoma y en su condensación (42). Usando procedimientos específicos de extracción se ha identificado el andamiaje de los cromosomas, el cual incluye DTi 2 α y un complejo proteico denominado condensinas (43).

DTi 2 de mamíferos y presumiblemente la isoforma α es una de las principales proteínas no histonas de los cromosomas en metafase. La colocalización de DTi 2 con una proteína llamada Barren está involucrada en la condensación cromosómica (43).

2.7.4 Función de DTi2 en Transcripción

En levaduras, la pérdida de alguna de las topoisomerasas no bloquea la duplicación o la transcripción, pero ambos procesos son fuertemente inhibidos si ambas actividades enzimáticas se encuentran ausentes (44).

Se ha descrito un modelo interesante en la generación de los superenrollamientos durante la transcripción, en el cual la ARN polimerasa produce superenrollamiento positivo frente a la maquinaria de replicación y negativo tras él (Fig. 9). La generación de superenrollamientos podría exacerbarse por la presencia de cromatina (45). El modelo de superenrollamiento transcripcional provee una importante base para el requerimiento de una topoisomerasa durante la elongación transcripcional como ya se había descrito.

Trabajos recientes han mostrado evidencia de una función específica de DTi 2 β como iniciador de la transcripción en mamíferos. Ju y colaboradores usaron técnicas de inmunoprecipitación de cromatina para demostrar que DTi 2 β localiza en los promotores de genes cuya expresión es activada por receptores de hormonas nucleares (46).

La importancia de este descubrimiento es que establece un rol específico en cuanto a la actividad de las topoisomerasas tipo II en la regulación transcripcional. Usando análisis de microarreglos, se determinó que, aproximadamente 1-4% de los genes muestran cambios de expresión en ratones DTi 2 β -/- . (47)

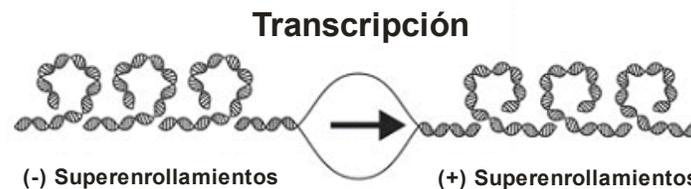


FIGURA 8. Formación de superenrollamientos durante la transcripción. Durante la transcripción, los superenrollamientos positivos se pueden acumular en frente del sistema transcripcional, mientras que enrollamientos negativos se acumulan detrás de él. La flecha indica la dirección de progresión de la RNA polimerasa. (Schoeffler AJ, Berger JM. 2008. DNA topoisomerasas: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. Quarterly Reviews of Biophysics. 41, 41-101)

2.7.5 Checkpoint para asegurar la correcta función de DTi 2

Eventos clave en la progresión a través del ciclo celular son monitoreados a través de una serie de puntos de revisión (*checkpoints*). En los *checkpoints* se evalúa la integridad de eventos cruciales durante el ciclo celular, como la terminación completa de la duplicación del ADN y la presencia de un huso mitótico apropiado (48). Como DTi 2 lleva a cabo una reacción que es esencial para la separación de los cromosomas en la mitosis, una hipótesis plausible es que las células puedan monitorear la exitosa actividad de la decatenación en las cromátidas hermanas y arrestar el progreso del ciclo celular, si el desencadenamiento (o la condensación cromosómica) es incompleta.

La demostración de que las bisdioxopiperazinas son inhibidores catalíticos específicos de DTi 2 (49) permitió realizar pruebas en células eucariotas sobre la participación de DTi 2 en el *checkpoint* G2/M.

Se ha encontrado que bisdioxopiperazinas como ICRF-187 así como ICRF-193 son capaces de producir un retraso en la entrada a mitosis (50). Trabajos posteriores demuestran que el aplazamiento mitótico es dependiente del gen ATR (*ataxia telangiectasia* y *Rad3-related*) y BRCA1 (51), pero aparentemente independiente del daño al ADN.

Una completa eliminación de DTi 2 no impide la entrada a mitosis en células de levadura (52), mientras que la expresión de una DTi 2 inactiva sí. Este descubrimiento va de acuerdo con una serie de experimentos previos en los que células cargando una DTi 2 sensible a temperatura fallan en arrestar el ciclo en mitosis, por lo que se propone que la presencia de DTi 2 es necesaria para producir el arresto del ciclo celular en G2/M (53). En células de mamífero, es un punto de controversia si el retraso mitótico es dependiente de la enzima. La remoción de DTi 2 usando un sistema condicional de apagado por tetraciclinas (tetracycline-off system) muestra que la pérdida de DTi 2 promueve un retraso mitótico. En contraste, en células desprovistas de DTi 2 usando ARNi no se ha mostrado retraso alguno (54).

DTi 2 interactúa con la proteína MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein-1*) (55), importante en la respuesta al daño al ADN. La fosforilación en S1524A de la DTi 2, es requerida para su interacción con MDC1. Interesantemente, células expresando una mutación en este sitio son defectuosas en el arresto del ciclo celular inducido por bisdioxopiperazinas (55).

El *Checkpoint* inducido por las bisdioxopiperazinas es llamado punto de revisión por decatenación, pero podría ser más acertado llamarlo "Checkpoint DTi 2" (36), aunque no es muy claro aún como la célula evalúa la decatenación de las cromátidas hermanas.

2.8 Selectividad en el transporte de ADN con cromatina.

Una vez que la DTi 2 está unida al segmento G, el transporte de ADN depende sólo de la probabilidad de encontrar un segmento T potencial apropiadamente localizado cerca de la puerta N de la enzima (56). Para moléculas desnudas de ADN en solución, dicha probabilidad de yuxtaposición es determinada por la configuración global del dúplex.

Aunque los problemas topológicos dentro de la célula son equivalentes a los planteados *in vitro*, la dinámica conformacional del ADN es determinada por un complejo conjunto de variantes envolviendo múltiples interacciones moleculares. Por ejemplo, aunque en levadura ambas DTi 1 y 2 son capaces de relajar plásmidos minicromosómicos, estudios *in vitro* revelan que DTi 2 relaja ADN nucleosómico más rápido que DTi 1 (57).

Aparentemente, el mecanismo de acción de DTi 2 es facilitado por los nucleosomas, dado que podrían favorecer la yuxtaposición de los segmentos de ADN, mientras el mecanismo de rotación de cadena de DTi 1 podría ser inhabilitado por las barreras impuestas en la organización de los nucleosomas. Por una parte, la yuxtaposición podría estar favorecida cuando el ADN está más plegado. Por otra parte, el número de segmentos disponibles para la manipulación del ADN por la DTi 2 se reduce si más proteínas recubren el material genético.

Se considera que existen tres tipos de yuxtaposiciones del ADN que podrían ocurrir en una ambiente intracelular, cada uno produciendo respuestas diferentes en el transporte del ADN por DTi 2. El primer tipo de yuxtaposición es el impulsado por la configuración topológica. Este es el caso de los preconcatenados y concatenados generados entre las dobles hebras de ADN recién duplicadas, así como los superenrollamientos producidos frente y tras los complejos de duplicación y transcripción. Estas complejidades estructurales son totalmente removidas por DTi 2 *in vivo* (9).

Además, la decatenación es más eficiente en superenrollamientos positivos que negativos en ADN circular (58). Estas preferencias sin embargo, no se pueden aplicar en ADN intracelular a menos que los dúplex recién duplicados estén superenrollados. Quizás estas configuraciones observadas *in vitro* son producidas por un camino diferente en la arquitectura de la cromatina en los concatenados post replicativos *in vivo*.

Se sabe que DTi 2 puede relajar tensión helicoidal positiva en arreglos nucleosómicos nativos casi a la misma velocidad que en el ADN desnudo (20). Estudios recientes indican que la tensión helicoidal positiva conduce a una translocación quiral de los nucleosomas en una conformación metaestable (reversoma) en la cual los dímeros H2a-H2b y el tetrámero H3-H4 se pliegan a una forma dextrógira capaz de ser utilizada por la DTi 2 en su actividad catalítica (Figura 4a 59).

El segundo tipo de yuxtaposición es el forzado por el hacinamiento molecular del ADN intracelular. Simulaciones por computadora de las cadenas de ADN en altos niveles de condensación o en un volumen confinado predicen que la configuración dúplex podría equilibrarse con muchos nudos y concatenados (60). El equilibrio podría ser favorecido por la DTi 2 transportando segmentos al azar de ADN, aunque es muy poco probable que ocurra *in vivo*.

El tercer tipo de yuxtaposición es el producido por las interacciones ADN -proteína. La yuxtaposición de segmentos cercanos de ADN intermolecular es común en la cromatina eucariótica. El ajuste del ADN alrededor de las histonas atrae segmentos de ADN en cercana proximidad (Fig.7 A). Otro tipo de proteínas que interactúan con el ADN pueden atraer regiones circundantes a través de enrollar o enroscar el dúplex (Fig.7 B).

La cuestión aquí es si la porción de estas yuxtaposiciones (que no se rigen por el estado topológico del ADN) podrían producir pares efectivos de segmentos T y G.

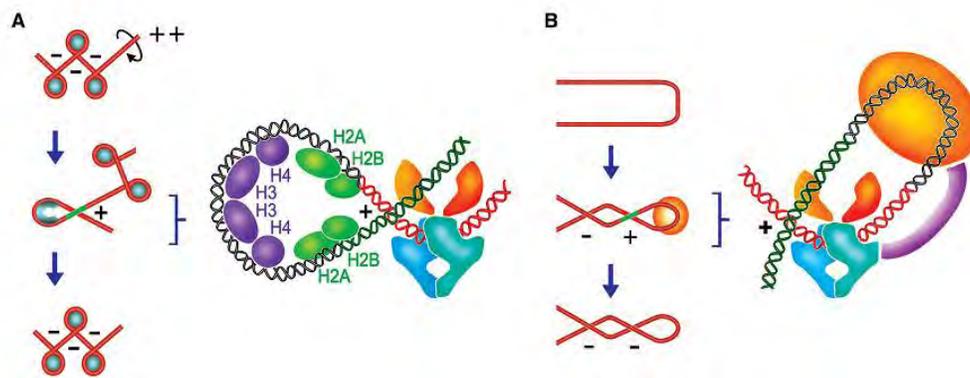


FIGURA 9. Yuxtaposición de segmentos de ADN forzada por la arquitectura de la cromatina. A) El ADN al ser sujeto a una tensión positiva provocaría que los nucleosomas se acomoden en una conformación metaestable en la que los dímeros H2A-H2B y el tetramero H3-H4 se reorganizarían en una configuración que permitiera la unión y actividad de la enzima. La entrada y salida de segmentos de ADN de esta conformación nucleosómica produciría configuraciones ideales de ADN capaces de ser reconocidas por DTi 2. El transporte de ADN podría relajar la tensión helicoidal y revertir la transición quiral del nucleosoma. Este escenario podría explicar el por qué DTi 2 relaja el ADN con cromatina tan eficientemente como el ADN desnudo. B) En ausencia de tensión helicoidal, la yuxtaposición podría llevarse a cabo por interacciones con proteínas cercanas. El transporte de ADN podría entonces resultar en superenrollamientos. La reacción podría ser análoga al de la girasa, la única diferencia radicaría en que las interacciones proteína-ADN que forzarían la yuxtaposición de un segmento T potencial serían establecidas fuera del complejo ADN-Topoisomerasa. (Roca J. 2009. Topoisomerase II: a fitted mechanism for the chromatin landscape. *Nucleic Acids Research*. 37. 721-730.)

2.9 Agentes intercalantes

Muchos fármacos anticancerígenos de uso clínico interactúan con el ADN a través de la intercalación, que puede ser definido como el proceso por el cual compuestos con

sistemas de anillos aromáticos planos o heteroaromáticos son insertados entre bases adyacentes perpendicularmente al eje de la hélice de la doble cadena (61). Dado que muchos agentes intercalantes típicos contienen tres o cuatro anillos fusionados que absorben la luz en la región UV-Visible del espectro electromagnético, son conocidos como cromóforos. Detrás del cromóforo, otros sustituyentes en la molécula intercalante pueden influenciar ampliamente el mecanismo de unión, la geometría del complejo ligando- ADN y la selectividad de la secuencia.

Para acomodar el ligando, el ADN debe sufrir cambios conformacionales que involucran un incremento en la separación vertical entre las pares de bases para crear una cavidad para el cromóforo entrante. La doble hélice, por tanto, resulta parcialmente abierta (Fig. 10, 62) lo que conduce a distorsiones en la columna vertebral de azúcar-fosfato de los ácidos nucleicos y cambios en el ángulo de giro entre las pares de bases sucesivas. Una vez que el fármaco ha sido introducido entre ambas hebras, la estabilidad del complejo es optimizado por un número de interacciones no covalentes, incluyendo fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, efectos hidrofóbicos e interacciones Pi:Pi (63).

Generalmente, las especies catiónicas son más eficientes al intercalarse ya que estos compuestos interactúan mejor con los fosfatos presentes en el ADN en los estadios iniciales y también porque la intercalación libera contraiones asociados con el grupo fosfato como el Na^+ , provocando un efecto llamado “polielectrolito”. Esta es una fuerza muy importante para provocar la intercalación, ya que disminuye las interacciones repulsivas entre las cargas muy próximas de los contraiones (62). De hecho, muchos agentes intercalantes están cargados positivamente o contienen grupos básicos que pueden ser protonados bajo condiciones fisiológicas.

La intercalación es el primer paso en una serie de eventos que eventualmente producirá sus efectos biológicos. Los cambios estructurales inducidos por la intercalación en el ADN conducen a la interferencia en el reconocimiento y función de las proteínas asociadas con el material genético como los son las polimerasas, factores de transcripción, sistemas de reparación y especialmente las topoisomerasas (Fig. 10, 63).

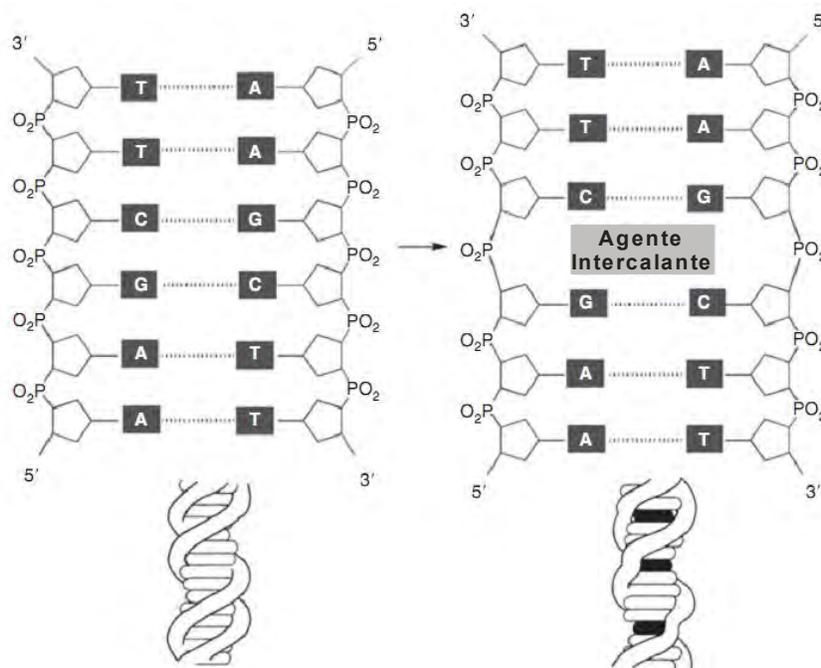


FIGURA 10. Deformación que sufre el ADN por acción de agentes intercalantes. (Avendaño C, Menéndez JC. 2008. Medicinal Chemistry of anticancer drugs, 1 Ed. 200-205)

2.10 Inhibidores específicos de DTi 1

Los compuestos que inhiben DTi 1 pueden ser divididos dentro de dos categorías: (64)

- Supresores de DTi 1, que son compuestos que inhiben la enzima pero no estabilizan el intermediario covalente ADN -DTi 1.
- Venenos de DTi 1, que actúan después de la ruptura del ADN inhibiendo el proceso de religación.

2.10.1 Camptotecinas

Este compuesto fue aislado en 1966 del árbol *Camptotheca acuminata* y su desarrollo terapéutico fue inicialmente limitado por su pobre solubilidad e inaceptable toxicidad. La identificación de DTi 1 como su blanco terapéutico ha promovido la búsqueda de análogos solubles en agua, más activos y menos tóxicos. Dentro de estos compuestos, topotecan e irinotecan son los más extensamente usados en la clínica. Irinotecan es un profármaco que requiere ser hidrolizado por la carboxilesterasa para producir el metabolito activo (64). Este profármaco es usado en cáncer colorectal, mostrando sinergismo con el cisplatino. Las camptotecinas se intercalan entre -1 a +1 bases de ADN en el complejo ternario DTi 1- ADN-inhibidor, en donde la base 1 es el nucleótido que está covalentemente unido a

DTi 1. El fármaco intercalado produce muchos contactos con la proteína a través de puentes de hidrógeno.

El complejo terciario general se estabiliza, tanto por las interacciones entre el fármaco y las bases a las que se intercala, así como las interacciones de la proteína con el fármaco (Fig.11).

Estos fármacos son específicos de fase S y, por tanto, son adecuados para tumores con alta proporción de proliferación pero inadecuados para aquellos tumores con altos números de células no ciclantes en la fase G1 como cáncer de próstata y riñón. Estos fármacos comparten el anillo de lactona de seis miembros que es esencial para la actividad.

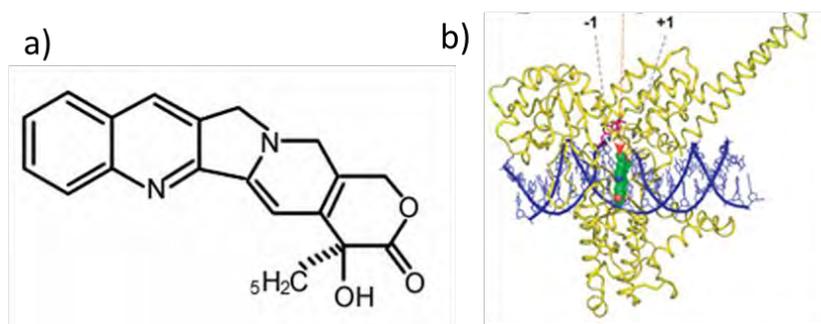


FIGURA 11. a) Estructura de Camptotecina. b) fComplejo terciario formado por DTi 1-CPT-ADN. Las camptotecinas son inhibidores que se unen reversiblemente a DTi 1, disminuyendo la capacidad de religación del ADN. Se muestra el complejo terciario con DTi 1 en amarillo, el ADN en azul marino y la Camptotecina en verde. Sirikantaramas S, Yamazaki M, Saito K. 2009. DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology and Interfacial Inhibition Proc Natl Acad Sci U S A;105:6782–6.

2.10.2 Inhibidores no Camptotecinas

Las indolocarbazolas son la clase más avanzada de inhibidores del tipo no CPT (65). Estos compuestos presentan un sistema de anillo que se encuentra presente en muchas familias de compuestos que tienen como blanco el ADN. Estos compuestos interfieren con la actividad de la DTi 1 y de algunas proteínas cinasas.

2.11 Inhibición DTi 2

Los fármacos que tienen como blanco la DTi 2 se encuentran divididos en dos grandes clases. La primer clase enumera muchos de los agentes clínicamente activos incluyendo etopósido, doxorubicina y mitoxantrona, los cuales promueven el incremento en los niveles de los complejos covalentes DTi 2-ADN. Estos compuestos generan daños que

incluyen rupturas en las hebras de ADN y proteínas covalentemente unidas al ADN, los cuales se han denominado como “venenos de DTi 2” (topoisomerase poisons). Una segunda clase de compuestos inhibe la actividad catalítica de la enzima, pero no genera incrementos en los niveles de complejos covalentes de DTi 2. Esta segunda clase de agentes se cree que mata a las células a través de la eliminación de actividades enzimáticas esenciales y son, por tanto, llamados inhibidores catalíticos (Fig. 12).

2.11.1 Inhibidores catalíticos.

Muchas clases de compuestos tienen como blanco la DTi 2 sin estabilizar los complejos covalentes. La clase más importante de estos compuestos son las bisdioxopiperazinas que incluyen a ICRF-159, ICRF-187 y MST-16. Estos fármacos tienen dos actividades: son potentes agentes quelantes y bloquean la DTi 2 en el ciclo catalítico justo después del paso de la hebra pero antes de la hidrólisis del segundo ATP (66). Las bisdioxopiperazinas tienen una modesta actividad antitumoral, siendo usadas principalmente para reducir la cardiotoxicidad cuando se usan antraciclinas. Sin embargo, son importantes herramientas para estudiar los efectos en la inhibición de DTi 2, ya que son los inhibidores más específicos que no actúan como venenos de la DTi 2.

Recientemente, un inhibidor competitivo de ATP fue sintetizado, mostrando capacidad de inhibición en ambas isoformas de DTi 2 (67). Aunque la actividad citotóxica de este compuesto no ha sido cuantificada, QAP1 puede reducir las respuestas de daño al ADN inducidas por la doxorubicina (que es un veneno de DTi 2). Agentes como QAP1 es probable que sean útiles para explorar las consecuencias celulares en la pérdida de actividad de DTi 2 y responder si la inhibición catalítica de DTi 2 es efectiva y segura en la estrategia contra el cáncer. El uso terapéutico de inhibidores catalíticos como agentes anticancerígenos está limitado a los compuestos aclarubicina y sobuzoxano.

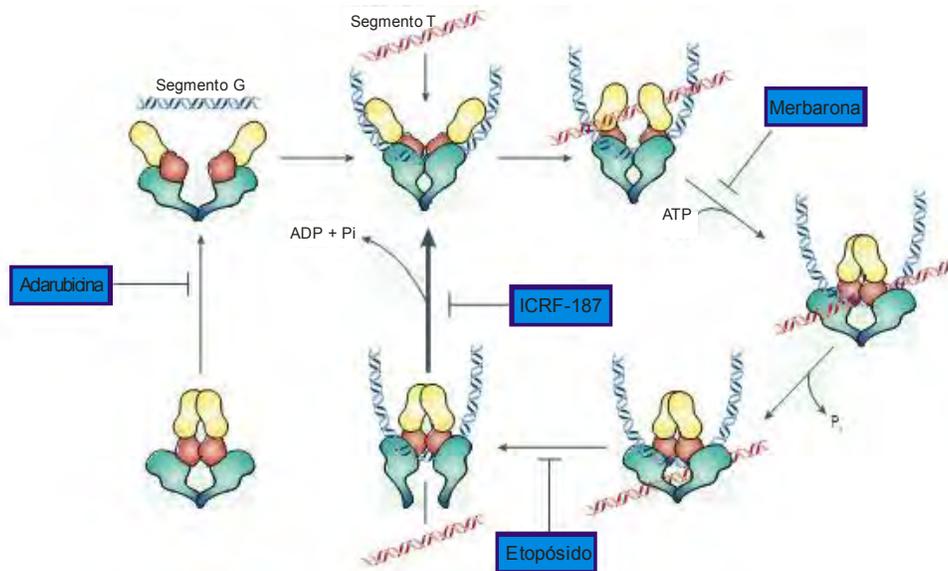


FIGURA 12. Mecanismos de inhibición de DTi 2. Topoisomerasa II puede ser inhibida en diferentes puntos del ciclo de reacción, ocasionando diversas consecuencias bioquímicas y celulares. Un simple modo de inhibición se encuentra en inhabilitar los pasos iniciales del ciclo de reacción. Por ejemplo los inhibidores competitivos de ATP previenen el paso de la cadena, no generando daño al ADN. Efectos similares ocurren cuando los inhibidores previenen la unión de la enzima a los ácidos nucleicos como la acción llevada por la aclarubicina. Agentes como la merbarona también previenen la ruptura del material genético, entrando dentro de la clasificación de inhibidor catalítico. Un segundo modo de inhibición se observa cuando el ciclo catalítico es bloqueado después de que se ha roto el ADN pero antes de su religación. Este modo de inhibición ocurre con los agentes actualmente en uso como la antraciclinas y epipodofilotoxinas (como el Vp-16). El efecto más obvio de estos inhibidores es la generación de altos niveles de complejos covalentes, interfiriendo de esta forma con muchos eventos metabólicos que involucran al ADN. Las bisdioxopiperazinas como la ICRF-187 inhiben la hidrólisis de ATP y mantienen la estructura de la enzima como una pinza cerrada. (Nitiss JL. 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy, Nature Reviews. 9. 338-350)

2.11.2 Venenos de DTi 2

Los agentes que incrementan los niveles de los complejos de ruptura son conocidos como “venenos de DTi 2”, dado que estos convierten a la enzima en una potente toxina celular. Los venenos de DTi 2 varían dramáticamente en sus propiedades de unión al ADN. Por ejemplo, el etopósido es un compuesto no intercalante que muestra una muy débil interacción con el ADN en ausencia de DTi 2 (4). Igualmente, la genisteína y las quinolonas son compuestos no intercalantes. En contraste la amsacrina, la doxorubicina y mitoxantrona (Fig. 13) son de naturaleza intercalante, siendo los últimos dos compuestos los que presentan mayor afinidad por los ácidos nucleicos.

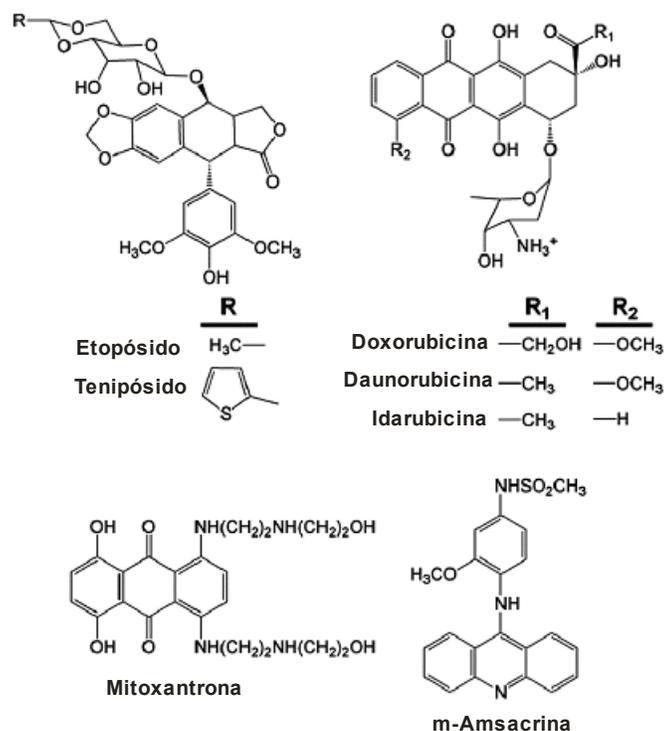


FIGURA 13. Estructura de fármacos anticancerígenos que actúan en contra de DTi 2.

Los venenos de DTi 2 incrementan la cantidad de los complejos de ruptura por dos mecanismos. El primero involucra que algunos venenos actúan inhibiendo la habilidad de DTi 2 en religar el ADN roto (5, 25). Estos agentes no sólo incrementan el nivel de los complejos de ruptura, también incrementan el tiempo de vida de estos complejos. Este tipo de inhibición ha sido denominado como inhibición de interfase, dado que el fármaco interactúa en la interfase entre la proteína y el ADN (68). En este modelo el fármaco se coloca entre las bases -1 y +1, afectando la geometría requerida para la religación después del paso de la hebra.

Esta localización de los venenos de DTi 2 fue sugerida inicialmente por un análisis de secuencias de ruptura, las cuales fueron obtenidas por el tratamiento de enzima purificada con fragmentos de ADN definidos en presencia de venenos de DTi 2. Una demostración directa para determinar el posicionamiento del fármaco, se obtuvo usando un análogo fotoactivable de la m-AMSA y DTi 2 del fago T4 (69). La DTi 2 del fago es más similar en sus reacciones y en el espectro de inhibidores a la DTi 2 eucariota que la enzima tipo II procarionta. El derivado de la m-AMSA se unió a la base 1+ en relación a la ruptura del ADN sugiriendo intercalación en el sitio de ruptura. Dado que el análogo fotoactivable de

la m-AMSA no reacciona significativamente con el ADN en ausencia de DTi 2, la enzima juega una función importante en estabilizar la unión del compuesto, promoviendo su interacción con el ADN. Aunque no se ha obtenido información directa con otros agentes intercalantes, se ha encontrado una preferencia clara en las bases de los sitios de corte, con mayor preferencia en las bases -1 y +1 (70). Estos resultados son consistentes con la presencia del intercalador en la interfase proteína-ADN, con una repercusión importante del inhibidor en cambiar la geometría de los residuos requeridos para religar la hebra rota; es probable que este modelo también se extienda a venenos de DTi 2 no intercalantes. Para venenos no intercalantes, un complejo binario fármaco-proteína podría ser importante para colocar el fármaco en el sitio donde el complejo terciario puede ser formado.

Es de hacer notar que la ruptura en ambas hebras de la doble cadena no es un requerimiento estricto para que un veneno de DTi 2 sea efectivo; la ruptura en una sola cadena puede provocar citotoxicidad también.

El segundo tipo de compuestos parecen no bloquear el paso de religación, en vez de eso generan altos niveles de complejos covalentes DTi 2-ADN estimulando el paso de ruptura (71). Este modo de acción no es explicado por el modelo de inhibición de interfase, y sugiere que algunos agentes pueden causar perturbaciones en el ADN que pueden facilitar la reacción de ruptura.

2.12 Derivados de Acridina

La Acridina es un compuesto orgánico heterocíclico estructuralmente relacionado con el antraceno, con uno de sus carbonos centrales sustituidos por un nitrógeno (Fig. 14). La acridina y sus derivados se unen al ADN y al ARN de acuerdo a su habilidad de intercalación.

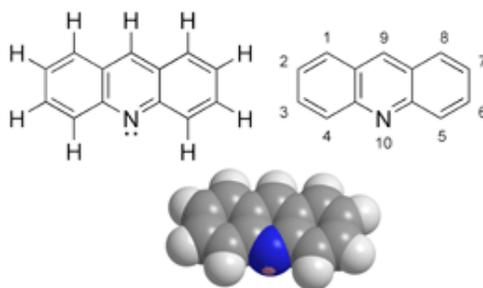


FIGURA 14. Estructura de la Acridina

El modo de intercalación de las moléculas de acridina involucra la unión de los anillos tricíclicos entre las pares de bases adyacentes en el dúplex del ADN (61). El interés en estos intercalantes ha llevado al desarrollo de la amsacrina (m-AMSA), un fármaco usado en el tratamiento de linfomas malignos y leucemias agudas no linfocíticas (72). AMSA (4'-(9-acridinilamino)-metanosulfona-manisidina) o m-AMSA es una anilinoacridina usada principalmente en el tratamiento de leucemia en niños. El principal mecanismo de acción de m-AMSA es la formación de un complejo terciario con el ADN y DTi, atrapando el complejo de ruptura e inhibiendo el paso de religación, es decir se trata de un veneno de DTi 2 clásico. Estudios de Resonancia de Raman de m-AMSA con ADN de alto peso molecular indican el modo de unión intercalante (73). Espectroscopia similar de los compuestos terciarios de AMSA con ADN plasmídico y DTi 2 muestran que la acridina se intercala al ADN por medio de interacciones Pi:Pi con las pares de bases y los anillos anilino en el surco menor de la doble cadena (Fig. 15, 73).

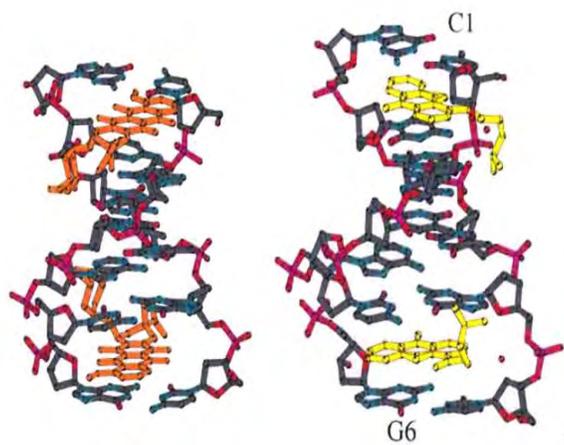


FIGURA 15. Estructura de Daunomicina (naranja) y 9 amino DACA (amarilla) intercaladas al ADN dentro de la secuencia (CGTACG) (Adams A. 2002. Crystal Structures of Acridines Complexed with Nucleic Acids *Current Medicinal Chemistry*. 9. 1667-1675)

Estudios de mutación con DTi 2 α han identificado muchos cambios en la secuencia de aminoácidos en la región codificante del gen que confiere resistencia a la m-AMSA, estos incluyen Ala642 por treonina o glicina (74), cambios en el aminoácido 824 (75), Gly437 por Ser, Arg450 por Gln y Pro 803 por Ser, esta última afectando la utilización de ATP (76).

Tras la amsacrina, un largo número de acridinas sintéticas y naturales han sido probadas como agentes anticancerígenos. Pero hasta hoy, pocas moléculas han entrado a pruebas clínicas y han sido aprobadas para quimioterapia (77).

Por ejemplo, la asulacrina es un análogo cercano a la m-AMSA con amplio espectro de actividad en tumores experimentales, pero su actividad en la clínica es inferior. DACA (XR5000) es una acridinacarboxamida que muestra inhibición mixta de DTi 1 y DTi 2 que ha sido objeto de ensayos clínicos extensos (Fig. 16). La pirazoloacridina KW-2170 es un inhibidor de DTi 2 de origen sintético que ha entrado a ensayos clínicos de fase II. Por otra parte la pirazoloacridina PD-115934 es un inhibidor dual de DTi 1 y 2 que también ha entrado a ensayos clínicos de fase II (61).

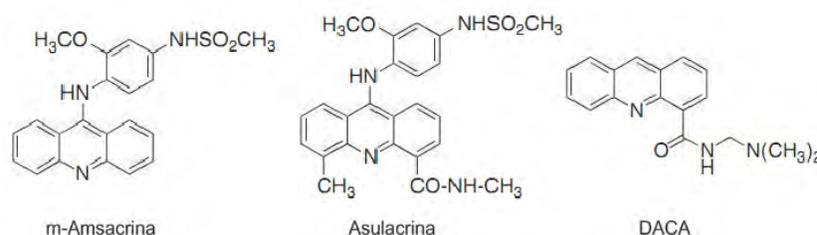


FIGURA 16 Estructura de algunos fármacos anticancerígenos derivados del núcleo de acridina.

Las razones para el amplio uso de las acridinas como agentes activos quimioterapéuticos son variadas, pero incluyen su síntesis fácil, estabilidad biológica, la habilidad para unirse eficientemente al ADN y afectar su función en las células proliferantes (78).

La m-AMSA y otros venenos de DTi 2 pueden inducir muerte celular por apoptosis, aunque los detalles de este mecanismo no son claros. No obstante, el tratamiento con m-AMSA no altera la expresión de algunos genes involucrados en la vía apoptótica (bcl2, c-jun, p53), pero si eleva el nivel de ciclina E y disminuye el nivel de mRNA de c-myc en una forma dosis dependiente (79).

2.13 Efecto del superenrollamiento en la función de la ADN topoisomerasa y la acción de los fármacos anticancerígenos.

El movimiento de los sistemas de duplicación y transcripción a través del material genético produce un sobreenrollamiento (superenrollamiento positivo) enfrente de los complejos de duplicación y transcripción (respectivamente). Por tanto, la colisión de los sistemas de duplicación/transcripción, puede contribuir a la conversión de los complejos de ruptura en quiebres permanentes y, probablemente, esto ocurre en regiones de ADN con forma superenrollada positivamente.

La geometría de los enrollamientos afecta diferencialmente la eficacia de los compuestos intercalantes y no intercalantes en contra de DTi 2. En el caso de fármacos no intercalantes como el etopósido, la geometría del superenrollamiento tiene poco efecto en la acción del fármaco. Los efectos de la geometría del enrollamiento son considerablemente diferentes con agentes intercalantes como la m-AMSA (5).

Dado que los compuestos intercalantes inducen localmente un superenrollamiento negativo en el ADN, se producen torsiones superhelicoidales positivas en regiones distales de moléculas circulares covalentemente cerradas (80). Así, cuando la concentración de los agentes intercalantes aumenta, el ADN que es topológicamente superenrollado negativamente parecería contener regiones con torsión positiva superhelicoidal.

Aunque los compuestos anticancerígenos en contra de DTi 2 actúan en la interfase ADN-Enzima, la acumulación de fármacos en la doble hélice tiene el potencial de inhibir la unión de la enzima o su actividad. La generación de superenrollamiento positivo por la intercalación produce estrés torsional en la doble hélice, por lo que la habilidad del ADN para absorber compuestos intercalantes es limitada (80).

La influencia diferencial de la geometría del ADN en la acción de fármacos intercalantes permite que estos agentes mantengan su eficacia frente a los sistemas de duplicación del ADN en un amplio rango de concentraciones. Estos aspectos de actividad farmacológica podrían contribuir al éxito clínico de agentes intercalantes como doxorubicina, mitoxantrona y m-AMSA.

2.14 DTi 2 como toxina celular.

Las células proliferantes no pueden existir sin las DTi 2, sin embargo, dado que estas enzimas generan rupturas obligatorias en la doble cadena como parte de su mecanismo de acción, estas proteínas se vuelven intrínsecamente peligrosas. Dadas estas características los complejos de ruptura son mantenidos en balances críticos (23). Cuando los niveles caen debajo de una concentración umbral, las cromátidas hermanas permanecen unidas seguidas de la replicación.

Como resultado, los cromosomas no segregan apropiadamente durante la mitosis y las células mueren por la llamada catástrofe mitótica (Figura 17). Cuando los niveles de los complejos de ruptura aumentan a niveles muy altos, las células también mueren pero por

razones diferentes. Los intermediarios de ruptura acumulados son convertidos a rupturas permanentes cuando las horquillas de duplicación o los complejos de transcripción intentan avanzar sobre la proteína covalentemente unida en el material genético (23, 5).

La colisión resultante afecta los complejos de ruptura y, finalmente, convierte las rupturas transitorias en permanentes quizá eliminando los puentes proteicos. El daño resultante y la inducción de vías de reparación y recombinación pueden provocar mutaciones, translocaciones cromosómicas y otro tipo de aberraciones (5). Cuando estas rupturas permanentes están presentes en números suficientes, las células eucariontes pueden iniciar vías apoptóticas.

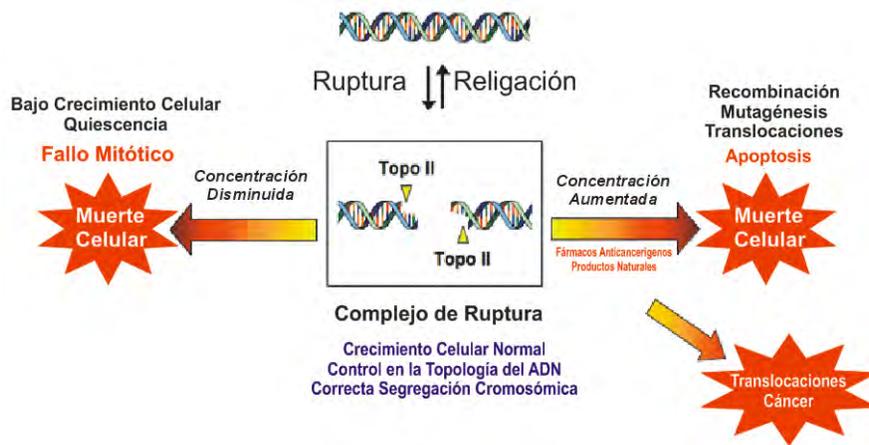


FIGURA 17. Equilibrio entre los complejos de ruptura y religación y sus efectos en el destino celular DTi 2 es una enzima esencial pero genotóxica. La formación de complejos de ruptura para que la enzima lleve a cabo sus funciones celulares normales. Si el nivel de los complejos de ruptura disminuye demasiado (Flecha a la izquierda) las células son incapaces de llevar a cabo una segregación cromosómica correcta y mueren de fallo mitótico. Si los niveles de complejos de ruptura son muy altos (flecha a la derecha), el choque con los sistemas de transcripción o replicación pueden convertir las rupturas transitorias en rupturas permanentes al material genético. Las hebras rotas resultantes así como la inhibición de los procesos esenciales del ADN inician múltiples vías de recombinación y reparación que generan translocaciones cromosómicas y otras aberraciones genómicas. Si estas rupturas se incrementan en la célula, se podrían desencadenar vías apoptóticas. Esta es la base para el tratamiento de muchos de fármacos anticancerígenos de amplio uso. Si la cantidad de rupturas es muy baja, las translocaciones cromosómicas podrían estar presentes en las poblaciones sobrevivientes. (McClendon K, Osheroff N. 2007. DNA Topoisomerase II, Genotoxicity, and Cancer. *Mutat Res.* 623(1-2): 83–97)

La DTi 1 atrapada por camptotecinas genera una ruptura de una sola cadena reversible en el ADN. Cuando la ADN polimerasa choca con un complejo covalente DTi 1-ADN, se puede generar una ruptura en la doble cadena (81). Aunque DTi 2 genera rupturas en la doble cadena en su ciclo de reacción, las dos subunidades se asocian fuertemente, al menos para enzimas eucarióticas (82). Esto probablemente produzca reacciones de procesamiento proteolíticas ó nucleolíticas que sean requeridas para eliminar el complejo covalente del material genético.

La reparación del daño producido por DTi 2 está acompañada de diversas tareas. Una exitosa reparación inicia por reconocer efectivamente al complejo de DTi 2 como un daño al ADN. La reparación por tanto requiere la remoción de la proteína que esta covalentemente unida al ADN y el resello de las rupturas en el material genético.

2.15 ATM e histona H2AX como mediadores clave en la respuesta a la ruptura de doble cadena.

Sirviendo como el transductor de señales de la vía, ATM (fosfatidilinositol-3-cinasa relacionada con ataxia telangiectasia) es rápidamente activado en respuesta al daño al ADN. Este proceso es mediado por tres proteínas que ubican el daño al ADN conocidas colectivamente como el complejo MRE11-RAD50-NBS1 o complejo MRN (83).

En respuesta al daño, cada componente del complejo MRN juega una función diferente en la activación de ATM; MRE11 se une a los extremos dañados del material genético, RAD 50 promueve la asociación de los complejos MRN cercanos uniéndolos al ADN y NBS1 interacciona con ATM (84). Estas interacciones culminan con la disociación de los dímeros inactivos de ATM en monómeros activos, autofosforilando la serina-1981 y de esta forma produciendo una ATM cinasa activa. (85).

La ATM activa coordina procesos como el arresto del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis a través de su interacción con proteínas río abajo, dependiendo del tipo de daño presente. En el caso de rupturas de doble cadena, la histona H2AX está entre los primeros sustratos susceptibles a fosforilación. (85).

La histona H2AX es una de las cuatro variantes conocidas de la histona H2A, que junto a las histonas H2B, H3, H4 y 146 pares de bases comprenden la unidad básica del nucleosoma (86). Originalmente, se pensó que H2AX facilitaba el reclutamiento de factores de reparación, sin embargo, estudios recientes revelan que juega más que una función de andamiaje, ayudando a la retención de proteínas en el sitio de daño (87). Además, otra evidencia sugiere que H2AX podría funcionar como un anclaje molecular que atrapa los extremos de ADN rotos en proximidad, facilitando la reparación (88).

2.16 Escisión nucleolítica de los aductos proteicos.

Un camino para remover los aductos en el material genético consiste en escindir la lesión por una digestión nucleolítica del complejo (89). Este tipo de reparación se ha observado

en los complejos de DTi 1 por la proteína tirosil ADN fosfodiasterasa I (Tdp1, 90). Esta enzima procesa los péptidos 3'fosfotirosil que se encuentran unidos al ADN, liberando un producto 3'fosfato. Otras enzimas nucleolíticas han sido propuestas para remover los péptidos 3'fosfotirosilo del ADN, aunque no hay evidencia bioquímica directa reportada (91-94).

Tdp1 está ampliamente conservada entre eucariotas, pero no ha sido encontrada en procariontes. Aunque la caracterización original de la Tdp1 de levadura indica una aparente especificidad para la remoción de enlaces 3'fosfotirosil del ADN (94), se encontró que mutantes de Tdp1 en levadura fueron hipersensibles a etopósido. La Tdp1 humana purificada es capaz de remover también péptidos 5'fosfotirosil unidos al ADN. De forma interesante, las células de mamífero deficientes de la actividad de Tdp1 no son hipersensibles a etopósido, y la Tdp1 humana purificada tiene mínima actividad en contra de los complejos covalentes DTi 2-ADN. Estos resultados sugieren que hay diferencias entre las proteínas Tdp1 de levaduras y mamíferos, ambas proteínas han sido cristalizadas mostrando pocas diferencias en los sitios activos (95).

Los estudios bioquímicos de las dos proteínas Tdp1 permanecen sin indicar la función fisiológica que ésta proteína juega *in vivo*. Sin embargo, el procesamiento de proteínas ligadas al ADN por enlaces 5'fosfotirosil (el mismo tipo que el complejo formado por DTi 2) es crítica para una recombinación meiótica normal. El procesamiento de intermediarios tempranos en la recombinación meiótica podría modelar vías que ocurrirían en la reparación de daños inducidos por fármacos en contra de DTi 2. Spo11 es un homólogo de las topoisomerasas IIB que inicia la recombinación meiótica. Aunque los detalles de la reacción de Spo11 son muy poco entendidos, la proteína Spo11 se une covalentemente al ADN por un enlace 5'fosfotirosil (96).

La proteína Spo 11 es removida del ADN a través de una ruptura en la doble cadena que es requerida para la recombinación. La unión de Spo11 al ADN se asemeja al daño que sufre el material genético cuando se aferra la DTi 2 al ADN por fármacos anticancerígenos. Es posible que las vías que remueven Spo11 puedan funcionar en la reparación del daño mediado por DTi 2. En levadura, alelos deficientes en nucleasas de los genes del complejo MRN (MRE11 y RAD50) son incapaces de remover Spo11 del ADN (97). Así Tdp1 y el complejo MRE11 son buenos candidatos para el procesamiento endonucleolítico de los complejos covalentes de Spo11 y DTi 2 con el ADN.

3. Planteamiento del problema.

En el grupo de trabajo del Dr. Lira se sintetizaron una serie de compuestos isómeros de la m-AMSA, a los cuales se les evaluó la actividad citotóxica en tres líneas celulares (HeLa, SW 620 y K-562) empleando el ensayo de reducción de MTT. Los resultados están resumidos en la tabla 1:

TABLA 1. Comparación de actividad citotóxica (CI 50 μ M) en líneas celulares de derivados de 9-anilino-2-tiazolo[5,4-b]quinolina (7,43)

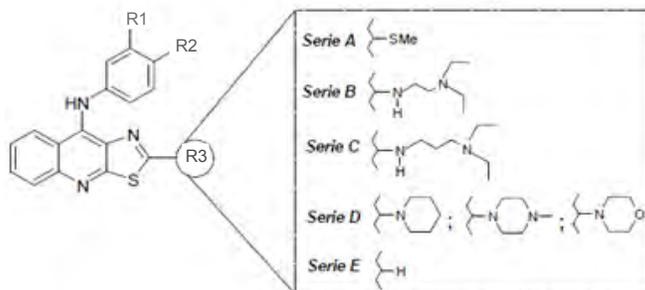


Figura 21. Patrón de sustitución de la posición 2 de distintas series

Serie	Compuesto	R1	R2	R3	HeLa	SW 620	K-562
A Comp. 1	1	H	H	SCH3	SA	SA	SA
A	2	3'-Cl	H	SCH3	69.37	129.73	80.26
A	3	3'-CN	H	SCH3	7.75	43.75	8.01
A	4	3'-OMe	H	SCH3	25.34	26.58	22.17
A	5	H	4'-Cl	SCH3	123.86	145.95	79.45
A	6	H	4'-CN	SCH3	140.02	SA	120.01
A	7	H	4'-OMe	SCH3	SA	110.80	77.20
B	8	H	H	E	15.96	21.60	16.80
B	9	3'-Cl	H	E	9.12	17.78	12.19
B	10	3'-CN	H	E	13.33	14.62	12.48
B	11	3'-OMe	H	E	19.20	20	23.50
B	12	H	4'-Cl	E	10.16	12.20	7.26
B	13	H	4'-CN	E	15.18	16.49	8.36
B	14	H	4'-OMe	E	13.60	16.38	10.87
C	15	H	H	P	6.27	16.56	7.52
C D3CIP	16	3'-Cl	H	P	7.46	10.17	9.84
C	17	3'-CN	H	P	19.21	19.65	12.88
C D4CIP	18	H	4'-Cl	P	8.82	7.48	3.36
C	19	H	4'-CN	P	24.18	29.15	12.88
D	20	H	H	X	≥ 80	≥ 80	≥ 80
D	21	H	H	Y	60.70	≥ 80	73.01
D	22	H	H	Z	≥ 80	≥ 80	≥ 80
E Comp. 4	23	H	H	H	SA	SA	SA
E Comp. 5	24	3'-Cl	H	H	SA	SA	SA
E Comp. 6	25	3'-CN	H	H	SA	SA	SA
E Comp. 11	26	3'-OMe	H	H	27.20	76.60	23.60
E	27	3'-Me	H	H	85.80	83.20	41.50
E	28	H	4'-Cl	H	SA	SA	SA
E Comp. 9	29	H	4'-CN	H	SA	SA	SA
E Comp. 10	30	H	4'-OMe	H	30.80	SA	41.80
E	31	H	4'-Me	H	SA	SA	33.70
Amsacrina *					9.50	27.70	19.90

*Compuesto de referencia. SA, Sin actividad a las concentraciones de (0.1, 1, 15, 45 y 90 μ M)

E= NH-(CH₂)₂-N(Et)₂ P= NH-(CH₂)₃-N(Et)₂ X= 1-piperidinil Y= 1-(4-metil)piperazinil
Z= 1-morfolinil

Como se puede observar, los derivados del núcleo de acridina presentan diversas

respuestas al ser utilizados en diferentes líneas celulares. Los cambios en los patrones y en el tipo de sustituyente de los compuestos afectan la actividad citotóxica en las líneas celulares de manera heterogénea. Por ser isómeros de la amsacrina, se podría explicar la actividad citotóxica de los derivados empleados, si estos compuestos son capaces de intercalarse en el ADN e inhibir a la DTi 2. Hasta el momento se ha evaluado la capacidad intercalante de algunos compuestos y su capacidad para inhibir a la DTi 2 *in vitro*. Sin embargo, la correlación entre citotoxicidad y actividad intercalante es pobre y los datos de inhibición de la DTi 2 no abarcan suficientes compuestos. Además, al momento se desconoce también si los derivados de tiazolo[5-4b]quinolinas son capaces de formar complejos de ruptura *in vivo*.

En este trabajo se planea determinar si algunos compuestos derivados de las tiazolo[5,4-b]quinolinas, de síntesis reciente, son capaces de inhibir la actividad de la enzima DTi 2 *in vitro* y si promueven la formación de complejos de ruptura *in vivo* entre la enzima y el ADN, en líneas de células cancerosas en cultivo.

4. Hipótesis

Al ser bioisómeros de la m-AMSA, los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas inhibirán la actividad de la ADN Topoisomerasa II y provocarán la formación de complejos de ruptura entre esta enzima y el ADN.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Determinar si los derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas inhiben la actividad de la ADN topoisomerasa II *in vitro* y estabilizan los complejos de ruptura *in vivo*, en cultivos de células cancerosas humanas.

5.2 Objetivos particulares

Realizar un sondeo general para determinar qué compuestos son mejores inhibidores de la enzima ADN topoisomerasa II *in vitro*.

Determinar la CI_{50} de los compuestos más activos.

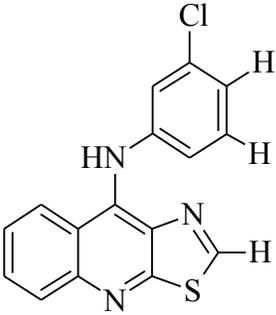
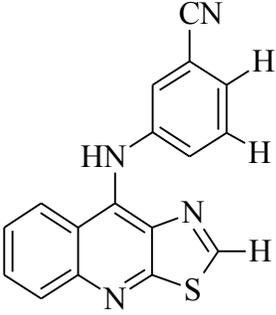
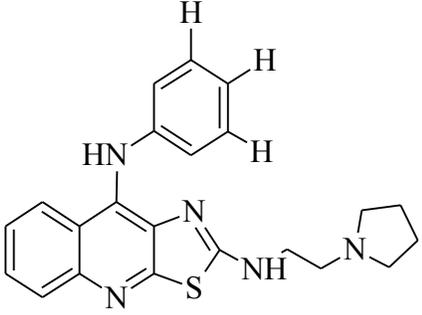
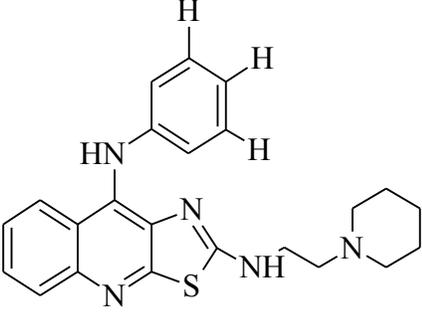
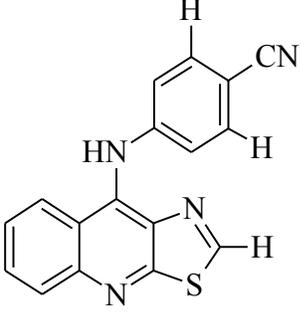
Evaluar el efecto de derivados selectos de tiazolo[5,4-b]quinolinas sobre la formación de los complejos de ruptura.

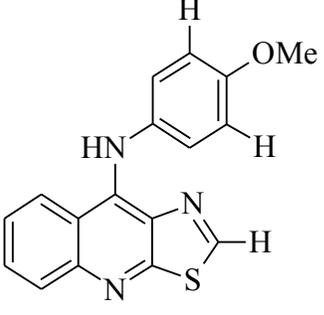
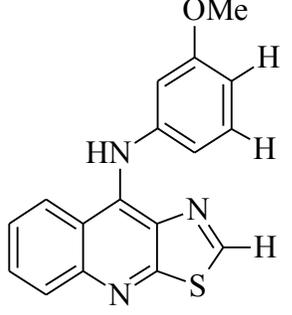
6. Materiales y métodos

6.1 Compuestos a evaluar

TABLA 2. Estructura de los derivados de 9-anilinatiazolo [5-4b] quinolina que se analizaron

Clave	Nombre	Estructura
1	2-(metilsulfanil)-N-fenil[1,3]tiazolo[5,4-b]quinolin-9-amina	
2	2-metil-N-fenil-3H-imidazo[4,5-b]quinolin-9-amina	
3	(3-amino-5-([2-(metilsulfanil)[1,3]tiazolo[5,4-b]quinolin-9-yl]amino)fenil)metanol	
4	N-fenil[1,3]tiazolo[5,4-b]quinolin-9-amina	

5	N-(3-clorofenil)[1,3]tiazolo[5,4-b]quinolin-9-amina	
6	3-([1,3]tiazolo[5,4-b]quinolin-9-amino)benzonitrilo	
7	9-anilino-2-[1-(2-aminoacetil)-pirrolidinil]tiazolo[5,4-b]quinolina	
8	9-anilino-2-[1-(2-aminoacetil)-piperidinil]tiazolo[5,4-b]quinolina	
9	4-([1,3]tiazolo[5,4-b]quinolin-9-amino)benzonitrilo	

10	N-(4-metoxifenil)[1,3]tiazolo[5,4-b]quinolin-9-amina	
11	N-(3-metoxifenil)[1,3]tiazolo[5,4-b]quinolin-9-amina	

6.2 Métodos

6.2.1 Ensayo de decatenación para medir la actividad de Topoisomerasa II α en presencia de los compuestos.

El kADN se encuentra en los sistemas mitocondriales de tripanosomas y protozoarios relacionados entre sí. La estructura del kADN consiste de una red interconectada de círculos de ADN covalentemente cerrados (Fig. 18 a), la cual contiene cerca de 5000 minicírculos de 2.5 Kb cada uno y alrededor de 25 maxicírculos de 37 Kb. La DTi 2 es capaz de desencadenar (desconcatenar) esta malla de ADN produciendo monómeros de minicírculos y maxicírculos (Fig. 18 b). En su forma encadenada (concatenada) el kADN es incapaz de migrar a través de un gel de agarosa al 1 %, a diferencia de los minicírculos liberados por acción de DTi 2 que son capaces de migrar en el gel de agarosa (Fig. 18 b, 98).

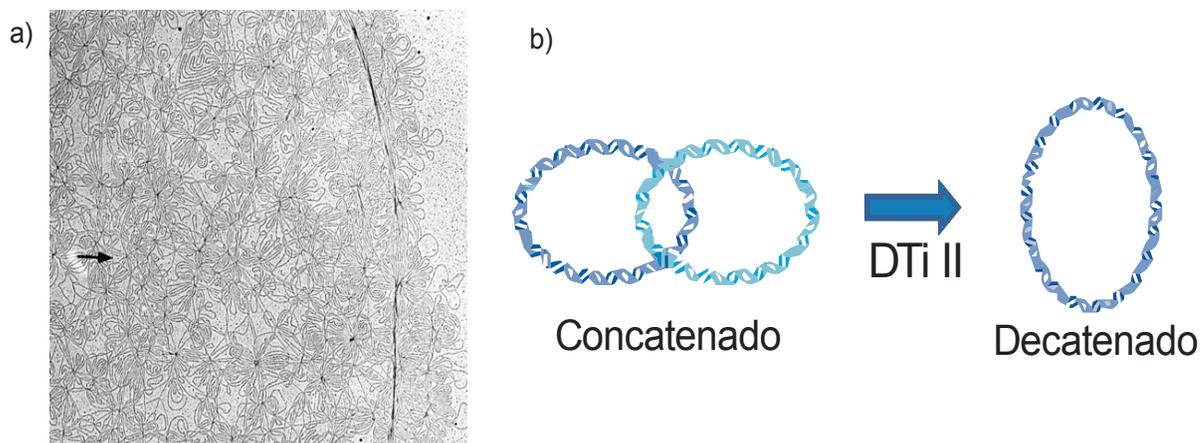


FIGURA 18. (a) Micrografía de kADN mitocondrial de *Crithidia fasciculata*. (b) Solución de la estructura concatenada del kADN a monómeros circulares por acción de DTi 2. (JL Nitiss. 2009. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. Nature Reviews Cancer. Volume 9. 327)

6.2.2 Materiales

ADN topoisomerasa II α humana (Topogen)

kADN (Topogen)

Tris-HCl pH8

DMSO

NaCl

MgCl₂

2-mercaptoetanol

ATP

Bromuro de Etidio

La actividad de la ADN topoisomerasa se siguió con el ensayo de decatenación del ADN altamente concatenado del cinetoplasto de *Crithidia fasciculata* y ADN topoisomerasa humana II, en las condiciones recomendadas en el kit fabricado por Topogen™ (Tris-HCl pH8, 30 mM, con DMSO 8%, NaCl 60mM, MgCl₂ 8 mM, 2-mercaptoetanol 15 mM, ATP 3 mM, 4 unidades de ADN topoisomerasa II humana, 5 mg/ml de kADN y en presencia ó ausencia de los compuestos a las concentraciones que se indican, 98).

El kADN de *Crithidia fasciculata* se incubó con la DTi 2 y con ó sin los compuestos, en un volumen final de 20 μ l por 30, 60, 80 o 120 minutos (según se indica) a 37 °C. La reacción se detuvo añadiendo 3.5 μ l de amortiguador de electroforesis 5x (5% Sarkosyl, 0.125% azul de bromofenol, 25% glicerol).

La mezcla se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1 % con 0.005 mg/ml de Bromuro de etidio. La imagen del gel se capturó en formato electrónico mediante el equipo *Image Station 4000MM (KODAK™)* y las imágenes se convirtieron a datos densitométricos con el paquete de cómputo *Carestream Molecular Imaging Software (KODAK™)*. La actividad se calculó como el porcentaje de densidad óptica de kADN resuelto a ADN lineal o decatenado, con la fórmula:

$$\text{Actividad} = \frac{100 \times (\text{Cuentas de DNA decatenado lineal} + \text{Cuentas de DNA decatenado circular})}{\text{Suma de cuentas en el carril}} \quad \text{Ecuación 3}$$

6.3.1 Aislamiento de complejos ADN-Topoisomerasa in vivo. Ensayo ICE

Bajo condiciones normales la vida media de los complejos covalentes es muy corta, dado que el paso de religación de la ruptura es ampliamente favorecido. Esta rápida religación posiblemente ayude a resguardar la integridad del material genético. Muchas clases de fármacos antineoplásicos y antibacteriales han mostrado actividad a través de modificar el equilibrio de ruptura/ religación aumentando la vida media de las rupturas (Fig.19, 3).



FIGURA 19. En ausencia de inhibidores enzimáticos, el equilibrio de ruptura/ligación de las topoisomerasas favorece la religación rápida de ADN roto o escindido. Muchas clases de inhibidores de topoisomerasas aumentan la vida media de los intermediarios, de esta forma incrementando la cantidad de complejos atrapados en la célula cuando se lisa con sarkosyl. (Haldane, A.; Sullivan, D. M. DNA Topoisomerase II-Catalyzed DNA Decatenation. In *Methods in Molecular Biology* v. 95. DNA topoisomerase protocols, Part II: Enzymology and drugs; Osheroff, N., Biornst, N. A., Eds.; Humana Press: Totowa NJ, 2001)

El tratamiento con estos fármacos por tanto incrementa los complejos covalentes, prolongando el tiempo de ruptura del ADN, mecanismo por el cual, se cree que estos fármacos actúan en la clínica (3).

El Ensayo ICE mide la formación de complejos de ruptura entre el ADN genómico y topoisomerasas in vivo estabilizados por fármacos como el VP-16 y la amsacrina.

El método implica la separación física de los complejos ADN/enzima de la proteína libre, seguido de la utilización de anticuerpos para detectar DTi 2 unida al ADN, permitiendo de

esta forma la cuantificación de los complejos covalentes. La captación, localización, actividad y la eficacia puede ser mejor evaluada por este método que por los ensayos *in vitro*, siempre que el mecanismo de citotoxicidad del fármaco esté mediado por la formación de este tipo de complejos. Para llevar a cabo este ensayo, las células son expuestas a los fármacos bajo condiciones en las que la enzima endógena se encuentre llevando su ciclo de reacción, seguido de la adición de sarkosyl para una lisis celular rápida y efectiva, pero sin la ruptura del ADN. Bajo estas condiciones, las proteínas son desnaturalizadas y las interacciones electrostáticas entre las proteínas y el ADN son afectadas. Los lisados son cargados en un gradiente de cloruro de cesio y centrifugados para disociar interacciones no covalentes entre las proteínas y el ADN. Esta centrifugación además permite separar las proteínas libres y el ADN acomplejado con proteínas. Después de fraccionar el gradiente se realizan inmunoblots usando anticuerpos apropiados que permitan definir la presencia de Topoisomerasas en el pico de ADN, midiendo de esta forma la formación de complejos covalentes estabilizados por la acción de los compuestos.

6.3.2 Materiales

Cultivo Celular y exposición a fármacos.

Células en cultivo: K562. 1×10^7 por tratamiento.

Medio Eagle modificado de Dulbecco + 10 % Suero fetal bovino.

DMSO - Grado Reactivo MERCK

1X TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0. 1mM EDTA

1 % Sarkosyl en 1XTE (Topogen)

Centrifugado de lisados celulares.

Cloruro de Cesio (Topogen)

Tubos de polialomero de 13 X 51 mm (Beckman Instruments)

Rotor SW55 Ti (Beckman Instruments)

Ultracentrifuga L7-65 (Beckman Instruments)

Inmunoblott

Membrana de Nitrocelulosa (Biorad)

Buffer de fosfato de sodio (PBS) pH 6.5.

Dispositivo dotblott (Bio-Dot, Biorad).

Leche en polvo sin grasa (BLOTTO)

Anticuerpos policlonales de conejo en contra de DTi 2 (Topogen)

Anticuerpos secundarios anticonejo marcados con peroxidasa (Millipore).

Reactivos de quimioluminiscencia (Pierce ECL Western Blotting Substrate. Thermo Scientific).

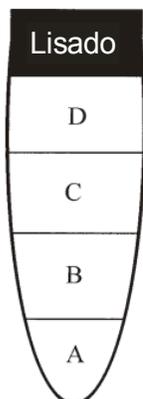
Preparación de los lisados.

Se cultivaron células K562 en cajas Petri (una por tratamiento) de 100 mm hasta que alcanzaron un 90 % de confluencia (Aproximadamente 1×10^7 células). El medio se removió de las células y se reemplazó por medio libre de suero (1mL) en donde los compuestos se encuentran a 100 μ M de concentración final. Igualmente se incubaron un control positivo con etopósido y otro con m-AMSA con capacidad conocida en la formación de complejos de ruptura. Adicionalmente, se incubó un control negativo con DMSO. Las células se incubaron a 37 °C, durante una hora. Posteriormente, se eliminó el medio y las células se lisaron agregando sarkosyl al 1% equilibrado a 37 °C (1mL por tratamiento).

Gradiente de densidad en cloruro de cesio.

De la solución Stock de cloruro de cesio se prepararon cuatro diferentes soluciones de acuerdo al siguiente cuadro.

Capa	A	B	C	D
TE	0.075	0.2	0.45	0.55
CsCl	0.925	0.8	0.55	0.45
Densidad	1.82	1.72	1.5	1.3



Las fracciones de concentraciones variables se dispusieron en forma decreciente de densidad. Se agregó 1 mL de las soluciones A, B, C y D en los tubos de polialómero como se muestra en la figura 20. Se

FIGURA 20.

agregó el lisado en la parte superior del gradiente (1 mL). Los tubos se centrifugaron a 125 000 g (Beckman Instruments) durante 24 horas a 20 °C.

Se localizaron las fracciones de ADN midiendo la absorbencia a 260 nm, previo a una dilución de 30 µL de fracción en 270 µL de agua destilada.

El ADN en cada fracción fue estimado mediante el método de Warburg-Christian empleando datos espectrofotométricos a 260 y 280 nm (Optizen POP Bio).

Inmunodetección.

Se cortaron membranas de nitrocelulosa y se remojaron en PBS 25 mM pH 6.5 por 15 minutos. Se diluyeron las alícuotas de cada fracción (50-100 µL) con un volumen igual de PBS 25 µM pH 6.5 y se aplicaron las muestras al dispositivo dot-blott (Bio-dot Biorad) usando vacío. Posteriormente, se removió la membrana y se enjuagó brevemente con PBS 25 mM.

La membrana fue equilibrada en TBST 1X conteniendo 5 % de leche en polvo sin grasa (BLOTTO) a temperatura ambiente durante 3 horas con agitación, seguido por tres lavados con TBST 1X (10 minutos por lavado).

Se incubó la membrana con el anticuerpo primario (1:5000), (el cual reconoce un residuo de 16 aminoácidos derivado del extremo carboxilo terminal de Topoisomerasa II α humana) durante 6 horas a temperatura ambiente.

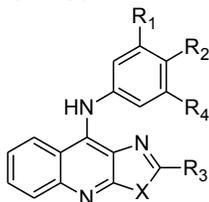
Después de 3 lavados de diez minutos con TBST 1X (10 minutos por lavado), se incubó la membrana con anticuerpos anticonejo (1:40000) marcados con peroxidasa de rábano durante una hora. Posterior al lavado del anticuerpo secundario se reveló la reacción por quimioluminiscencia. Las películas (Kodak) se capturaron en formato digital con el transiluminador *Image Station 4000MM (KODAK™)* y fueron analizados con el software Carestream de Kodak.

7. Resultados y análisis

7.1 Ensayo de inhibición de la Topoisomerasa II humana in vitro

Se realizó un ensayo de decatenación inicial para evaluar el efecto de los compuestos bajo estudio sobre la actividad enzimática de DTi 2 humana, empleando una concentración de prueba de 50µM. Cabe aclarar que el ensayo tiene limitaciones, ya que el sustrato es heterogéneo y aún cuando los compuestos pueden reducir la actividad de la enzima, la inhibición no es total (es decir, a concentración infinita de compuesto la actividad no sería cero), ya que el complejo DTi 2-ADN-inhibidor puede disociarse para formar ADN lineal covalentemente pegado a la enzima, lo que se detecta en el gel como una banda de ADN lineal y se contabiliza como actividad.

TABLA 3. Estructuras de los derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina utilizados en los ensayos de decatenación de *k*ADN.



Compuesto	X	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Compuesto	X	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	S	H	H	SMe	H	7	S	H	H		H
2	NH	H	H	Me	H	8	S	H	H		H
3	S	NH ₂	H	SMe	CH ₂ OH	9	S	H	CN	H	H
4	S	H	H	H	H	10	S	H	OMe	H	H
5	S	Cl	H	H	H	11	S	OMe	H	H	H
6	S	CN	H	H	H						

Los datos de la figura 21 muestran que los compuestos 1, 3, 4 y 9 fueron inhibidores a las concentraciones probadas, mientras que el resto resultó muy pobre como inhibidor, o sin efecto. Es posible que a concentraciones mayores sí se presente inhibición, pero dicha inhibición sería poco específica, por lo que su caracterización resulta de poco interés.

Un compuesto que también se evaluó, dada su similitud estructural con el núcleo de tiazoloquinolina, fue un derivado de imidazo[4,5-b]quinolina (2).

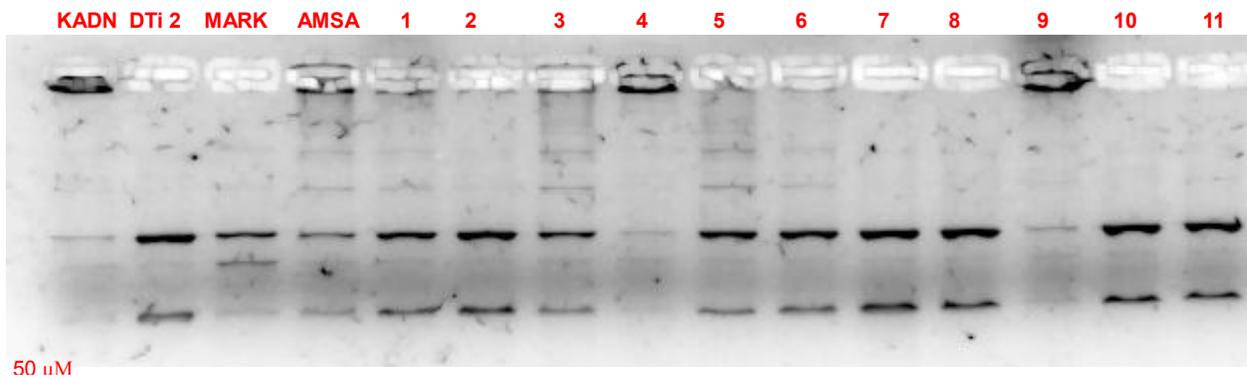


FIGURA 21. Actividad de decatenación de *kADN* por la ADN-topoisomerasa II humana en ausencia (DTi 2) y en presencia de los inhibidores AMSA y los compuestos 1 al 11.

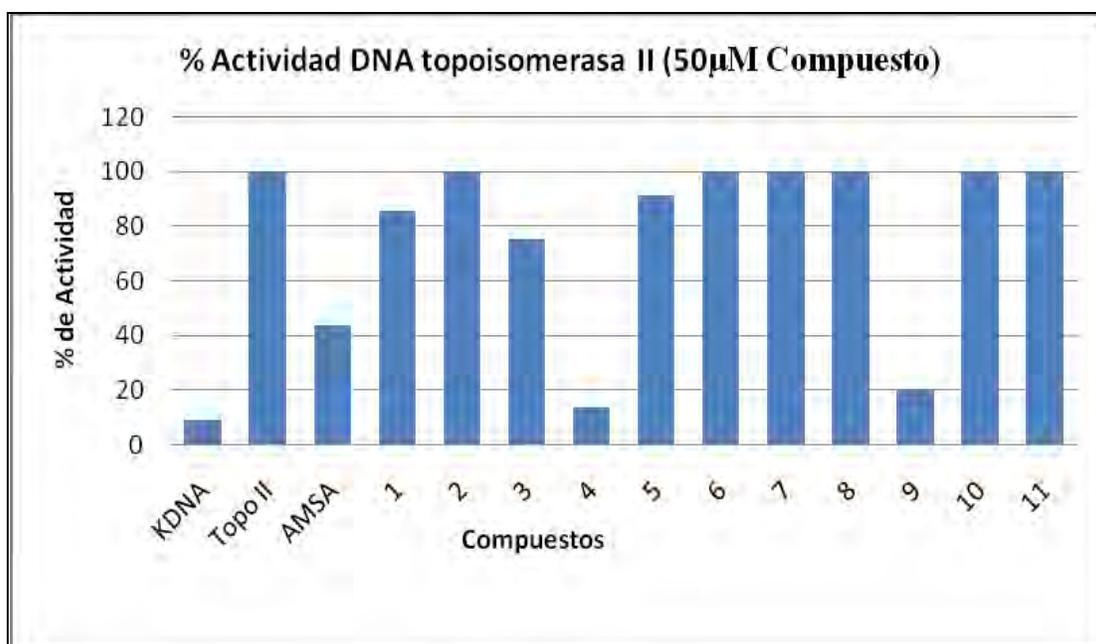


FIGURA 22. Efecto sobre la actividad de la ADN topoisomerasa II de los derivados de tiazoloquinolina y *m*-AMSA como referencia.

Posteriormente se determinó la inhibición causada por los compuestos 1, 3, 4 y 9 a concentraciones variables de los mismos.

AMSA 125 1.25 1.50 1.75 1.125 3.25 3.50 3.75 3.125 4.10 4.25 4.50 4.100 9.10 9.25 9.50 9.100

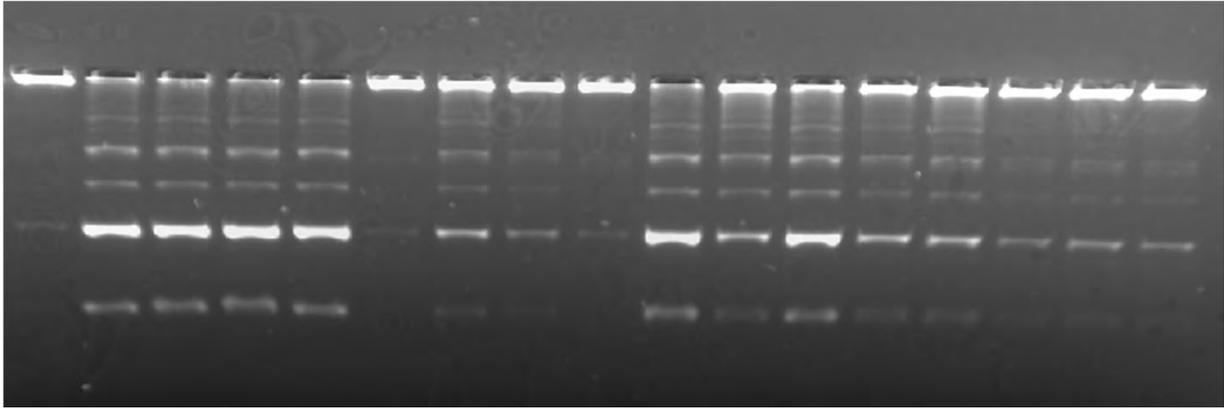


FIGURA 23. Actividad de decatenación de *kADN* por la ADN-topoisomerasa II humana en presencia de los inhibidores 1, 3, 4, 9 y AMSA. Compuestos 1 y 3 a concentraciones 25, 50, 75 y 125 μM . Compuestos 4 y 9 a concentraciones 10, 25, 50, 100 μM .

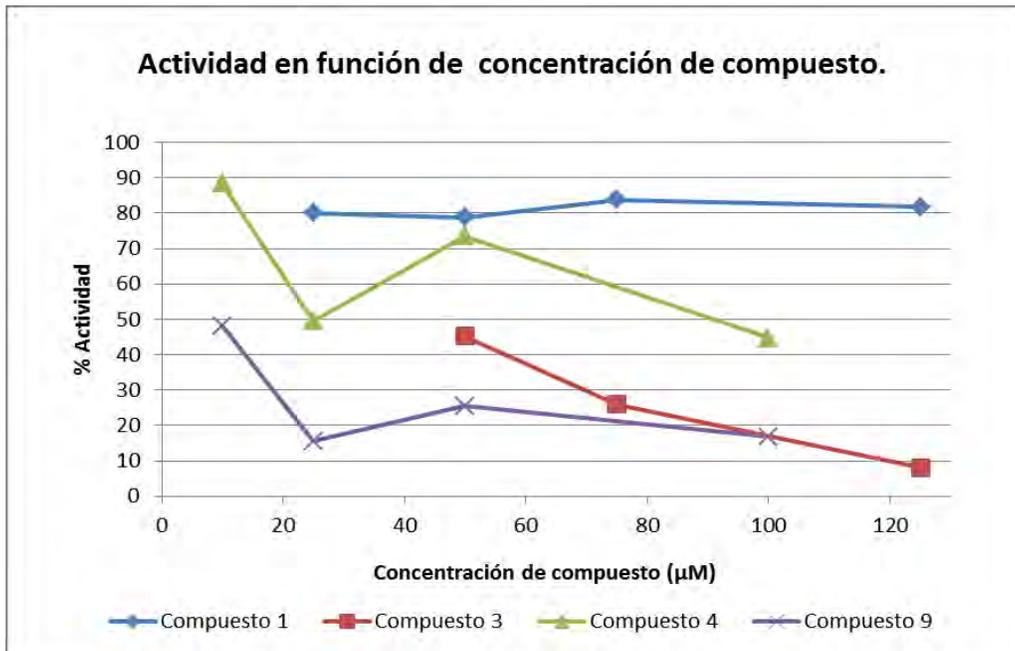


FIGURA 24. Actividad de decatenación de *kADN* en función de la concentración de inhibidores. Compuestos 1 y 3 a concentraciones 25, 50, 75 y 125 μM . Compuestos 4 y 9 a concentraciones 10, 25, 50, 100 μM .

TABLA 4. Valores de CI_{50} (μM) estimados para los compuestos 1, 3, 4 y 9.

Compuesto	Ji^2/dof^a	CI_{50} (se)
1	0.0114	125.5 (35.2)
3	0.000267	79.24 (29.9)
4	0.0000676	94.3 (16.4)
9	0.00894	2.72 (0.70)

^adof, grados de libertad

Los ensayos se realizaron como se describe en la sección de métodos, empleando concentraciones entre 10 y 125 μM de los compuestos. Los valores de I_{50} se calcularon por ajuste a la ecuación 4.

$$A = A_0 I_{50}/(I_{50}+[I]), \dots\dots\dots \text{Ecuación 4}$$

En donde A es actividad, A_0 es la actividad en ausencia de inhibidor, I_{50} es la concentración inhibitoria que da 50% de inhibición e [I], la concentración de inhibidor.

En los estudios iniciales el compuesto 4 parece tan activo como el 9, pero al determinar su CI_{50} , se obtuvo un valor alto, indicando que no es realmente un buen inhibidor. Sin embargo, el CI_{50} determinado para el compuesto 9 es incluso inferior al reportado (usando el mismo ensayo) para la amsacrina (9.94 μM , 6), que, como se mencionó en la sección de antecedentes, es un compuesto antitumoral comúnmente empleado en la práctica clínica. En ensayos previos a este estudio, se había determinado la actividad citotóxica de los compuestos evaluados (tabla 1), y el compuesto 9 no mostró efectos citotóxicos importantes en dichos ensayos. En contraste, el compuesto 11 fue el que presentó mayor efecto citotóxico en trabajos previos, pero tuvo una pobre actividad inhibitoria en los ensayos *in vitro*.

Basados en los datos de inhibición de la DTi 2 humana, los componentes estructurales que parecen ser importantes para el proceso de inhibición de la DTi 2 *in vitro* son:

Sistema Tricíclico

El anillo de tiazol del compuesto 1, a diferencia del compuesto 2 (el cual presenta un anillo imidazol en el sistema tricíclico), parece ser importante en la actividad inhibitoria, ya que el compuesto 2 no presentó actividad inhibitoria, resultado que además concuerda con su pobre citotoxicidad sobre líneas celulares (tabla 1).

El sustituyente metiltio presente en el compuesto 1 y ausente en el 4 (H) en la posición R3 disminuye la actividad inhibitoria de las moléculas utilizadas. Cabe considerar que el patrón de sustitución en el anillo de tiazol es importante para la citotoxicidad, ya que los compuestos de la familia E tuvieron actividad citotóxica baja. Nuevamente, este resultado contrasta con el hecho de que fueron buenos inhibidores de la actividad de la enzima (compuestos 3, 4 y 9)

Los compuestos 7 y 8, presentan una cadena pirrolinidil y piperinidil en R3, respectivamente, ninguno de ellos resultó efectivo como inhibidores de la actividad enzimática de la DTi 2 *in vitro*, lo que nos indica que este tipo de sustituyentes interfieren con la actividad inhibitoria, esto al comparar ambas estructuras con el compuesto 1 y el compuesto 4.

Sustituyentes sobre el anillo de anilina

El compuesto 4 presenta un anillo de anilina sin sustitución y su actividad inhibitoria es modesta, en contraste, la presencia de un grupo -CN en la posición 4 (compuesto 9) potencia el efecto inhibitorio, en tanto que, el mismo sustituyente en posición 3 la reduce (compuesto 6). Por tanto, debido a los efectos aromáticos, la influencia electroattractora del grupo -CN sobre la molécula cambia según la posición de este sustituyente, causando reducción de densidad electrónica en posiciones diferentes. Adicionalmente, el grupo -CN puede actuar como una aceptor de un puente de hidrógeno. Cualquiera de estas diferencias podrían explicar la diferente capacidad de estos compuestos como inhibidores.

Sustituyente en R2

Al comparar el tipo de sustituyente en la posición R2, se observa una mayor potencia inhibitoria en la siguiente progresión



El carácter electroattractor del -CN sustituido en la posición R2 es claramente distinto del efecto electrodonador ejercido por el MeO el cual no es activo. La presencia de un grupo electroattractor en esta posición parece ser importante para la actividad inhibitoria.

Al conjuntar los datos de actividad citotóxica de los compuestos aquí estudiados, junto con datos previamente publicados (Tabla 1), agrupando los compuestos por familias y comparando con la respuesta en los ensayos *in vitro* se pueden realizar las siguientes observaciones.

Los compuestos 10 y 11 están sustituidos por un grupo metoxilo en las posiciones R1 y R2 respectivamente, los cuales, no presentaron actividad inhibitoria en los ensayos *in vitro*, a diferencia del efecto que tuvieron en los ensayos de citotoxicidad. Estos compuestos son los más activos de la serie E al producir muerte celular, lo que indicaría que quizás la diana molecular es diferente, o bien el sitio de unión o mecanismo de acción sobre la diana molecular varía para los compuestos de esta serie.

El sustituyente N,N-dietilpropilendiamino que se encuentra en la posición R3 de los compuestos más citotóxicos (D3CIP y D4CIP) parece influir mucho en la citotoxicidad, ya que el efecto disminuye cuando se encuentra metiltilio sustituida (familia A) o carente de sustituyente (familia E). Se observa que a medida que se incrementa la cadena en esta posición se mejora el efecto citotóxico. Este patrón se identifica en los compuestos de la familia B, los cuales con una cadena N,N-dietiletilendiamino presentan un efecto citotóxico intermedio, alcanzándose el efecto máximo con el sustituyente N,N-dietilpropilendiamino (familia C).

El hecho de que no se observe inhibición en la actividad de DTi 2 con varios compuestos (entre ellos los más citotóxicos como el compuesto 11) indica que probablemente el

proceso de citotoxicidad mediado por estos compuestos es distinto al de sus análogos estructurales como la m-AMSA.

El ensayo de actividad de la DTi 2 *in vitro* no aporta información acerca del mecanismo de inhibición, solo nos indica que el proceso que permite a la enzima resolver la malla de ADN no puede completarse en presencia de los compuestos 4 y 9 y en menor grado para 1 y 3.

7.2 Ensayo ICE

Para evaluar esta propuesta, se empleó el ensayo ICE, el cual permite determinar la formación de los complejos de ruptura *in vivo*, a partir de la centrifugación diferencial del ADN y las proteínas. Al analizar la zona del gradiente donde se separa el ADN, sólo se encontraran proteínas en esta región si se encuentran unidas covalentemente al ADN. La estabilización del complejo de ruptura evita el proceso de religación, lo que supondría localizar a la enzima unida al ADN por medio de un enlace fosfotirosilo.

Para realizar este ensayo se seleccionaron los compuestos más activos en los ensayos de MTT (D3CLP y D4CLP) y los 3 más activos en los ensayos de inhibición de DTi 2 *in vitro* (1, 4 y 9).

Al realizar la centrifugación en Cloruro de cesio se obtuvieron 14 fracciones para el experimento A) y 24 para el experimento B). Posteriormente se realizaron los ensayos inmunoblot como se describen en materiales y métodos.

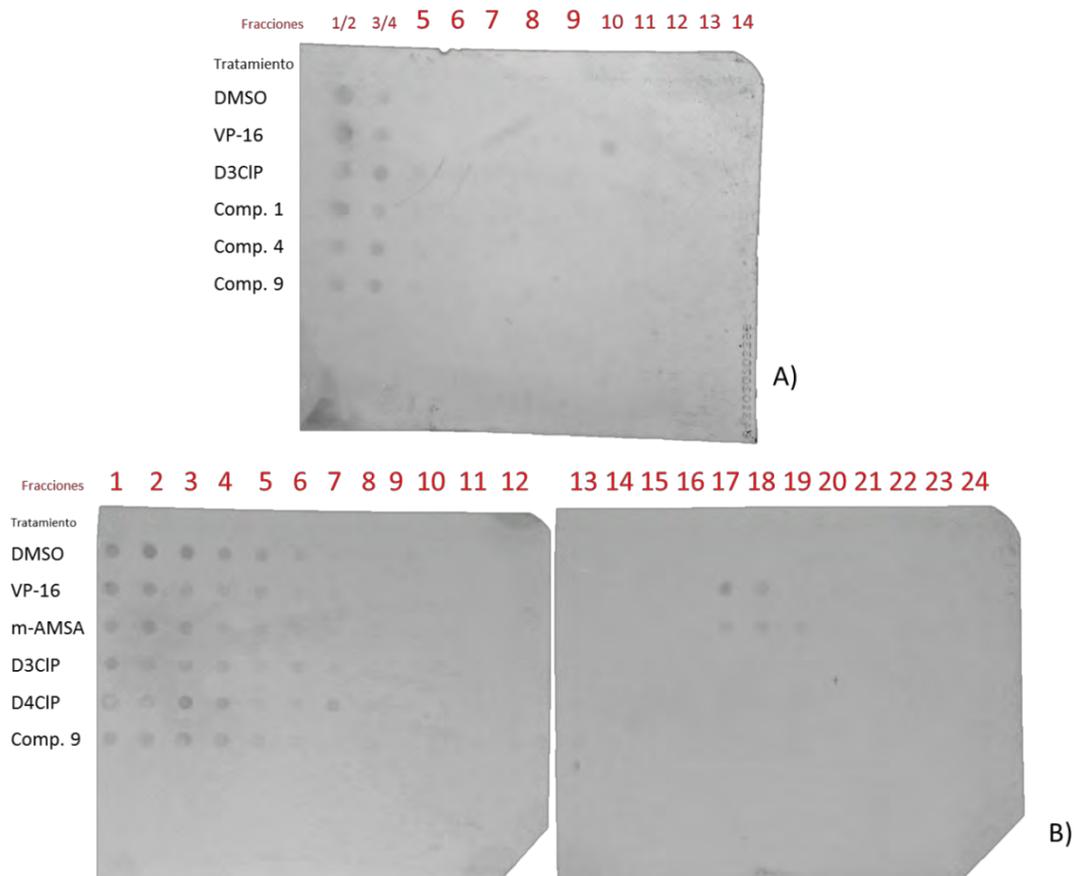


FIGURA 25. Análisis de inmunoblot de complejos Dti 2-ADN estabilizados por fármacos en células de leucemia humana k-562. Se incubaron alrededor de 10^7 células en fase de crecimiento exponencial con o sin los compuestos a una concentración de 100 μ M durante 1 hora a 37 °C. Los lisados fueron fraccionados en un gradiente de CsCl mediante centrifugación a 35 000 rpm durante 24 horas. Se colectaron 14 fracciones en A) y 24 en B) en ensayos separados, los cuales se analizaron por el método de Dot-Blot. A) Las fracciones 1 a 4 corresponden a la fracción soluble y se espera la presencia de topoisomerasa II libre. El complejo covalente puede ser detectado en la fracción 10 del tratamiento con VP-16. B) Se detectó la formación de complejos covalentes en los tratamientos con VP-16 y m-AMSA en las fracciones 17-19 a diferencia de los demás tratamientos. En ambos experimentos las células tratadas con vehículo (DMSO) se consideran como control negativo.

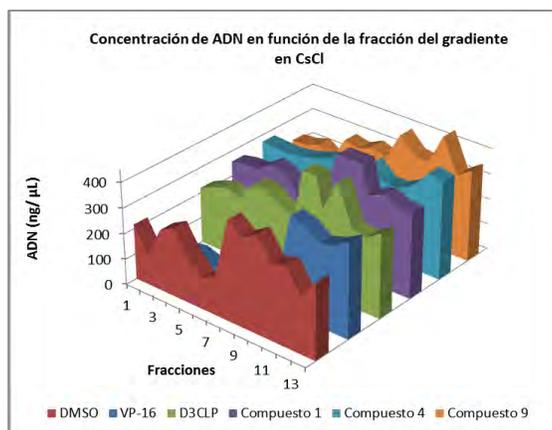


FIGURA 26. Determinación de la concentración de ADN en las fracciones para el experimento A. Se realizaron ensayos espectrofotométricos a 280 y 260 nm y se determinó la concentración de ADN por el método de Warburg Christian. Se observa un aumento en la absorbencia a partir de la fracción número 7 en la cual se comienzan a obtener las fracciones correspondientes al ADN.

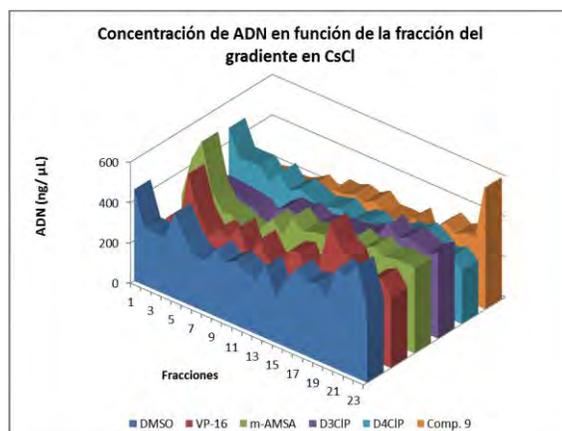


FIGURA 27. Determinación de la concentración de ADN en las fracciones para el experimento B. Se realizaron ensayos espectrofotométricos a 280 y 260 nm y se determinó la concentración de ADN por el método de Warburg-Christian. Se observa un aumento en la absorbencia a partir de la fracción número 15 en la cual se comienzan a obtener las fracciones correspondientes al ADN.

El uso de agentes que ayudan a estabilizar estos complejos permite identificar topoisomerasa II unida al ADN, como se puede ver en los tratamientos con VP-16 y con m-AMSA. Ambos compuestos forman complejos covalentes fácilmente detectables (Fig. 23), a diferencia de los controles negativos, tratados con DMSO.

Con este ensayo podemos descartar que la actividad citotóxica presente en los ensayos de MTT se encuentre relacionado directamente con la formación de los complejos covalentes, a diferencia de la actividad antitumoral mediada por m-AMSA y VP-16, los cuales si presentaron actividad estabilizadora los complejos de ruptura.

Para los compuestos 1, 4 y 9 no se observa la estabilización de los complejos covalentes, lo cual nos remite a dos posibilidades:

- 1.- Que se trate de inhibidores catalíticos.
- 2.- Que se estabilicen los complejos covalentes *in vitro*, pero por diversos mecanismos, la estabilización del complejo en ensayos *in vivo* no ocurre. Algunas causas que podrían explicar este resultado son:

- Problemas con la solubilidad.
- No biodisponibles intracelularmente

- Metabolización a otro tipo de compuestos no activos.
- Unión a proteínas diferentes a DTi 2.

Pese al bioisosterismo con la amsacrina, las tiazolo[5,4b]quinolinas presentan grandes diferencias, ya que en ensayos *in vivo*, los derivados de tiazoloquinolinas no estabilizan los complejos covalentes, en tanto que la m-AMSA si lo hace.

Cabe destacar que el uso de m-AMSA y VP-16 como compuestos de referencia no es redundante, ya que las dos moléculas estabilizan el complejo terciario de formas diferentes. Para el caso de la m-AMSA, la inhibición se produce de modo intercalante, función contraria con la realizada por VP-16 el cual, debido a su estructura, no se intercala al material genético, sino que interactúa directamente con la proteína (4).

8. Conclusiones

A pesar de que en los ensayos *in vitro* los compuestos 1, 4 y 9 fueron capaces de inhibir a DTi II, al evaluarlos *in vivo* no se observó la formación de complejos, por lo que se plantean las siguientes conclusiones:

- 1.- La actividad citotóxica observada empleando los compuestos 1, 3, 4, D3CIP y D4CIP no está relacionada con la estabilización de los complejos de ruptura.
- 2.- A pesar de su aparente semejanza estructural, las tiazolo(5,4b)quinolinas parecen actuar por un mecanismo distinto a la m-AMSA.

9. Perspectivas

A pesar de que algunas tiazolo[5,4b]quinolinas fueron capaces de inhibir a la DTi2 *in vitro*, resultaron incapaces de estabilizar los complejos covalentes enzima-DNA *in vivo*. Este hecho, no anula por completo la posibilidad de que el blanco de acción que les confiere citotoxicidad sea la DTi2, ya que existen otros intermediarios de la catálisis sobre los que los compuestos podrían ejercer la inhibición y que ocurren antes de la ruptura del DNA o después de la religación. Un análisis más detallado del mecanismo de inhibición podría aportar datos sobre este aspecto.

Además, es posible que los fármacos que resultan mejores inhibidores sean poco efectivos para inducir la formación de complejos de ruptura *in vivo*, a causa de las barreras de permeabilidad en las células, o el metabolismo de las mismas.

El ensayo *in vitro* de decatenación de ADN altamente concatenado seguido de una purificación de ADN similar al empleado en los ensayos ICE, permitiría obtener evidencia sobre la capacidad de los compuestos para estabilizar los complejos covalentes.

Se evaluaron compuestos con actividad citotóxica alta (incluso superior a la amsacrina) como lo son el D3CIP y el D4CIP, los cuales no mostraron formación de complejos covalentes en los ensayos de estabilización por fármacos. Estos resultados nos indican que posiblemente, los compuestos más citotóxicos podrían interactuar intracelularmente de una forma diferente. Determinar el efecto intracelular que promueven los derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina más activos, mediante estudios de proteómica y/o análisis por microarreglos proveería información importante para proponer otros posibles modos de acción de estos fármacos (99).

La separación en el gradiente de cloruro de cesio ofrece mucha información del modo de acción de los inhibidores de las Topoisomerasas (I y II), sin embargo conocer la estructura espacial del complejo terciario con la amsacrina o VP-16, permitiría inferir los sustituyentes y las interacciones que favorecerían la estabilización del complejo de ruptura con otros compuestos. Dicha información se podría entonces emplear para diseñar, de manera dirigida, mejores inhibidores de esta enzima.

10. Bibliografía

1. Loza-Mejía, M. A.; Maldonado-Hernández, K.; Rodríguez-Hernández, F.; Rodríguez-Sotres, R.; González-Sánchez, I.; Solano, J. D.; Lira-Rocha, A. Synthesis, cytotoxic evaluation, and DNA binding of novel thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 1142. 2008.
2. Deweese, J. E.; Osheroff, N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res.* 37,738-748. 2009.
3. Haldane, A.; Sullivan, D. M. En *Methods in Molecular Biology* v. 95. DNA topoisomerase protocols, Part II: Enzymology and drugs; Osheroff, N., Biornst, N. A., Eds.; Humana Press: Totowa NJ, 2001; pp 13–23
4. John L. Nitiss. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 9, 338–350. 2009.
5. McClendon, K; Osheroff, N. DNA Topoisomerase II, Genotoxicity, and Cancer. *Mutat Res.* 623, 83–97. 2007.
6. Rodríguez-Loaiza, P.; Rodríguez-Sotres, R; Quintero, A.; Solano, J. D.; Lira-Rocha, A. Synthesis and evaluations of 9-thiazoloquinoline-[5,4b] derivatives as potential antitumorals. *Eur J Med. Chem.* 39, 5-10. 2004.
7. Forterre, P.; Gribaldo, S.; Serre, M.R. Origin and evolution of DNA topoisomerases, *Biochimie.* 89, 2007, 427-446
8. Crick F. H. Linking numbers and nucleosomes. *Proc Nat Acad Science USA.* 73, 2639–2643. 1976.
9. Schoeffler, A.J.; Berger, J.M. DNA topoisomerases : harnessing and constraining energy to govern chromosome topology, *Q Rev Biophys.* 41, 41–101. 2008.
10. Voet,D.; Voet,J.G.; Pratt,C.W. *Fundamentals of Biochemistry.* 2nd edn. (2006) John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.
11. Wang, J.C. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 635–692. 1996.
12. Bates, A.D.; Maxwell,A. *DNA Topology.* 1993, Primera edición. Oxford University Press New York.
13. Champoux, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism, *Annu. Rev. Biochem.* 70, 369-413. 2001.
14. Zhang, H.; Meng, L.H.; Zimonjic, D.B.; Popescu, N.C.; Pommier Y. Thirteen-exon-motif signature for vertebrate nuclear and mitochondrial type IB topoisomerases, *Nucleic Acids Res.* 32, 2087-2092. 2004.
15. Slesarev, A.I.; Stetter, K.O. ; Lake, J.A.; Gellert, M.; Kraih, R.; Kozyavkin, S.A. DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote, *Nature.* 364, 735-737. 1993.
16. Mizuuchi, K.; Fisher, L.M.; O'Dea, M.H.; Gellert, M. DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 1847-1851. 1980.
17. Liu, L.F.; Wang, J.C. DNA-DNA gyrase complex: the wrapping of the DNA duplex outside the enzyme, *Cell.* 15, , 979-984. 1978.
18. Ward, D; Newton, A. Requirement of topoisomerase IV parC and pare genes for cell cycle progression and developmental regulation in *Caulobacter crescentus*, *Mol. Microbiol.* 26, 897-910. 1997.
19. Peng, H; Marians, K.J. *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions, *J. Biol.Chem.* 268, 24481-24490. 1993.
20. Hsieh, T.J. ; Farh, L. ; Huang, W.M.; Chan, N.L. Structure of the topoisomerase IV C-terminal domain: a broken beta-propeller implies a role as geometry facilitator in catalysis, *J. Biol. Chem.* 279, 55587. 2004.
21. Rose, D.; Thomas, W.; Holm, C.; Segregation of recombined chromosomes in meiosis I requires DNA topoisomerase II, *Cell.* 60, 1009-1017. 1990.
22. Schultz, M.C.; Brill, S.J.; Ju, Q.; Sternglanz, R.; Reeder, R.H.;Topoisomerases and yeast rRNA transcription: negative supercoiling stimulates initiation and topoisomerase activity is required for elongation. *Genes Dev* 6, , 1332–1341.1992.
23. Fortune, J.M.; Osheroff, N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 64, 221–253. 2000.
24. Bellon, S.; Parsons, J. D.; Wei, Y; Hayakawa, K; Swenson, L. L.; Charifson, P. S.; Lippke, J. A.; Aldape, R; Gross, C. H. Crystal structures of *Escherichia coli* topoisomerase IV ParE subunit (24 and 43 kilodaltons) : a single residue dictates differences in novobiocin potency against topoisomerase IV and DNA gyrase. *Antimicrob Agents and Chemother.* 48,1856-1864. 2004.

25. Bjergbaek, L.; Kingma, P.; Nielsen, I. S.; Wang, Y.; Westergaard, O.; Osheroff, N.; Andersen, A.H. Communication between the ATPase and cleavage/relegation domains of human topoisomerase II alpha. *J Biol Chem.* 275, 13041–13048. 2000.
26. Morrison, A.; Cozzarelli, N. R. Site-specific cleavage of DNA by *Escherichia coli* DNA gyrase. *Cell.* 17, 903–906. 1979.
27. Heck, M.M.S.; Hittelman, W.N.; Earnshaw, W.C. In vivo phosphorylation of the 170 kDa Form of Eukaryotic DNA Topoisomerase II: Cell Cycle Analysis. *J. Biol. Chem.* 264, 15161–15164. 1989.
28. Bachant, J.; Akasabas, A.; Blat, Y.; Kleckner N., Elledge, S.J. The SUMO-1 Isopeptidase Smt4 is linked to Centromeric Cohesion through SUMO-1 Modification of DNA Topoisomerase II. *Mol. Cell.* 9, 1169–1182. 2002.
29. Schmidt, B.H.; Burgin, A.B.; Deweese, J.E.; Osheroff, N.; Berger, J.M. A novel and unified two-metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerases. *Nature.* 465, 641-645. 2010.
30. Harkins, T. T.; Lewis, T.J.; Lindsley, J. E. Kinetic mechanism for the sequential hydrolysis of two ATP. *Biochemistry.* 37, 7299–7312. 1998.
31. Dong, K.C.; Berger, J. M. Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases. *Nature.* 450, 1201–1205. 2007.
32. Zechiedrich, E.L.; Christiansen, K.; Andersen, A.H.; Westergaard, O.; Osheroff, N. Double-stranded DNA cleavage/relegation reaction of eukaryotic topoisomerase II: evidence for a nicked DNA intermediate. *Biochemistry.* 28, 6229–6236. 1989.
33. Lucas, I.; Germe, T.; Chevrier-Miller, M.; Hyrien, O. Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *EMBO J.* 20, 6509–6519. 2001.
34. Peter, B. J.; Ullsperger, C.; Hiasa, H.; Mariani, K. J.; Cozzarelli, N. R. The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell.* 94, 819–827. 1998.
35. Murray, A. W.; Szostak, J. W. Chromosome segregation in mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 289-315. 1985.
36. John, L. N. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Rev Canc.* 9, 327-337. 2009.
37. Diaz-Martinez, L. A.; Gimenez-Abian, J. F.; Clarke, D. J. Chromosome cohesion: rings, knots, orcs and fellowship. *J. Cell Sci.* 121, 2107-2114. 2008.
38. Michaelis, C.; Ciosk, R.; Nasmyth, K. Cohesins: Chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell.* 91, 35–45. 1997.
39. Rattner, J. B.; Hendzel, M. J.; Furbee, C. S.; Muller, M. T.; Bazett-Jones, D. P. Topoisomerase II α is associated with the mammalian centromere in a cell cycle and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure. *J. Cell Biol.* 134, 1097–1107. 1996.
40. Barthelmes, H. U.; Grue, P.; Feineis, S.; Straub, T.; Boege, F. Active DNA topoisomerase II alpha is a component of the salt-stable centrosome core. *J. Biol. Chem.* 275, 38823–38830. 2000.
41. Chang, C. J.; Goulding, S.; Earnshaw, W. C.; Carmena, M. RNAi analysis reveals an unexpected role for topoisomerase II in chromosome arm congression to a metaphase plate. *J. Cell Sci.* 116, 4715–4726. 2003.
42. Belmont, A. S. Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 632-638. 2006.
43. Maeshima, K.; Laemmli, U. K. A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev. Cell.* 4, 467–480. 2003.
44. Schultz, M. C.; Brill, S. J.; Ju, Q.; Sternglanz, R.; Reeder, R. H. Topoisomerases and yeast rRNA transcription: negative supercoiling stimulates initiation and topoisomerase activity is required for elongation. *Genes Dev.* 6, 1332–1341. 1992.
45. Wang, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 430–440. 2002.
46. Ju, B. G.; Rosenfeld, M. G. A breaking strategy for topoisomerase II β /PARP-1-dependent regulated transcription. *Cell Cycle.* 5, 2557–2560. 2006.

47. Lyu, Y. L.; Wang, J. C. Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse embryos lacking DNA topoisomerase II β . *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 7123–7128. 2003.
48. Hartwell, L. H.; Weinert, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 246, 629–634. 1989.
49. Ishida, R. Inhibition of intracellular topoisomerase II by antitumor bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives: mode of cell growth inhibition distinct from that of cleavable complex-forming type inhibitors. *Cancer Res.* 51, 1991, 4909–4916.
50. Downes, C. S. A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature*. 372, 467–470. 1994.
51. Deming, P. B. The human decatenation checkpoint. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 98, 12044–12049. 2001.
52. Baxter, J.; Diffley, J. F. Topoisomerase II inactivation prevents the completion of DNA replication in budding yeast. *Mol. Cell*. 30, 790–802. 2008.
53. Andrews, C.A. A mitotic topoisomerase II checkpoint in budding yeast is required for genome stability but acts independently of Pds1/securin. *Genes Dev.* 20, 1162–1174. 2006.
54. Li, H.; Wang, Y.; Liu, X. Plk1-dependent phosphorylation regulates functions of DNA topoisomerase II α in cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* 283, 6209–6221. 2008.
55. Wells, N. J.; Addison, C. M.; Fry, A. M.; Ganapathi, R.; Hickson, I. D. Serine 1524 is a major site of phosphorylation on human topoisomerase II α protein in vivo and is a substrate for casein kinase II in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 29746–29751. 1994.
56. Roca, J.; Wang, J.C. The probabilities of supercoil removal and decatenation by yeast DNA topoisomerase II. *Genes Cells*. 1, 17–27. 1996.
57. Saavedra, R.A.; Huberman, J.A. Both DNA topoisomerases I and II relax 2 micron plasmid DNA in living yeast cells. *Cell*. 45, 65–70. 1986.
58. Salceda, S.; Fernandez, X.; Roca, J. Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA. *EMBO J.* 25, 2575–2583. 2006.
59. Bancaud, A.; Wagner, G.; Conde, E.; Silva, N.; Lavelle, C.; Wong, H.; Mozziconacci, J.; Barbi, M.; Sivolob, A.; Le Cam, E. Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers. *Mol. Cell*. 27, 135–147. 2007.
60. Arsuaga, J.; Vazquez, M.; Trigueros, S.; Sumners, D.; Roca, J. Knotting probability of DNA molecules confined in restricted volumes: DNA knotting in phage capsids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 99, 5373–5377. 2002.
61. Avendaño C., Menéndez J.C. *Medicinal Chemistry of anticancer drugs*, 1a Ed. 200-205. 2008. Elsevier Science Publishing Company
62. Berman, H.M.; Young, P.R. The interaction of intercalating drugs with nucleic acids. *Annu Rev Biophys. Bioeng.* 10, 1087-1114. 1981.
63. Braña, M.F.; Cacho, M.; Gradillas, A.; de Pascual-Teresa, B.; Ramos, A. Intercalators as Anticancer Drugs. *Curr. Pharm. Des.* 7, 1745-1780. 2001.
64. Yves, Pommier. *DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology and Interfacial Inhibition*. *Chem Rev.* 109, 2894–2902. 2009.
65. Meng, L.H.; Liao, Z.Y.; Pommier, Y. Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer therapy. *Curr Top Med Chem.* 3, 305-320. 2003.
66. Roca, J.; Ishida, R.; Berger, J.M.; Andoh, T.; Wang, J.C. Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 1781–1785. 1994.
67. Chene, P. Catalytic inhibition of topoisomerase II by a novel rationally designed ATP-competitive purine analogue. *Chem. Biol.* 9, 2009.
68. Pommier, Y; Cherfils, J; Interfacial inhibition of macromolecular interactions: nature's paradigm for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 26, 138-145. 2005.

69. Freudenreich, C.H.; Kreuzer, K.N. Localization of an aminoacridine antitumor agent in a type II topoisomerase-DNA complex. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 91, 11007-11011. 1994.
70. Capranico, G.; Binaschi, M. DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400, 185-194. 1998.
71. Robinson, M.J. Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II. A novel mechanism for enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage. *J Biol Chem.* 266, 14585-14592. 1991.
72. Sung, W.J.; Kim, D. H.; Sohn, S. K.; Kim, J. G.; Baek, J. H.; Jeon, S. B. Phase II trial of amsacrine plus intermediate-dose Ara-C (IDAC) with or without etoposide as salvage therapy for refractory or relapsed acute leukemia. *Jpn J Clin Oncol.* 35, 612. 2005.
73. Chourpa, I.; Morjan, H.; Riou, J. F.; Manfait, M. Intracellular molecular interactions of antitumor drug amsacrine (m-AMSA) as revealed by surface-enhanced Raman spectroscopy. *FEBS Letters.* 397, 61-64. 1996.
74. Wasserman, R.A.; Wang, J.C. Analysis of yeast DNA topoisomerase II mutants resistant to the antitumor drug amsacrine. *Cancer Res.* 54,1795. 1994.
75. Liu, Y.-X.; Hsiung, Y.; Jannatipour, M.; Yeh, Y.; Nitiss, J.L. Yeast topoisomerase II mutants resistant to anti-topoisomerase agents: identification and characterization of new yeast topoisomerase II mutants selected for resistance to etoposido. *Cancer Res.* 54, 2943. 1994.
76. Houlbrook, S.; Addison, C.M.; Davies, S.L.; Carmichael, J.; Stratford, I.J.; Harris, A.L.; Hickson, I.D. Br. J. Relationship between expression of topoisomerase II isoforms and intrinsic sensitivity to topoisomerase II inhibitors in breast cancer cell lines. *Cancer,* 72, 1454. 1995.
77. Demeunynck, M. Antitumour acridines. *Exp. Opin. Ther. Pat.* 14, 55-70. 2004.
78. Lerman, L. S. J. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Mol. Biol.* 3, 18-30. 1961.
79. Lauricella, M.; Giuliano, M.; Emanuele, S.; Carabillo, M.; Vento, R.; Tesoriere, G. Increased cyclin E level in retinoblastoma cells during programmed cell death. *Cell. Mol. Biol.* 44, 1229-1235. 1998.
80. Waring, M. Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: evidence for molecular models involving intercalation. *J. Mol. Biol.* 54, 247-279. 1970.
81. Avemann, K.; Knippers, R.; Koller, T.; Sogo, J. M. Camptothecin, a specific inhibitor of type I DNA topoisomerase, induces DNA breakage at replication forks. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3026-3034. 1988.
82. Tennyson, R. B.; Lindsley, J. E. Type II DNA topoisomerase from *Saccharomyces cerevisiae* is a stable dimer. *Biochemistry* 36, 6107-6114. 1997.
83. Uziel, T. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* 22, 2003, 5612-5621.
84. Riches, L.C.; Lynch, A.M.; Gooderham, N.J. Early events in the mammalian response to RNA double-strand breaks. *Mutagenesis.* 23, 331-339. 2008.
85. Bakkenist, C.J.; Kastan, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 421, 499-506. 2003.
86. Luger, K.; Rechsteiner, T.J.; Flaus, A.J.; Wayne, M.M.; Richmond, T.J. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J. Mol. Biol.* 272, 301-311. 1997.
87. Smart, D.J. Genotoxicity of topoisomerase II inhibitors: An anti-infective perspective. *Toxicology.* 254, 192-198. 2008.
88. Bassing, C.H.; Alt, F.W. H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle.* 3, 149-153. 2004.
89. Connelly, J.C.; Leach, D. R. Repair of DNA covalently linked to protein. *Mol. Cell.* 13, 307-316. 2004.
90. Liu, C.; Pouliot, J. J.; Nash, H. A. The role of TDP1 from budding yeast in the repair of DNA damage. *DNA Repair.* 3, 593-601. 2004.
91. Vance, J. R.; Wilson, T. E. Yeast Tdp1 and Rad1-Rad10 function as redundant pathways for repairing Top1 replicative damage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 99, 13669-13674. 2002.
92. Pouliot, J. J.; Robertson, C. A.; Nash, H. A. Pathways for repair of topoisomerase I covalent complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells.* 6, 677-687. 2001.

93. Deng, C.; Brown, J. A.; You, D.; Brown, J. M. Multiple endonucleases function to repair covalent topoisomerase I complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 170, 591–600. 2005.
94. Yang, S. W. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 93, 11534–11539. 1996.
95. Davies, D. R.; Interthal, H.; Champoux, J.J.; Hol, W. G. The crystal structure of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase, TDP1. *Structure*. 10, 237-248. 2002.
96. Keeney, S.; Giroux, C.N.; Kleckner, N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*. 88, 375-384. 1997.
97. Cao, L.; Alani, E.; Kleckner, N. A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* 61. 1089-1101. 1990.
98. http://www.topogen.com/html/enzyme_extracts.html. Windows Xp, Internet Explorer 7. Revisado el 08 de febrero de 2010 - 20:59
99. Makoto, M.; Sayaka, K.; Kazue, N.; Hisae, K.; Hiroshi, T.; Kawatani, M.; Usui, T.; Osada, H. Application of proteomic profiling based on 2D-DIGE for classification of compounds according to the mechanism of action. *Chem Biol*. 17, 460-470. 2010.