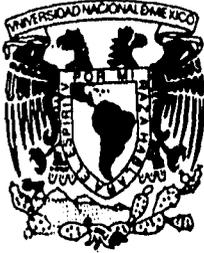


00572



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

20

" ESTUDIO DE LA INTERACCION DE LA FAMILIA
DE LAS CASIOPEINAS I Y II
CON EL ADN "

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (QUIMICA INORGANICA)
P R E S E N T A :
CLAUDIA CIRIGO LANDGRAVE



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

1996.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Dra. Noráh Barba Behrens
Vocal	Dr. Alejandro García Carrancá
Secretario	Dra. Silvia E. Castillo Blum
Suplente	Dr. Rafael Moreno Esparza
Suplente	Dra. Laura Ma. Gasque Silva

Sitio donde se desarrolló el tema:

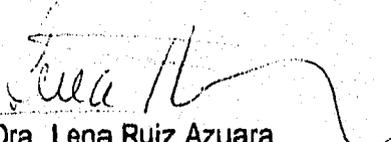
Departamento de Química Inorgánica y Nuclear

División de Estudios de Posgrado

Facultad de Química

U N A M

Asesor:


Dra. Lena Ruiz Azuara

Sustentante:


Claudia Cirgo Landgrave

Agradecimientos:

A mi familia, mis papás y mis hermanas por la confianza y el interés constante por mi desempeño y por todas las palabras alentadoras que me dieron cuando más las necesité, en especial a mi hermana Gaby por todo su apoyo en todos los sentidos y lo más importante de todos ustedes, su amor.

Quiero agradecer de manera muy especial al herito por el grandísimo apoyo que he recibido de él desde que lo conocí. Muchas gracias en verdad Pep por todas esas largas noches que nos pasamos trabajando, y creeme que no hubiera sido igual sin tí. Son tantas las cosas que tengo que agradecerte que lo único que se me ocurre es decirte de corazón muchas GRACIAS. Te amo.

También quiero agradecer a mis Suegrós y en especial a Moni por el interés que siempre expresaron y por la gran ayuda y cariño que también me brindaron para que esto llegara a su fin. Gracias de verdad.

Y obviamente agradezco todo el apoyo, confianza y amistad de Lena que hicieron posible la realización de este trabajo.

Gracias a todas las personas que aunque no las mencioné me ayudaron a que concluyera esta nueva etapa de mi vida.

INDICE

	<i>Página</i>
Abreviaturas y glosario.....	1
Indice de Figuras y Tablas.....	3
Indice de Gráficas.....	5
Resumen.....	7
1.- Antecedentes.....	9
1.1 Modelos de interacción del ADN.....	9
1.1.1 Modelo de intercalación.....	9
1.1.2 Enlace externo a los surcos de la hélice del ADN.....	14
1.1.3 Modelo de exclusión del vecino.....	16
1.2 Métodos para estudiar las interacciones en el ADN.....	16
1.3 Interacciones Cu-ácidos nucleicos.....	25
1.4 Compuestos de coordinación.....	27
1.4.1 Cisplatino.....	27
1.4.2 Otros compuestos de platino.....	28
1.4.3 Compuestos con fenantrolina.....	29
1.4.4 Sistemas L-M-L'.....	32
1.4.5 Casiopeínas.....	34
2.- Hipótesis.....	38
3.- Objetivos.....	39
4.- Parte experimental.....	40
4.1 Síntesis y caracterización de las Casiopeínas I y II.....	40
4.2 Obtención del ADN.....	40
4.3 Electroforesis en gel.....	41
4.3.1 Preparación del gel de agarosa.....	41
4.4 Espectroscopía electrónica.....	45

5.- Resultados y discusión.....	49
5.1 Electroforesis en gel de agarosa.....	49
5.1.1 Compuestos de Casiopeína I con ADN superenrollado.....	50
5.1.2 Compuestos de Casiopeína I con ADN lineal.....	55
5.1.3 Compuestos de Casiopeína II con ADN superenrollado.....	59
5.1.4 Compuestos de Casiopeína II con ADN lineal.....	63
5.2 Espectroscopía electrónica.....	70
5.2.1 Casiopeína II gli.....	71
5.2.2 Casiopeína II val.....	80
5.2.3 Casiopeína II ser.....	89
6.- Conclusiones.....	98
6.1 Electroforesis en gel de agarosa.....	98
6.1.1 Interacción de compuestos de la familia de las Casiopeínas I con el ADN superenrollado y con el ADN lineal.....	98
6.1.2 Interacción de compuestos de la familia de las Casiopeínas II con el ADN superenrollado y lineal.....	100
6.1.3 Conclusiones generales.....	100
6.2 Espectroscopía Electrónica.....	101
6.2.1 Conclusiones generales.....	101
6.2.2 Conclusiones particulares.....	102
Bibliografía.....	104

ABREVIATURAS Y GLOSARIO

Casiopeína I gli = nitrato de acuo-4,7,difenil-1,10-fenantrolina- ℓ -glicinato de cobre (II).

Casiopeína I val = nitrato de acuo-4,7,difenil-1,10-fenantrolina- ℓ -valinato de cobre (II).

Casiopeína I leu = nitrato de acuo-4,7,difenil-1,10-fenantrolina- ℓ -leucinato de cobre (II).

Casiopeína I ile = nitrato de acuo-4,7,difenil-1,10-fenantrolina- ℓ -isoleucinato de cobre (II).

Casiopeína I ser = nitrato de acuo-4,7,difenil-1,10-fenantrolina- ℓ -serinato de cobre (II).

Casiopeína II gli = nitrato de acuo-4,7,dimetil-1,10-fenantrolina- ℓ -glicinato de cobre (II).

Casiopeína II val = nitrato de acuo-4,7,dimetil-1,10-fenantrolina- ℓ -valinato de cobre (II).

Casiopeína II leu = nitrato de acuo-4,7,dimetil-1,10-fenantrolina- ℓ -leucinato de cobre (II).

Casiopeína II ile = nitrato de acuo-4,7,dimetil-1,10-fenantrolina- ℓ -isoleucinato de cobre (II).

Casiopeína II ser = nitrato de acuo-4,7,dimetil-1,10-fenantrolina- ℓ -serinato de cobre (II).

Casiopeína II his = nitrato de acuo-4,7,dimetil-1,10-fenantrolina- ℓ -histidinato de cobre (II).

p.b = pares de bases.

k.b = kilo bases.

acridina = 2,3,5,6-Dibenzopiridina.

ADN = ácido desoxiribonucleico.

DC = dicroísmo circular.

T_m = temperatura de fusión.

cis-DDP = cis-diaminodicloro platino (II).

EtBr = bromuro de etidio (bromuro de 2,7-diamin,10-etil-9-fenilfenantridinio).

fen = 1,10-fenantrolina.

a.a = aminoácido.

gli = glicina.

val = valina.

leu = leucina.

ile = isoleucina.

ser = serina.

his = histidina.

A = adenina.

T = timina.

G = guanina.

C = citosina.

dmp = 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina.

bcp = 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina.

terpy = 2,2'-6',2''-terpiridina.

hepes = ácido 2-(hidroxietil)piperazina-N'-2-etansulfónico.

MES = ácido 2-(N-morfolina)etansulfónico.

bipy = 2,2'-bipiridil.

Indice de Figuras y Tablas

Figuras

1.1 Modelo de Intercalación del ADN.....	10
1.2 Bromuro de etidio (bromuro de 10-etil-2,7-diamino,9-fenilfenantridinio)	12
1.3 Formas estructurales más comunes del ADN.....	13
1.4 N-metilfenantrolina.....	14
1.5 Surcos de la hélice del ADN	15
1.6 Representación gráfica de las 3 transformaciones lineales comunmente usadas para la ecuación de enlace de un solo sitio o clase de sitio en una macromolécula.....	22
1.7 Gráfica de Scatchard para un enlace no cooperativo de ligantes cuyo tamaño varía de $n=1$ a $n=20$, para $K=1\text{ M}^{-1}$	25
1.8 Interacción de las bases purínicas con el cobre.....	26
1.9 Estructura del cisplatino $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$	27
1.10 Complejo $\text{Cu}(\text{fen})_2^+$	30
1.11 Equilibrio intramolecular en solución del sistema L-M-L'	33
1.12 Estructura de Rayos X de la Casiopeína I con gli.....	35
1.13 Desarrollo de nuevos fármacos	36
4.1 Distribución y ejemplificación de un gel de agarosa.....	45
5.1 Interpretación general de las bandas que presentan las dos formas topológicas del ADN empleadas en este trabajo en un gel de agarosa	49
5.2 Electroforesis en Gel para Cas I gli	51
5.3 Electroforesis en Gel para Cas I val	51
5.4 Electroforesis en Gel para Cas I leu	51
5.5 Electroforesis en Gel para Cas I ile	51

5.6 Electroforesis en gel para Cas I ser	52
5.7 Electroforesis en gel para Cas I gli con ADN lineal	55
5.8 Electroforesis en gel para Cas I val con ADN lineal	55
5.9 Electroforesis en gel para Cas I leu con ADN lineal	56
5.10 Electroforesis en gel para Cas I ile con ADN lineal	56
5.11 Electroforesis en gel para Cas I ser con ADN lineal	56
5.12 Electroforesis en gel para Cas II gli con ADN superenrollado	59
5.13 Electroforesis en gel para Cas II val con ADN superenrollado	59
5.14 Electroforesis en gel para Cas II leu con ADN superenrollado	60
5.15 Electroforesis en gel para Cas II ile con ADN superenrollado	60
5.16 Electroforesis en gel para Cas II ser con ADN superenrollado	60
5.17 Electroforesis en gel para Cas II his con ADN superenrollado	60
5.18 Electroforesis en gel para Cas II gli con ADN lineal	63
5.19 Electroforesis en gel para Cas II val con ADN lineal	63
5.20 Electroforesis en gel para Cas II leu con ADN lineal	64
5.21 Electroforesis en gel para Cas II ile con ADN lineal	64
5.22 Electroforesis en gel para Cas II ser con ADN lineal	64
5.23 Electroforesis en gel para Cas II his con ADN lineal	64

Tablas

5.1 Resultados de electroforesis para las dos familias de casiopeínas con el ADN superenrollado	66
5.2 Resultados de electroforesis para las dos familias de casiopeínas con el ADN lineal	66
5.3 Valores de la constante de asociación y número de sitios disponibles para las 3 casiopeínas empleadas	97

Indice de Gráficas

5.1 Espectros electrónicos de la Cas II gli a 25 °C.....	71
5.2 Gráfica de Abs. vs concentración para la Cas II gli a 260, 272 y 282 nm a 25 °C	72
5.3 Gráfica de absorbancia vs concentración ajustada a 0 para la Cas II gli a 25 °C	73
5.4 Espectros electrónicos de la Cas II gli + ADN a 25 °C.....	74
5.5 Gráfica del valor de absorbancia resultante vs concentración de la Cas II gli a 25 °C	75
5.6 Espectros electrónicos del ADN solo incubado a 37 °C y sin incubar a 25 °C	76
5.7 Espectros electrónicos de la Cas II gli después de incubar 1 h a 37 °C.....	76
5.8 Gráfica de absorbancia vs concentración de la Cas II gli después de incubar 1 h a 37 °C	77
5.9 Gráfica de cas II gli incubada a 37 °C y ajustada al 0.....	78
5.10 Espectros electrónicos de la Cas II gli + ADN incubada 1 h a 37 °C.....	78
5.11 Gráfica de absorbancia calculada contra concentración para las muestras incubadas a 37 °C.....	79
5.12 Espectros electrónicos de la Cas II val a T.A.	80
5.13 Gráfica de absorbancia vs. concentración de la Cas II val a T.A.	81
5.14 Gráfica de abs. vs. concentración ajustada a 0 a 25 °C	82
5.15 Espectros electrónicos de la Cas II val + ADN a T.A.	82
5.16 Gráfica de abs calculada vs. concentración para Cas II val a 25 °C	83
5.17 Espectro electrónico del ADN incubado a 37 °C y sin incubar.	84
5.18 Espectros electrónicos de la Cas II val incubada a 37 °C.....	84
5.19 Gráfica de abs vs. concentración para 260, 272 y 282 nm de la Cas II val incubada.	85

5.20 Gráfica de abs vs concentración ajustada a 0 para la Cas II val incubada.....	86
5.21 Espectros electrónicos para la Cas II val + ADN incubada a 37 °C.....	87
5.22 Gráfica de absorbancia calculada vs concentración para la Cas II val incubada a 37 °C.....	88
5.23 Espectros electrónicos para la Cas II ser a T.A.	89
5.24 Gráfica de abs vs concentración de la Cas II ser a T.A.	90
5.25 Gráfica de abs vs concentración ajustada a 0 para la Cas II ser a 25 °C.	90
5.26 Espectros electrónicos de la Cas II ser + ADN a T.A.	91
5.27 Gráfica de abs corregida vs concentración para la Cas II ser a T.A.	92
5.28 Espectros electrónicos del ADN a T.A. e incubado a 37 °C.....	93
5.29 Espectros electrónicos de la Cas II ser incubada a 37 °C	93
5.30 Gráfica de abs vs concentración para la Cas II ser incubada a 37 °C a 260, 272 y 282 nm.....	94
5.31 Gráfica de abs vs concentración a 272 nm ajustada a 0 para la Cas II ser incubada.....	95
5.32 Espectros electrónicos para la Cas II ser-ADN incubada A 37 °C	95
5.33 Gráfica de abs corregida vs concentración para la Cas II ser incubada. .	96

RESUMEN

Debido a la necesidad de crear nuevos fármacos que combatan al cáncer y que sean menos tóxicos y caros se han diseñado, sintetizado, caracterizado y evaluado en nuestro grupo de investigación nuevos compuestos inorgánicos de cobre (II), los cuales se han registrado con el nombre de casiopeínas. Hoy en día se cuenta con aproximadamente 90 compuestos, de los cuales 22 han sido patentados, y 6 han sido evaluados demostrando tener actividad antineoplásica *in vivo*.

Se han llevado a cabo estudios sobre la evaluación de la actividad antineoplásica *in vitro*, y los resultados muestran que las casiopeínas poseen un efecto citostático muy similar al del cisplatino y a la mitomicina. Se ha evaluado la toxicidad de algunas de las casiopeínas en murinos para diferentes vías de administración por vía intravenosa y ya se conoce la dosis letal en perros de algunas de ellas.

Dentro de la familia de las casiopeínas se escogieron a la casiopeína I y II, ya que además de haber mostrado resultados muy similares en los estudios *in vitro* de líneas tumorales humanas de cáncer cervicouterino, su estructura también es parecida.

Con base en algunos de los antecedentes de este proyecto se decidió llevar a cabo el estudio de la interacción de algunas de las casiopeínas directamente con el ADN, con objeto de comprobar si es que existe dicha interacción, como es que se lleva a cabo dicha interacción y cuales son algunos de los factores que la modifican.

Dentro de las técnicas empleadas para estudiar macromoléculas se encuentran la electroforesis y la espectroscopía electrónica, entre otras, y se decidió llevar a cabo dichos estudios en este trabajo ya que son métodos sencillos y proporcionan información clara.

1.- ANTECEDENTES

1.1 MODELOS DE INTERACCIÓN DEL ADN

El estudio de la actividad de fármacos y hormonas con el ADN se lleva a cabo mediante el análisis de la interacción que se presenta entre estas moléculas.

Dentro del estudio de la interacción del ADN con moléculas pequeñas se han propuesto fundamentalmente 3 modelos diferentes: la intercalación, el enlace externo a los surcos de la hélice del ADN y el modelo de exclusión del vecino, los cuales se explican a continuación:

1.1.1 MODELO DE INTERCALACIÓN

Es una forma de interacción que se da entre compuestos que poseen una parte planar con un área de superficie mínima de 28\AA^2 (esto se obtiene con ligantes cuyo tamaño lo conforman entre 3 y 4 anillos)¹ y los pares de bases que se encuentran en el ADN.

En el proceso de intercalación se observan principalmente interacciones electrostáticas, de van der Waals y fuerzas hidrofóbicas entre la molécula intercalada y el ADN.

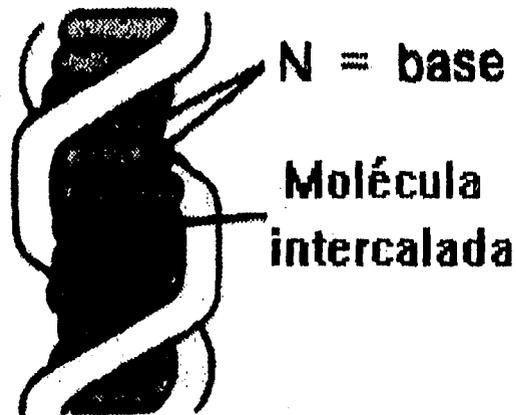


Figura 1.1 Modelo de Intercalación del ADN.

En 1961, Lerman, L.S.² estudia la interacción del ADN con las Acridinas, y propone por primera vez que la intercalación es el método por el cual se lleva a cabo dicha interacción. Con los resultados que obtiene de efectuar mediciones de viscosidad y de acuerdo a los valores del coeficiente de sedimentación, que dependen de la masa de la molécula por unidad de longitud, concluye que ningún otro esquema alternativo es compatible con los resultados observados.

Pindur, U., reporta en 1993 que en la intercalación, las estructuras primaria y secundaria del ADN permanecen intactas¹ y es la estructura terciaria la que se modifica parcialmente, agrandándose la cadena. Después de la intercalación, la distancia de separación entre dos pares de bases se incrementa de 3.4 Å a aproximadamente 8 Å (ver figura 1.1). Las constantes de asociación determinadas experimentalmente para un proceso de intercalación que se reportan en este trabajo van de 10^5 - 10^{10} M⁻¹.

Las técnicas utilizadas para estudiar la intercalación son¹:

- viscosimetría (aumento),
- mediciones espectrofotométricas en la región del UV (efecto batocrómico),
- velocidad de sedimentación (disminución en las constantes de sedimentación),
- electroforesis (cambios en la movilidad electroforética),
- métodos de espectroscopía molecular (análisis por rayosX, RMN 1D, 2D, y 3D).

Dentro de los efectos más importantes que se observan debido a la reacción de intercalación, se encuentran los siguientes³:

- inhibición de enzimas dependientes del ADN, un ejemplo típico es la ADN polimerasa, RNA polimerasa y nucleasas, dando como resultado la inhibición de la replicación, etc., ya que se presenta una competencia por los sitios del ADN.
- mutagenicidad, es la adición o sustracción de pares de bases en el ADN.
- daño en el ADN, se ha observado que muchos agentes intercalantes producen rupturas en la cadena del ADN, aunque se desconozca el mecanismo.

Al analizar la reacción de intercalación se distinguen al menos 2 diferentes etapas³, la primera en la que se lleva a cabo la intercalación y la segunda en la que la fármaco intercalado afecta la forma topológica del ADN. A continuación se detalla cada etapa:

Etapa 1:

Se lleva a cabo la intercalación. Posee constantes de asociación $\approx 10^4$ - 10^6 M^{-1} y está caracterizada por tener un número límite máximo de sitios disponibles en el ADN, por ejemplo, para el EtBr, que no posee cadenas laterales:

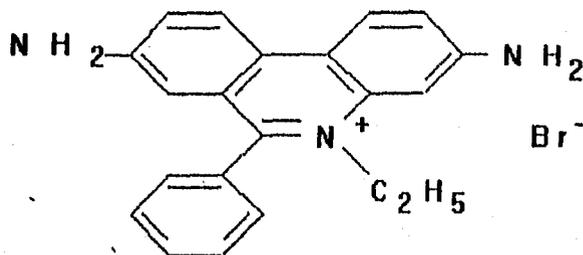


Figura 1.2 Bromuro de etidio (bromuro de 10-etil-2,7-diamino,9-fenilfenantridinolo).

el límite en sitios (definido mediante un análisis de Scatchard) es uno por cada 2-2.5 pares de bases.

Etapa 2:

En la segunda etapa se observa una modificación en la estructura topológica del ADN una vez que se encuentra intercalado el compuesto. Esto es debido a la capacidad del compuesto intercalante para "desenrollar" el ADN, lo cual le permite regresar formas superenrolladas a formas cerradas circulares. Esta situación es mas favorable para este tipo de ADN que para el lineal, y esto es debido a que el fármaco intercalante ayuda a relajar las formas superenrolladas negativas. Después de que el ADN está completamente relajado, la afinidad decrece ya que ahora el enlace resulta en la formación de la forma superenrollada positiva. Por lo tanto se predice una mayor afinidad de los fármacos en baja concentración por la forma superenrollada que por la lineal.

A continuación se presentan los diferentes estados topológicos del ADN:

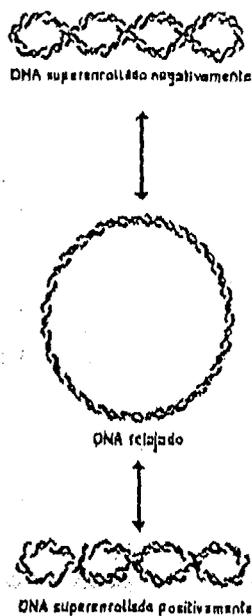


Figura 1.3 Formas estructurales más comunes del ADN.

Para 1973 ya se reconocía la importancia del proceso de intercalación, es decir, la inserción de un anillo aromático plano entre los pares de bases del ADN, y en el trabajo de Gabbay, E.J.⁴ se estudia la influencia del factor estérico del sustituyente en el compuesto intercalante. Reportan estudios de viscosidad, DC, T_m , y diálisis de varios péptidos, en donde, no sólo se observa una dependencia de los resultados encontrados con el sitio de intercalación, sino también con las estructuras primarias involucradas. Adicionalmente reporta su trabajo realizado con una serie de cationes sustituidos de la *N*-metilfenantrolina:

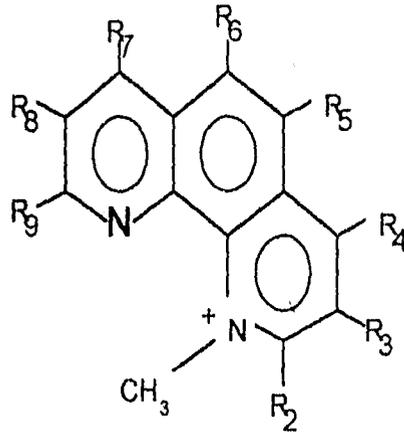


Figura 1.4 N-metilfenantrolina.

utilizando como R a grupos H, CH₃ y C₆H₅, dentro de los que se encuentran la 4,7-dimetil-N-metilfenantrolina y la 4,7-difenil-N-metilfenantrolina, siendo éste el único ejemplo de catión no planar que se maneja. Con ello se intenta conocer la estructura tridimensional de los diferentes sitios intercalantes del ADN. A excepción de la 4,7-difenil-N-metilfenantrolina los demás cationes planares se intercalan entre las bases del ADN. Esto se explica debido a la presencia de los sustituyentes fenilo voluminosos que se encuentran fuera del plano del anillo de la N-metilfenantrolina y presentan impedimento estérico para poderse intercalar.

En conclusión, el impedimento estérico que presente el sustituyente puede influir en la estabilidad del ADN, lo cual se observa con un aumento o disminución en la temperatura de desnaturalización.

1.1.2 ENLACE EXTERNO A LOS SURCOS DE LA HÉLICE DEL ADN

Este mecanismo de enlace se da en moléculas que presentan una parte planar aromática que se puede intercalar y una no aromática (cadena lateral) la cual puede enlazarse a uno de los surcos del ADN, en donde se presentan

Cabe recordar⁹ que Watson y Crick notaron que una base purínica (A y G) siempre está emparejada con una base pirimidínica (C y T) mediante puentes de hidrógeno, pero que las combinaciones que se presentan de manera natural son A-T y G-C, demostrando que sólo estos dos emparejamientos poseen la complementariedad necesaria tipo "llave-cerradura" para permitir la formación eficiente de puentes de hidrógeno.

1.1.3 MODELO DE EXCLUSIÓN DEL VECINO

En este modelo también se lleva a cabo la intercalación de un compuesto en la doble cadena del ADN, sin embargo se observa que la ocupación de los sitios disponibles a la intercalación es de aproximadamente un 50% en la saturación, lo que implica que la presencia de un compuesto intercalante entre dos pares de bases excluye al siguiente sitio disponible¹⁰.

1.2 MÉTODOS PARA ESTUDIAR LAS INTERACCIONES EN EL ADN

Debido a que existen diversos métodos que se emplean para estudiar las interacciones entre el ADN y cualquier otra molécula a continuación se enlistan los más empleados y se describe brevemente en que consisten:

1. Viscosimetría.
2. Velocidad de sedimentación.
3. Espectroscopía molecular (RMN 1D, 2D, Raman, etc.).
4. Electroforesis.
5. Mediciones espectrofotométricas (UV-visible).

Los puntos 4 y 5 se detallarán más ya que estas técnicas se emplean en el trabajo experimental.

interacciones ligante-ligante cooperativas, simplemente debidas a interacciones electrostáticas⁵.

Los compuestos que se enlazan a los surcos de la doble hélice han sido menos estudiados y están menos caracterizados que los intercaladores⁶ (ver figura 1.5). Adicionalmente se ha estudiado la relación existente entre los compuestos intercalantes y secuencias específicas en los pares de bases en el ADN. Algunos compuestos estudiados por Müller, W. y Gautier¹⁰, F. han demostrado presentar alta especificidad por las secuencias Adenina-Timina (A-T.) lo cual les hace proponer la hipótesis de que la interacción específica por pares de bases (p.b.) A-T debe ser básicamente diferente de la reacción de intercalación simple que presentan muchos compuestos.



Figura 1.5 Surcos de la hélice del ADN.

Aunque el número de compuestos tanto para la categoría de intercalación con secuencias Guanina-Citosina (G-C), como para los enlazantes externos en secuencias A-T es muy grande y nos permite replantear la hipótesis anterior, existen ejemplos reportados en la literatura en donde se sugiere que la especificidad A-T y la intercalación son compatibles⁸, de hecho, en 1985, Wilson, W.D. *et al*⁹ publican el primer ejemplo de un intercalador que presenta gran afinidad por secuencias A-T. Esta afinidad encontrada de las secuencias G-C y A-T hacia un método de interacción específico se ha observado de manera experimental y no existe aún una teoría para explicar dicho comportamiento.

1. Viscosimetría:

La viscosidad de una macromolécula enrollada depende tanto de su longitud como del espacio libre promedio entre cada vuelta de la macrocadena enrollada. Conociendo el aumento o la disminución en la viscosidad se puede proponer que le ocurre a la cadena.

2. Velocidad de sedimentación:

El valor del coeficiente de sedimentación de una molécula larga que no está fuertemente enrollada depende de la longitud de la cadena, y se espera que sea directamente proporcional a la masa por unidad de longitud. Cambios en el valor de sedimentación con respecto al valor de sedimentación del ADN sin reaccionar indican la naturaleza de la interacción.

3. Espectroscopía molecular:

En contraste con la información disponible de los grandes cambios que sufre la estructura del ADN, como puede ser la electroforesis, las técnicas espectroscópicas en disolución están más limitadas en su capacidad para discernir los aspectos conformacionales en el sitio de intercalación, sin embargo, son muy importantes para confirmar algunas de las características generales obtenidas a partir de estructuras cristalinas, pudiendo extender los conocimientos a otros fármacos similares.

Mediante los experimentos de RMN se puede obtener información específica a cerca de la interacción base-fármaco en el sitio de intercalación, por ejemplo, en mezclas de fármacos con oligo- y polinucleótidos. La comparación de los desplazamientos químicos en las resonancias de protón de los fármacos permite eliminar varios posibles tipos de interacción.

El uso de técnicas espectroscópicas de alta resolución, tales como la RMN nos permite examinar a detalle algunos aspectos del enlace del ADN con pequeñas moléculas.

4. Electroforesis:

Es un método estándar que se emplea para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN¹¹, de manera simple y rápida. Además permite separar fragmentos del ADN que no pueden ser separados de manera adecuada mediante otros procedimientos. Es el método que se utiliza para determinar la distribución de los topoisómeros en una muestra¹², (los isómeros que poseen la misma forma estructural). La movilidad de cada topoisómero está en función del número de enlaces que contiene, del número correspondiente de superenrollamientos y de la compactación resultante de cada una de sus formas. Además¹¹, dichos fragmentos pueden ser localizados en el gel mediante la tinción de la molécula del ADN con bromuro de etidio, que es un intercalante fluorescente utilizado en muy pequeñas concentraciones, mediante una lámpara de ultravioleta.

La electroforesis en gel puede aplicarse en geles de poliacrilamida, de agarosa o mediante pulsos. Los geles de poliacrilamida son de gran efectividad para separar fragmentos muy pequeños de ADN. Su poder de resolución (5-500 p.b.) es excelente. Sin embargo, presentan la desventaja de ser muy difíciles de preparar y manejar. Los geles de agarosa en cambio poseen un menor poder de resolución (200 p.b.-50 k.b.) pero son fáciles de preparar. Los geles de agarosa generalmente se corren en una configuración horizontal y con un campo eléctrico de fuerza y dirección constantes.

Los fragmentos de ADN mas grandes (10,000 k.b.) normalmente se separan mediante electroforesis de pulsos, donde se cambia periódicamente la dirección del flujo eléctrico¹¹.

5. Espectroscopía electrónica:

El estudio¹³ de la asociación de moléculas pequeñas o iones con una macromolécula involucra la determinación de la concentración en el equilibrio del ligante libre y de la cantidad de ligante enlazado por unidad de macromolécula, y esta reacción puede ser estudiada mediante la espectroscopía electrónica.

Las transiciones electrónicas más frecuentes que se observan en un complejo ML donde M es un metal y L un ligante son¹⁴:

- de electrones de no-enlace del ligante L,
- de electrones de no enlace del catión M, o
- de electrones de enlace entre M y L.
- $d \rightarrow d$

y en especial para estudiar las interacciones entre un complejo y el ADN el método espectrofotométrico es de gran utilidad empleando el cambio en el espectro de absorción del ligante que es enlazado a los ácidos nucleicos. Es por eso que en este trabajo se realiza un estudio espectrofotométrico para poder encontrar la relación que existe entre el ADN y los compuestos de caseína y a partir de los datos extraídos de los espectros electrónicos poder determinar la constante de asociación y el número de sitios disponibles en el ADN para dicha interacción.

Empleando la espectroscopía electrónica, como una herramienta para determinar las interacciones entre el ADN y moléculas pequeñas, George Scatchard¹⁵ (1949) desarrolla un modelo probabilístico que consiste en determinar el número de moléculas pequeñas n que interactúan con una

proteína o con cualquier macromolécula, en donde se supone que la probabilidad inicial de reacción es la misma para cualquier punto de la molécula que se considera de manera independiente al resto de los puntos, es decir, como si actuaran como moléculas independientes. Debido a que el enlace de una molécula a un sitio específico del ADN se explica mediante la ley de acción de masas, para una concentración c :

$$\frac{\bar{v}}{n - \bar{v}} = kc \quad (\text{Ec. 1})$$

donde v = número de moléculas pequeñas

n = número de sitios de reacción de la macromolécula.

k = constante de asociación

c = concentración de moléculas pequeñas¹

\bar{v} = porcentaje de moléculas pequeñas asociadas

al multiplicar por $\frac{(n - \bar{v})}{c}$ la ecuación anterior toma la forma

$$\frac{\bar{v}}{c} = k (n - \bar{v}) \quad (\text{Ec. 2})$$

Al graficar $\frac{\bar{v}}{c}$ contra \bar{v} se obtiene una línea recta si k es constante¹⁵. La intercepción en el eje de las y 's es kn , la constante de asociación, y la intercepción con el eje de las x 's es n , el número total de grupos enlazados.

¹La espectroscopía electrónica solo puede cubrir un intervalo limitado de valores de μ debido a que se deben trabajar concentraciones donde se cumpla la ley de Beer¹¹.

La curvatura puede indicar diferentes constantes intrínsecas o cualquier desviación del modelo de considerar probabilidades independientes, es decir, que en realidad, los grupos enlazados modifican la interacción de los subsecuentes grupos que se van a enlazar.

Klotz, M.¹⁶, en 1971 se refiere a que tanto los aspectos cinéticos como el equilibrio de las interacciones entre una macromolécula y varias moléculas pequeñas se expresan de la siguiente forma:

$$r = \frac{nkA}{1 + kA} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde r es el número de moles de moléculas pequeñas unidas por moles totales de proteína, n es el número de sitios enlazantes en la molécula de proteína, k es la constante intrínseca de enlace (constante de asociación), y A es la concentración molar de las moléculas pequeñas no enlazadas, que se aplica a moléculas con un solo sitio de reacción o moléculas con una sola clase de sitios con la misma constante de enlace intrínseca.

Para la evaluación de los parámetros de esta ecuación se utilizan transformaciones lineales conocidas, incluyendo la de Scatchard¹⁵ (ec. 6):

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nk} \frac{1}{A} \quad (\text{Ec.4})$$

$$\frac{A}{r} = \frac{1}{nk} + \frac{1}{n} A \quad (\text{Ec. 5})$$

$$\frac{r}{A} = kn - kr \quad (\text{Ec. 6})$$

y las gráficas que las representan son:

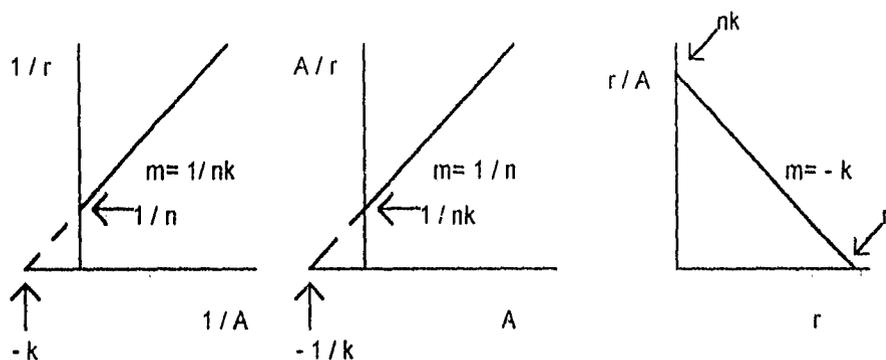


Figura 1.6 Representación gráfica de las 3 transformaciones lineales comunmente usadas para la ecuación de enlace de un solo sitio o clase de sitio en una macromolécula.

las cuales deben dar una línea recta. Si esto no sucede, deben existir una o más clases de sitios independientes. En este trabajo se reporta el tratamiento matemático, las ecuaciones y la forma de las gráficas que resultan para más de un sitio diferente de reacción.

En 1974 surge una revolución del manejo de los datos experimentales obtenidos al hacer reaccionar una macromolécula con moléculas pequeñas con el trabajo publicado por McGhee, J.D. y von Hippel¹⁷, P.H, en donde se hace una clasificación de las proteínas que interactúan con el ADN: las que se enlazan de manera "específica" y las "no específicas". El comportamiento de las proteínas específicas se explica de manera adecuada mediante la ley de acción de masas.

Las proteínas no específicas se pueden enlazar ya sea a una cadena sencilla o a una doble del ADN de manera indistinta, y presentan las siguientes propiedades:

- se enlazan a cualquier secuencia del ADN con afinidades mas o menos comparables.
- el enlace puede ser cooperativo o no cooperativo con respecto a la concentración de la proteína.
- en el complejo enlazado, cada proteína cubre mas de una base (o pares de bases) a lo largo de la molécula del ADN.

En este contexto, las proteínas no específicas requieren fundamentalmente un diferente tipo de análisis teórico que el que requiere la proteína específica, y en el trabajo de McGhee, J.D. y von Hippel, P.H. se desarrolla dicho análisis¹⁷.

El primer paso en el análisis de un problema de enlace es el de determinar la cantidad de complejo enlazado (SL) en función de la concentración del ligante libre(L) y del sustrato(S), ya que se considera el siguiente equilibrio de enlace:



para el cual al aplicar la ley de acción de masas se obtiene:

$$\frac{[\text{Ligante enlazado}]}{[\text{Ligante libre}]} = K \frac{S L}{L} = K S \quad (\text{ec.8})$$

Al graficar los datos de acuerdo a las gráficas de Scatchard¹⁵ o de acuerdo a la gráfica equivalente de Klotz, M.¹⁶, se explican las desviaciones de la linealidad debido a la presencia de más de una clase de sitios enlazantes, a la interacción ligante-ligante, o a ambas. Esta aproximación es válida si el ligante se enlaza a una sola unidad de la red, es decir, a una sola base o p.b,

sin embargo, cuando un ligante enlazado cubre 2 o más residuos de la red, lo cual es muy común en los sistemas biológicos, el sistema se complica y por lo tanto ya no puede ser tratado por una simple relación de Scatchard, debido a que los sitios de enlace potenciales se sobreponen, por tanto, a cualquier grado de enlace, el número de sitios de enlace libres para ligantes depende no sólo del número de ligantes alrededor del enlace, si no de la distribución de los ligantes enlazados en la red. El resultado es una gráfica curvada de Scatchard, pero aquí esta curvatura se puede atribuir solamente como consecuencia de la sobreposición, y no a la cooperatividad de los ligantes enlazados.

En este trabajo¹⁶ publicado por Klotz, M, se han derivado ecuaciones que describen tanto al enlace cooperativo como al no cooperativo para cualquier tamaño de ligante, tanto en una red homogénea como en una heterogénea. Los datos experimentales son analizados mediante la técnica de mínimos cuadrados, y se obtiene la ecuación de enlace homóloga a la de Scatchard:

$$\frac{v}{L} = K (1 - nv) \left(\frac{1 - nv}{1 - (n - 1)v} \right)^{n-1} \quad (\text{Ec. 9})$$

en donde:

- v es la densidad de enlace (en unidades de moles de ligante enlazado por moles de los lugares totales de la red).
- n es el número de sitios de enlace libres de la red.
- K es la constante de asociación intrínseca.
- L es la concentración de ligante libre (en unidades de moles de ligante por litro).

De la ecuación (9) se deduce que:

- si $n = 1$, el último factor se elimina y la ecuación se reduce a la de Scatchard (línea recta).
- si $n \geq 2$, el último factor es menor que la unidad, y es función, tanto de n como de v , por tanto, las gráficas de Scatchard no serán lineales y siempre caerán por debajo de la gráfica clásica (ver Figura 1.7).
- la intercepción del eje $\frac{v}{L}$ es K (la constante de asociación intrínseca), y no $\frac{K}{n}$ como en el tratamiento clásico de Scatchard.
- la intercepción del eje v es $\frac{1}{n}$.

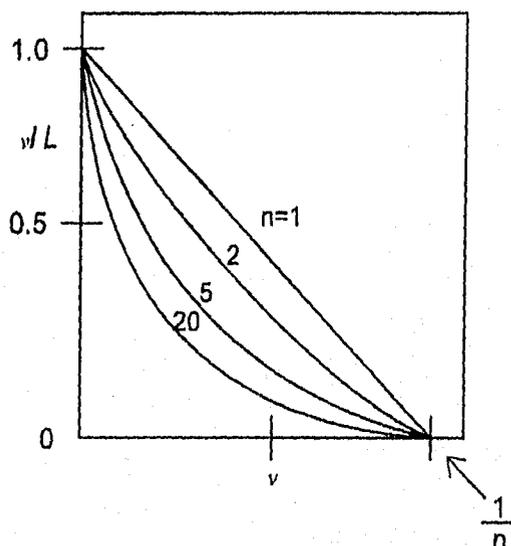


Figura 1.7 Gráfica de Scatchard para un enlace no cooperativo de ligantes cuyo tamaño varía de $n=1$ a $n=20$, para $K=1 \text{ M}^{-1}$.

1.3 INTERACCIONES Cu-ÁCIDOS NUCLÉICOS

Las reacciones entre las bases purínicas, pirimidínicas, nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos con iones metálicos han sido un tema muy

estudiado. En el pasado, estos ligantes se dividieron en dos grupos: aquéllos que contenían grupos fosfatos y los que no.

De la misma manera, se clasificaron los iones metálicos en 3 categorías: aquéllos que interactuaban exclusivamente con una porción de base, los que interactuaban tanto con una base como con un fosfato y los que interactuaban exclusivamente con un fosfato¹⁸.

En el caso de los metales de transición se habla de grados de enlace tanto para las bases como para los fosfatos. Estudios de RMN de protón¹⁸ muestran que el Cu^{2+} se enlaza con los fosfatos y que a mayores concentraciones de cobre o al elevar la temperatura se enlaza a las bases. En especial el cobre puede interactuar con las bases purínicas (adenina y guanina) en los siguientes sitios con alta densidad electrónica: C_6N_7 y $\text{N}_3\text{-N}_9$ ¹⁸.

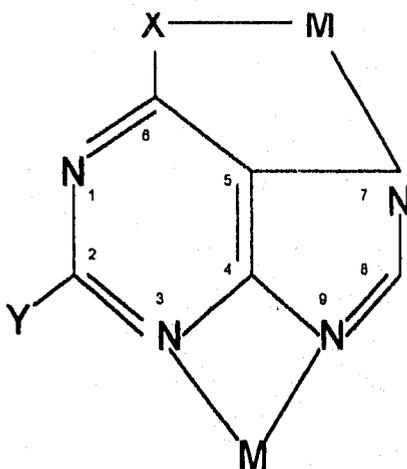


Figura 1.8 Interacción de las bases purínicas con el cobre.

donde $\text{X} = \text{NH}_2$ para la adenina y O para la guanina y $\text{Y} = \text{H}$ para la adenina y NH_2 para la guanina.

La afinidad del cobre por las bases pirimidínicas parece ser mucho menor, aunque faltan muchos estudios por realizar al respecto.

1.4 COMPUESTOS DE COORDINACIÓN

1.4.1 CISPLATINO

Se conocen 44 fármacos comerciales que combaten el cáncer, de los cuales sólo 2 poseen un metal de transición, el platino. He aquí la importancia de encontrar nuevos fármacos de esta naturaleza, pero que a la vez sean menos tóxicos y menos caros que el platino.

En 1965 Rosenberg reportó el efecto citostático de un compuesto inorgánico sintético, el cisplatino¹⁷, que marca la pauta para la síntesis de una nueva serie de compuestos. La síntesis de dicho compuesto se hizo a finales del siglo pasado. En 1971 se probó clínicamente y en 1976 fue aceptado por la FDA (Food and Drugs Administration, siglas en Inglés)¹⁸. Se cree que el ADN es la célula huésped responsable de la actividad antitumoral del cis-diaminodicloroplatino (II), cis-DDP. Existen un gran número de estudios que intentan explicar los diferentes efectos biológicos de este compuesto de platino con el ADN y de la estabilidad *in vitro*²⁰

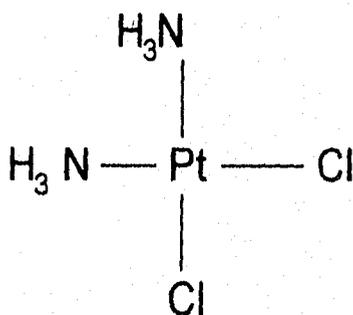


Figura 1.9 Estructura del cisplatino cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂].

El mecanismo de acción del cisplatino ha sido un tema de gran controversia, sin embargo, Lippard, S.J.¹⁰ propone un mecanismo cinético

disociativo influenciado por el disolvente que se explica de la siguiente forma: la alta concentración de iones cloruro en plasma puede suprimir la reactividad de el fármaco, disminuyendo su toxicidad. Posteriormente se lleva a cabo una difusión a través de la membrana celular y el fármaco es activado mediante la pérdida de iones cloruro (en el citoplasma, la concentración de iones cloruro es ~ 4 mM) para formar $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)(\text{OH})]^+$ y los productos de hidrólisis correspondientes. Ahora el compuesto acuoso se une a la cadena del ADN más fácilmente ya que el agua es buen grupo saliente. El enlace de platino aparentemente mata células normales y tumorales, y de una manera más marcada a éstas últimas por ataque a la célula en su etapa de reproducción. La razón de este comportamiento puede ser porque las células tumorales se reproducen de una manera mucho más rápida que las normales.

1.4.2 OTROS COMPUESTOS DE PLATINO

Para comprender el papel que juegan los metales en los sistemas biológicos, los compuestos de platino¹⁰ ofrecen ventajas:

- son moderadamente solubles en agua,
- cinéticamente inertes a la sustitución, y
- a diferencia de algunos otros metales de la tercera serie de transición, no forman óxidos hidratados insolubles a pH neutro.

El platino es un metal que posee gran densidad electrónica, y capacidad de formar enlaces con polinucleótidos, y se reportan los resultados obtenidos de estudios de fluorescencia que indican que compuestos de platino con ligantes planares aromáticos, como el $[(\text{terpy})\text{PtCl}]^+$, llevan a cabo la intercalación¹⁰.

En un trabajo realizado por Howe-Grant, M. y Lippard, S.J. en 1979²¹ se estudian varios factores involucrados en el enlace de compuestos

intercaladores de platino con el ADN, dentro de los cuales se encuentran la importancia de la estructura del intercalador, la composición de las bases del ADN y las interacciones de carga electrostáticas, y esto es posible mediante la variación de la naturaleza del ligante del complejo de platino, del ADN y de la fuerza iónica del disolvente del medio.

1.4.3 COMPUESTOS CON FENANTROLINA

Se ha observado mediante ejemplos de fenantrolinas sustituidas, que los grupos electrodonadores, como es el caso de los grupos metilo, modifican el valor de la longitud de onda de compuestos de coordinación con diferentes metales, desplazándola a valores mas grandes¹⁴.

Bjerrum demostró en una serie de complejos de coordinación que en los compuestos sustituidos, comparándolos con sus respectivos compuestos no sustituidos, la estabilidad está directamente relacionada con la basicidad del ligante. Los compuestos con metilfenantrolinas se espera que sean más estables que las fenantrolinas respectivas¹⁴, ya que un sustituyente metilo enlazado en una base aromática como lo es la fenantrolina o la piridina incrementa la basicidad del nitrógeno.

Dentro del estudio de los compuestos que poseen fenantrolinas se cuenta con el trabajo de Barton, J.K.²², que en 1982 reporta que compuestos tetraédricos de Zn(II) con fen se intercalan al ADN mediante un estudio electroforético en donde al aumentar las concentraciones de el fármaco se observa que la cadena duplex del ADN se desdobla más, dando pauta a un superenrollamiento positivo, y a un polímero mas compacto que posee una mayor movilidad.

Dos años mas tarde, Barton, J.K. reporta el estudio de compuestos octaédricos de $Ru(II)^{23}$ y de $Co(III)^7$ con fen, y propone nuevamente intercalación, mediante un decremento y pequeño desplazamiento en la banda de absorción debida a la transferencia de carga metal-ligante en el espectro electrónico en la región del visible (efecto hipocrómico), lo cual es un comportamiento característico de la intercalación²³.

Sigman, D.S.^{24, 25} y otros^{26, 27, 28, 29} reportan la actividad como nucleasa oxidativa del complejo de cobre $Cu(fen)_2^+(I)$, el cual es tetraédrico, sin embargo, se hace notar que si se emplea la fen sustituida en la posición 2, o 2 y 9, ya sea por metilos o fenilos la actividad se bloquea, al igual que en el caso de la sustitución en las posiciones 4 y 7 de la fen por fenilos (batofenantrolina), por lo cual sugiere la presencia de una geometría diferente en este tipo de compuestos.

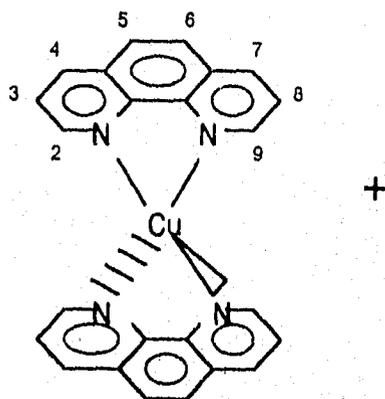


Figura 1.10 Complejo $Cu(fen)_2^+$.

Dentro de la misma área de investigación, Tamilarasan, R. reporta en 1989³⁰ que los compuestos $Cu(dmp)_2^+$ y $Cu(fen)_2^+$, interactúan en el surco menor, y no intercalándose. El compuesto $Cu(bcp)_2^+$ en cambio parece actuar de manera diferente debido a la rigidez de la estructura, tal vez mediante la

intercalación en el surco mayor del ADN, lo cual corrobora en sus estudios publicados un año mas tarde³¹.

Thederahn, T.B.³² en 1989 hace un estudio cinético de la actividad nucleasa de compuestos de cobre con fen sustituida en diferentes posiciones y concluye que:

- un compuesto con sustitución 5 en la 1,10-fenantrolina puede ser fácilmente acomodado en el surco menor del ADN, ya que estos sustituyentes están expuestos a un ambiente acuoso, y por tanto, interfieren poco en el enlace.
- en contraste, el proceso de intercalación, preferido por compuestos con geometría plana, será sujeto a interferencias estéricas por sustituyentes voluminosos en esta posición 5.
- la estabilidad de los complejos ADN-1,10-fenantrolina-cobre puede ser influenciada sustancialmente por sustituyentes en las posiciones 3-, 4-, 7-, y 8-ya que están en contacto con la superficie del surco menor.
- la sustitución por grupos metilo en las posiciones 3- y 8- desestabiliza los complejos intermediarios, mientras que en las posiciones 4- y 7- la desestabilización es tolerable.
- sin embargo, sustituyentes más grandes como los fenilos en las posiciones 4- y 7- produce un complejo que es marcadamente mas específico que la fen.
- la coordinación del complejo 4,7-difenil-fen-cobre al surco menor es desfavorable, y tal vez procede a través del surco mayor.

1.4.4 SISTEMAS L-M-L':

Los compuestos ternarios L-M-L' en donde uno de los ligantes es la fen, y el otro ligante es un aminoácido han sido objeto de estudio en cuanto a las relaciones entre el ADN y los aminoácidos en sistemas biológicos³³. Se puede recordar brevemente que las posibles interacciones entre un a.a y el ADN pueden ser:

- puente de hidrógeno entre el a.a y las bases del ácido nucleico,
- interacciones polares entre grupos amonio cargados positivamente de los a.a y grupos fosfato cargados negativamente de los nucleótidos,
- fijación de anillos aromáticos entre las bases purínicas y pirimidínicas,
- interacciones hidrofóbicas.
- también se ha observado que pueden ocurrir 2 interacciones a la vez dando lugar a la cooperatividad.

Las interacciones polares de los sistemas L-L' se modifican mediante la presencia de un ion metálico formándose los compuestos ternarios antes mencionados, por ejemplo se observó que existía interacción hidrofóbica entre un sistema con anillo aromático y un grupo isopropilo, tal es el caso del complejo de la fen con la leu, en donde dicha interacción se vió incrementada con la presencia de un metal³⁴.

Fischer, B. E.³⁴, hace un estudio más detallado sobre las interacciones hidrofóbicas que se generan entre dos grupos alifáticos o entre un alifático y un aromático. Seleccionó un grupo de aminoácidos con diferentes cadenas alifáticas, ya sea lineales como lo son la alanina, el ácido α -aminobutírico, o con cadena ramificada como la valina, leucina e isoleucina, y ligantes aromáticos

como la bipy o la fen. Los metales fueron el Cu^{2+} y Zn^{2+} . Se observa que la estabilidad que presentan este tipo de compuestos ternarios es mucho mayor que las especies de los sistemas binarios, y parece ser que esto es debido a interacciones hidrofóbicas intramoleculares entre la cadena de los aminoácidos y los anillos aromáticos de la fen, ya que dicha cadena es lo suficientemente grande para alcanzar al anillo aromático.

Se propone un equilibrio intramolecular en solución de los siguientes isómeros entre la forma "abierta", es decir, en donde no existen interacciones hidrofóbicas, y la "cerrada" donde sí existen:

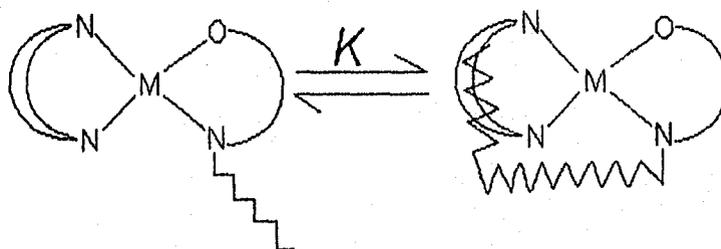


Figura 1.11 Equilibrio intramolecular en solución del sistema L-M-L'.

en donde K es la constante del equilibrio intramolecular.

$$K = \frac{[\text{M}(\text{Ar})(\text{a.a})]_{\text{abierto}}}{[\text{M}(\text{Ar})(\text{a.a})]_{\text{cerrado}}} \quad (\text{Ec. 10})$$

y Ar es el anillo aromático, a.a es el aminoácido y M es el metal. En este artículo, Fischer³⁴ reporta el valor de esta constante para un gran número de sistemas ternarios.

1.4.5 CASIOPEÍNAS

Dentro de los métodos más comunes para combatir el cáncer se encuentra la quimioterapia, y dentro de la quimioterapia se sabe que el cisplatino y el carboplatino (el cual, aunque es menos tóxico que el cisplatino es más caro) son los únicos compuestos inorgánicos que funcionan como anticancerígenos, además de ser los únicos ampliamente estudiados hasta el momento y estar aprobados por la FDA. Es por eso que muchas de las comparaciones de los resultados obtenidos experimentalmente con la familia de las Casiopeínas se comparan con los del cisplatino. A pesar de la actividad antineoplásica demostrada del cisplatino, existen muchos tumores que son refractarios a dicho fármaco, además de que presenta una alta toxicidad. Este hecho ha estimulado el diseño, la síntesis y la evaluación de muchos nuevos agentes en la búsqueda de compuestos activos con una menor toxicidad.

Con este propósito se ha desarrollado en nuestro grupo de investigación el diseño, la síntesis y la caracterización de nuevos compuestos de coordinación^{35,36} con potencial antineoplásico. Estos nuevos compuestos desarrollados son alrededor de 90; se han evaluado 6 compuestos que han demostrado actividad antineoplásica *in vivo*, y se han patentado 22 compuestos. Estos compuestos son a base de cobre II y se les ha llamado Casiopeínas, cuya fórmula general es $[\text{Cu}(\text{A})(\text{B})]\text{X}$. Para la familia de la Casiopeína I³⁷ A = 4,7-difenil-1,10-fenantrolina, B = aminoácido y X = NO_3^- (ver figura 1.12); lo que varía es la naturaleza del aminoácido. Para la familia de la Casiopeína II A = 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, B = aminoácido y X = NO_3^- .

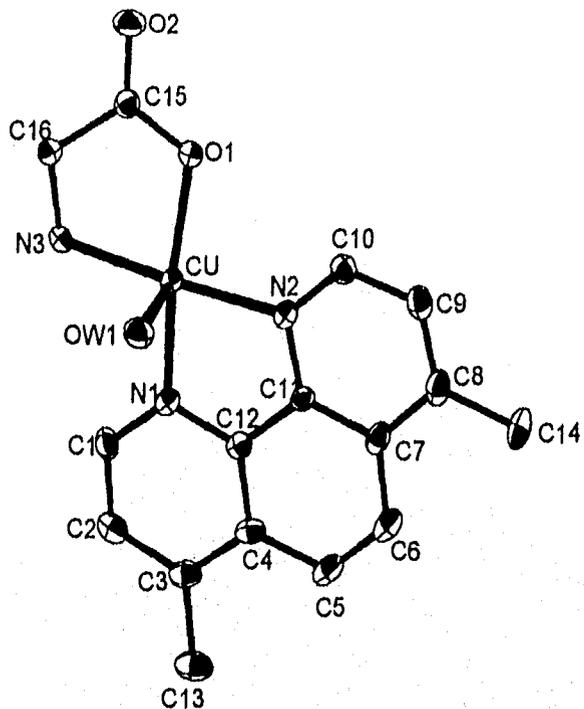
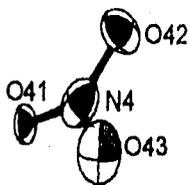


Figura 1.12 Estructura de Rayos X de la Casiopenina I con gli.

A continuación se presenta la figura que representa los diferentes aspectos que constituyen las partes fundamentales del proyecto de desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos:

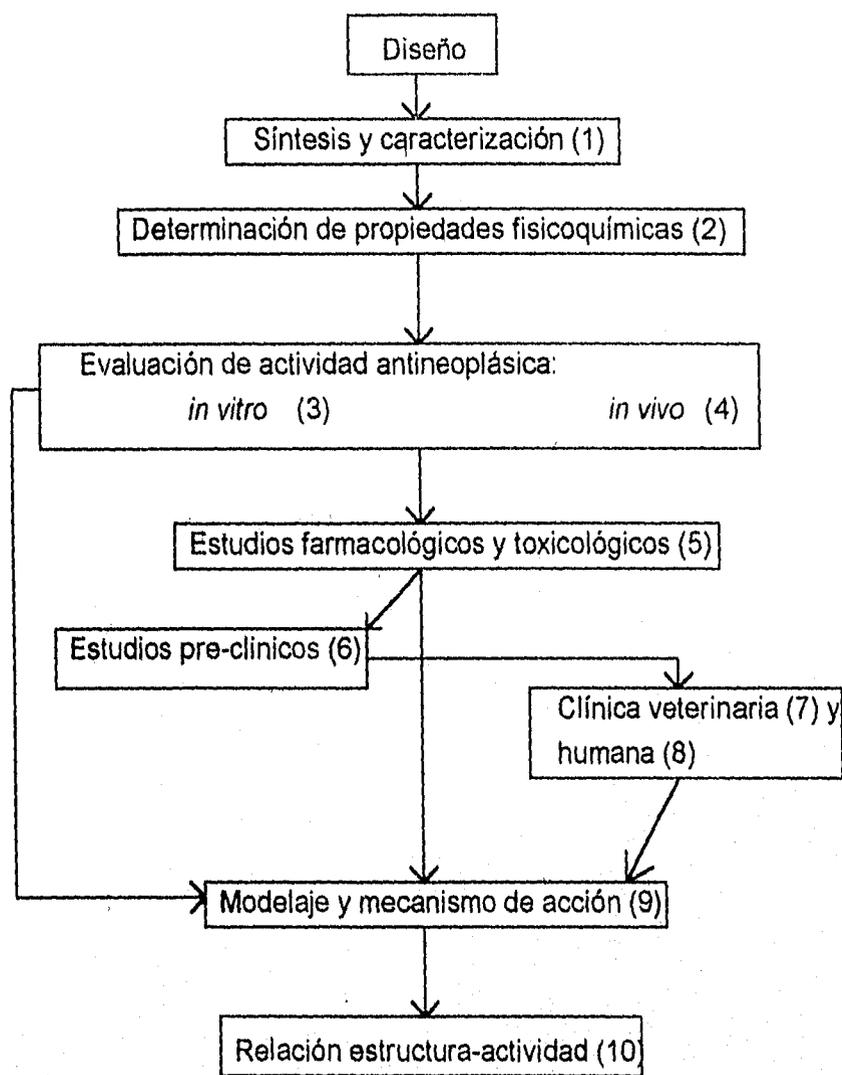


Figura 1.13 Desarrollo de nuevos fármacos.

Las etapas (2) a (7) se encuentran en grados de avance diferentes, la etapa (8) se encuentra en proceso de planificación, la etapa 10 se iniciará cuando se haya avanzado más en los puntos 7, 8 y 9.

La etapa (3) se ha realizado en colaboración con el Instituto Nacional de Cancerología. Se han evaluado tres casiopéptidos, la I, la II y la III sobre cultivo de tejidos de tumores cérvico-uterinos usando como fármacos control, el

cisplatino y la mitomicina. Los resultados muestran que el efecto citostático de las casiopeínas es muy similar a los de los fármacos control.

La etapa (4) se ha llevado a cabo de acuerdo a los protocolos de cernimiento de nuevos productos del National Cancer Institute sobre modelos murinos, con las líneas tumorales L₁₂₁₀, B₁₆, y S₁₈₀. Los fármacos control fueron cisplatino y 5-furacilo. Los resultados muestran que para la primer línea tumoral la casiopeína III es la mas efectiva, mientras que las casiopeínas I y II mostraron mayor efectividad para la última línea tumoral.

Se ha evaluado la toxicidad (LD50) en ratas y ratones dentro de la etapa (5) para las tres casiopeínas, y también se conoce la dosis letal en perros para diferentes vías de administración de la casiopeína I. En esta misma etapa se ha llevado a cabo un estudio farmacocinético de las 3 casiopeínas en ratón y rata.

En el punto (7) se ha llevado a cabo el tratamiento de tumores espontáneos en perros y tumores espontáneos y trasladados en gatos.

Como parte de la etapa (9) se ha obtenido la capacidad mutagénica de la casiopeína I con el método de análisis de la *drosophila melanogaster*, en donde se muestra que la casiopeína actúa vía ataque al ADN ya que se encuentran cambios somáticos en las moscas adultas después de la ingestión de casiopeína durante el estado larvario.

2.- HIPÓTESIS

Se observará mediante el estudio de algunos compuestos de la familia de las casiopeínas I y II con el ADN, algún tipo de interacción entre los compuestos de coordinación y el ADN.

Por otra parte, ya que existen compuestos planos que se intercalan al ADN debido a su geometría y con base en la revisión bibliográfica hecha sobre el tema se sugiere que la intercalación es el método mediante el cual interactúan las casiopeínas con el ADN.

Se espera observar alguna diferencia en cuanto a la manera de interacción de las casiopeínas I y II al cambiar el tamaño y la naturaleza química de los sustituyentes con respecto a la estructura terciaria de la molécula del ADN.

3.- OBJETIVOS

Los principales objetivos de este trabajo son:

- Evaluar el método experimental adecuado que permita obtener resultados confiables y una fácil manipulación del ADN.
- Analizar la posible interacción de las casiopeínas con el ADN.
 - Evaluar si existe dicha interacción.

y si existe:

- que factores intervienen en el proceso.
- proponer un mecanismo de interacción.
- clasificar a las casiopeínas de acuerdo a su manera de interacción.
- proponer nuevas ideas en cuanto al trabajo subsecuente dentro del proyecto de anticancerígenos en las diferentes etapas con las cuales se encuentra directamente relacionado este trabajo (ver esquema pp 36).

4.- PARTE EXPERIMENTAL

4.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CASIOPEÍNAS I Y II

Se sintetizaron y caracterizaron los siguientes compuestos de acuerdo a la metodología ya publicada³⁵:

Casiopeína I:

gli

val

leu

ile

ser

Casiopeína II:

gli

val

leu

ile

ser

his

y se obtuvo el espectro en el IR para cada uno de ellos.

4.2 OBTENCIÓN DEL ADN

Se llevó a cabo una maxipreparación para la obtención del plásmido empleado, el cual se escogió de manera arbitraria. Los plásmidos⁹ son pequeñas moléculas circulares de ADN que se consideran casi como minicromosomas que se replican autónomamente dentro de la célula. Dicho plásmido se purificó mediante el método de gradientes de CsCl, obteniéndose así la forma superenrollada del ADN³⁸.

Después de su obtención los plásmidos se cuantificaron espectroscópicamente suponiendo que 1 unidad de Absorbancia a 260 nm equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ¹¹.

Se obtuvieron y emplearon dos clases diferentes de plásmidos: el pE2Kpn y el pGC9. El primero posee 4,400 p.b. y el segundo 4,377 p.b. Los plásmidos se usaron de manera indistinta en la parte experimental ya que ambos originan el mismo número de bandas y posición en los geles de agarosa.

Se utilizó la enzima de restricción Bam HI para obtener así la forma lineal del ADN a partir de la forma superenrollada. La forma lineal posee el mismo número de p.b. que su ADN predecesor.

4.3 ELECTROFORESIS EN GEL

Es un método estándar que se lleva a cabo debido a la migración de partículas cargadas a través de un campo eléctrico fijo, la cual depende tanto de la carga como del tamaño de la partícula que se emplea para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN¹¹ de manera simple, rápida, además de ser capaz de separar fragmentos del ADN que no pueden ser separados de manera adecuada mediante otros procedimientos. Es por esto que se decidió utilizar esta técnica para comprobar si existe o no interacción entre el ADN y las Casiopeínas.

4.3.1 PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA

El buffer de TBE 1X (Tris, ácido bórico, EDTA), el colorante azul de bromofenol y la solución de bromuro de etidio se prepararon de acuerdo a lo descrito en la literatura²¹.

La concentración de todos los geles de agarosa fue de 0.8%, y la forma de preparación fue la siguiente:

Se disolvieron 0.64 g de agarosa grado electroforético en 80 ml de TBE 1X en un matraz erlenmeyer. Se calentó el matraz hasta la disolución completa de la agarosa, se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que el matraz se pudiera tocar con la mano, se le adicionaron 5 μ l de bromuro de etidio con concentración 10 mg/ml, se agitó con la mano (utilizando guantes) y se vertió el gel en la cámara electroforética previamente limpia y acondicionada con los peines electroforéticos. Se esperó a que el gel solidificara (turbio), se retiraron los peines y se cubrió el gel con buffer de TBE1X.

Por otra parte, se preparó una solución patrón 1 E-3 M de Casiopeína para todos los experimentos, ya sea I o II. De esta solución patrón se hicieron 3 diluciones más para tener así 4 concentraciones diferentes de cada compuesto:

1 E-3

8 E-4

5 E-4

1 E-4

Las soluciones de Casiopeína I, tanto para el ADN lineal* como el superenrollado, se prepararon en etanol al 5 %, ya que los compuestos son insolubles en agua y solubles en etanol. Todos los compuestos de Casiopeína II se disolvieron en agua.

Se llevó a cabo un estudio electroforético con todos los compuestos de las dos familias de Casiopeína, en las mismas condiciones experimentales, con

* salvo para la leu e lle con el ADN lineal en donde se empleó DMSO.

ADN superenrollado de aproximadamente 4 k.b. y con ADN lineal de aproximadamente 4 k.b.

Se utilizaron diferentes tiempos de incubación (ver figura 4.1, página 45):

1. sin incubar.
2. 10 minutos.
3. 15 minutos.
4. 30 minutos.

y la temperatura de incubación siempre fue de 37 °C.

El gel se dividió en 2 partes: la superior y la inferior, cada una con 10 carriles, por tanto se pudieron asignar 4 grupos de 5 carriles cada uno, 2 grupos superiores, el 1 y 2 (sin incubar y 10 min respectivamente) y 2 inferiores, el 3 y 4 (15 y 30 min respectivamente). Cada grupo se ennumeró del 1 al 5.

Las concentraciones que se emplearon para cada grupo en todas las Casiopeinas fueron:

$$a = 1 \text{ E-3}$$

$$b = 8 \text{ E-4}$$

$$c = 5 \text{ E-4}$$

$$d = 1 \text{ E-4}$$

Cada grupo de carriles se preparó así:

Carril 1	DNA 1 μ l + disolvente 19 μ l + 3 μ l azul de bromofenol
Carril 2	DNA 1 μ l + a 8 μ l + disolvente 11 μ l + 3 μ l azul de bromofenol
Carril 3	DNA 1 μ l + b 8 μ l + disolvente 11 μ l + 3 μ l azul de bromofenol
Carril 4	DNA 1 μ l + c 8 μ l + disolvente 11 μ l + 3 μ l azul de bromofenol
Carril 5	DNA 1 μ l + d 8 μ l + disolvente 11 μ l + 3 μ l azul de bromofenol

El contenido de cada carril se preparó previamente en un tubo ependorf estéril, y el volúmen final entonces fué de 23 μ l donde el contenido de los 5 carriles antes mencionado se preparó en serie 4 veces:

- El 1er grupo fueron las muestras sin incubar.
- El 2o grupo fueron las muestras con 10 min de incubación.
- El 3er grupo fueron las muestras con 15 min de incubación.
- El 4o grupo tuvo 30 min de incubación.

El tiempo de corrida de cada gel fue de aproximadamente 2 h 30 min con una corriente constante de 50 Volts. Los ácidos nucleicos se visualizaron utilizando una lámpara de UV, obteniéndose la fotografía correspondiente.

A continuación se presenta a manera de ejemplo un gel en donde se muestra la distribución y contenido del gel:

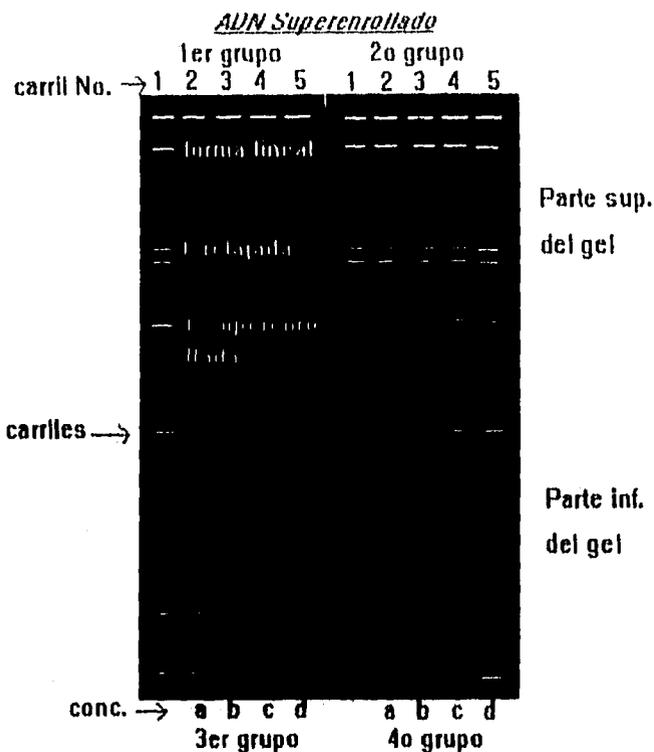


Figura 4.1 Distribución y ejemplificación de un gel de agarosa.

4.4 ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los compuestos que se estudiaron mediante esta técnica fueron:

Casiopeína II gli

Casiopeína II val

Casiopeína II ser

Se preparó una solución patrón del buffer MES 5×10^{-2} M, la cual se neutralizó con ácido nítrico hasta alcanzar un pH = 6.8. Se tomó 1 ml de esta solución y se llevó a un volumen final de 250 ml para alcanzar una concentración final de MES 2×10^{-4} M. Con esta agua destilada y pH fijo en 6.8 se hicieron las subsecuentes disoluciones y diluciones necesarias.

Todo el material se limpió perfectamente con ácido nítrico diluido y se enjuagó abundantemente, primero con agua de la llave, posteriormente con agua destilada, y finalmente con agua con buffer MES para tener el material de trabajo perfectamente limpio. Esto se realizó al principio de cada experimento.

Se prepararon 10 ml de Casiopeína II (ya sea gli, val o ser) 1×10^{-3} M en agua con buffer. De esta solución se prepararon 25 ml de Casiopeína 2×10^{-5} M. Con esta solución se prepararon las diferentes diluciones con las que se trabajó.

Se tomó un volumen de 1 ml con una pipeta volumétrica con la mayor exactitud posible de la disolución de Casiopeína y se vertió en un matraz aforado de 10 ml, después se tomaron 2 ml de la misma disolución 2×10^{-5} M de Casiopeína y se vertieron en otro matraz aforado de 10 ml, así sucesivamente para 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 ml.

Una vez que se obtuvieron estos 9 matraces se prosiguió a completar a un volumen final de 10 ml para cada uno de los matraces, es decir, al matraz que contenía 1 ml de sol. de Casiopeína II se le adicionaron 9 ml de agua con buffer MES, al matraz con 2 ml se le adicionaron 8 ml de agua, etc.

Nuevamente se emplearon pipetas volumétricas para adicionar el agua restante en cada matraz para completar un volumen final de 10 ml. Se prefirió seguir este camino al de aforar cada matraz hasta completar el aforo, ya que se observó en los espectros electrónicos que aforando se obtenían errores graves en las concentraciones finales obtenidas, y ya que las concentraciones que se están trabajando son tan pequeñas se decidió completar los volúmenes con pipetas volumétricas, obteniéndose así buenos resultados. Se agitaron y mezclaron perfectamente los 9 matraces con un vortex. De cada uno de los 9

matraces se tomó 1 ml y se depositó en un tubo ependorf. Esta operación se hizo por duplicado, obteniendo así 2 tubos ependorf con la solución de cada matraz, obteniendo así 9 pares. El ml de disolución se midió con pipetas estériles graduadas de plástico desechables, evitando así posibles contaminaciones. La medición se llevó a cabo con extremo cuidado para obtener así dicha cantidad en cada uno de los tubos ependorf.

Al tener así 2 tubos ependorf con 1 ml de la sol. del Matraz 1, a uno de los tubos se le adicionaron 10 μ l de agua con buffer. Se agitó con un vortex. Al otro tubo ependorf se le adicionaron 10 μ l de una solución de ADN 0.5 μ g/ μ l suspendido en HEPES. A ambos tubos ependorf se les adicionó la cantidad de 10 μ l para que la concentración fuera la misma. Se agitó el tubo. A los siguientes tubos se les trató de la misma forma.

Para medir el espectro del ADN solo en cada sesión: se adicionaron 10 μ l de ADN a un tubo ependorf que contenía 10 ml de agua con buffer. Se mezcló bien.

Ya obtenidos los 19 tubos ependorf (9 con Casiopeína, 9 con Casiopeína + ADN y uno con ADN solo) se midió el espectro en la región del UV-visible de 190 a 400 nm a una temperatura constante de 25 °C obtenida con un baño de agua conectado a la celda del aparato. Se cubrió el aparato con una cartulina negra para evitar el paso de la luz del día a la celda y evitar así problemas de difracción.

Una vez medidos los 19 espectros se incubaron los 19 tubos por una hora en un baño de agua a 37 °C. Al final de la incubación se volvieron a medir los espectros de los mismos 19 tubos.

Se emplearon jeringas y agujas nuevas, estériles para verter las muestras de las soluciones con las que se trabajó en la celda de cuarzo, es decir, una para la Casiopeína, una para la mezcla de la Casiopeína + ADN, otra para el agua con buffer, otra para el blanco que fue agua con buffer + HEPES, etc.

Se empleó una celda especial de cuarzo con capacidad de 1 ml. Para limpiar la celda entre una medición y otra, primero se enjuagó con agua destilada con buffer dos veces, y finalmente se enjuago con una pequeña alícuota de la solución a medir, siempre trabajando de la concentración menor a la mayor.

Este experimento se realizó por segunda vez, exactamente de la misma manera que la descrita anteriormente.

5.- RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.1 ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LAS CASIOPEÍNAS CON EL ADN MEDIANTE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Primero se analizó la interacción de cada casiopeína con el ADN superenrollado y posteriormente con el ADN lineal, pero antes se presentará un ejemplo de gel con ADN superenrollado y lineal.

Se presenta la siguiente figura para facilitar el entendimiento de la distribución de los carriles en los gels de los diferentes experimentos. El primer esquema es con ADN superenrollado y el segundo es con ADN lineal. La explicación más detallada de los gels se observa en la fig. 4.1 pag.45:

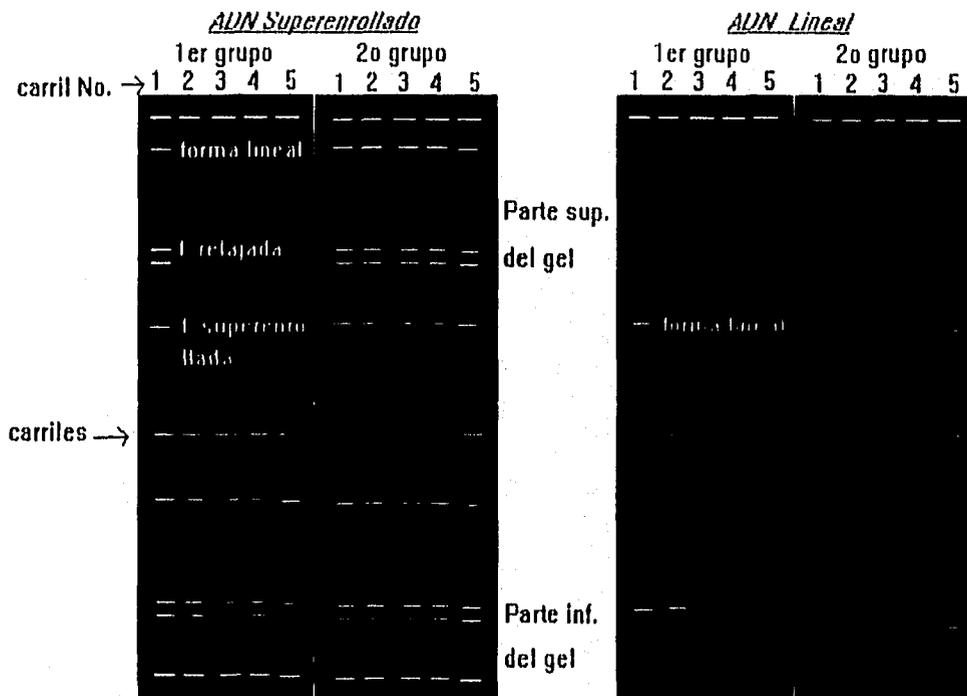


Figura 5.1 Interpretación general de las bandas que presentan las dos formas topológicas del ADN empleadas en este trabajo en un gel de agarosa

Se corrieron las electroforesis en gel para los siguientes compuestos:

1. Cas I gli
2. Cas I val
3. Cas I leu
4. Cas I ile
5. Cas I ser

5.1.1 COMPUESTOS DE CASIOPEÍNA I CON ADN SUPERENROLLADO

A continuación se presentan y analizan los resultados observados:

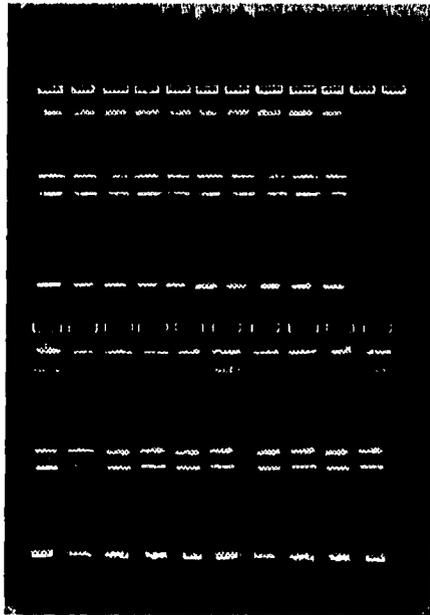


Figura 5.2 Electroforesis en Gel para Cas I gli^{*1}



Figura 5.3 Electroforesis en Gel para Cas I val^{*2}

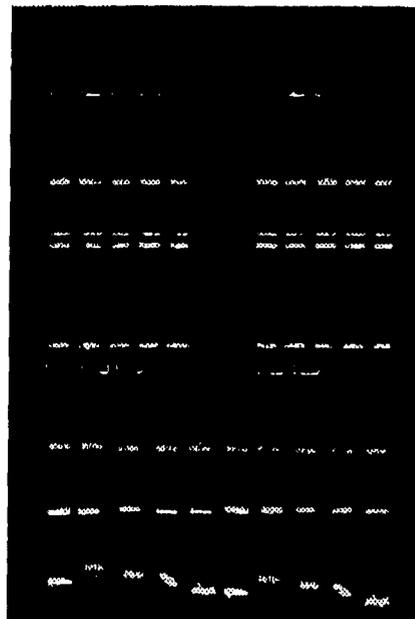


Figura 5.4 Electroforesis en Gel para Cas I leu^{*3}

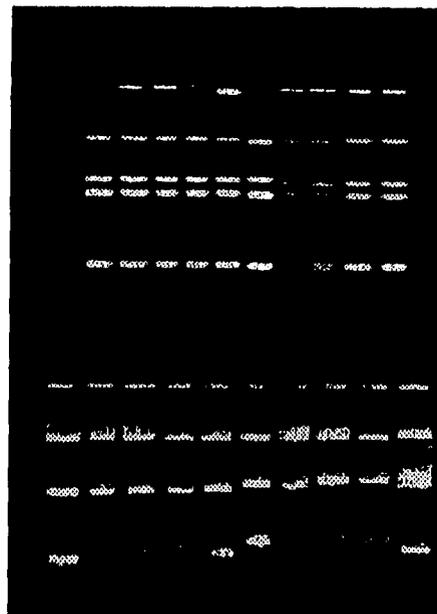


Figura 5.5 Electroforesis en Gel para Cas I ile^{*4}

- *1 Tiempo de corrida = 16h. Corriente Cte = 10V.
- *2 Tiempo de corrida = 4h. Corriente Cte = 50V.
- *3 Tiempo de corrida = 4h. Corriente Cte = 50V.
- *4 Tiempo de corrida = 3h. Corriente Cte = 50V.

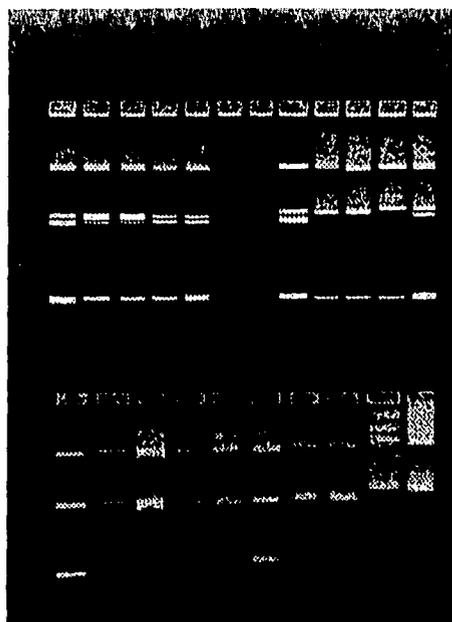


Figura 5.6 Electroforesis en Gel para Cas I ser ^{*5}

Debido a que la posición de las bandas en los geles de los compuestos de Casiopeína I con gli, val, leu e ile con el ADN son muy similares se deduce que la manera de interacción es parecida; por tanto a continuación se describe y discute el comportamiento de las bandas observadas aplicable a los cuatro casos anteriores (el compuesto con Casiopeína-ser se discute aparte ya que el comportamiento es distinto):

1. Los compuestos del grupo de la Cas I, independientemente del aminoácido que contengan, casi no modifican la forma e intensidad de las bandas observadas en el gel.
2. Se observa una ligera disminución en la intensidad de la banda correspondiente a la forma superenrollada del ADN (ver figura 5.1), es decir, la que recorre mayor distancia con el paso del

^{*5} Tiempo de corrida = 4h. Corriente Cte = 50V.

tiempo en el gel, debido a que es la estructura más compacta para este plásmido, y por tanto presenta menor impedimento para desplazarse con la corriente del campo aplicada. Esta disminución en la intensidad puede deberse a que se haya degradado parte del ADN debido a la interacción con el fármaco o que simplemente se forme un nuevo aducto en donde el bromuro de etidio sea desplazado por el compuesto de coordinación y por tanto ya no fluoreszca con la luz UV.

3. La banda correspondiente a la forma superenrollada del ADN es la que más se modifica, debido a que se retarda su movilidad. Esto se acentúa a medida que aumenta tanto la concentración de la Casiopeína como el tiempo de incubación entre el fármaco y el ADN; esto es debido a que se forma un complejo con mayor peso molecular al del ADN sin fármaco, y por lo tanto migra más despacio. Este efecto se atribuye sin duda a la presencia de la Casiopeína ya que conforme la concentración de Casiopeína disminuye la banda adquiere la misma movilidad que la del ADN sin fármaco.
4. Se observa un cambio en una de las dos bandas que corresponde a las formas relajadas del ADN, ya que se presenta menos gruesa y menos intensa, y este efecto se observa con mayor claridad a medida que se incuba con mayor tiempo la muestra, y que la concentración usada es mayor. En esta forma estructural del ADN, aunque los nucleótidos se encuentran más alejados entre sí por estar más relajada la molécula se alcanza a observar la interacción del fármaco, nuevamente, formando un aducto en donde el EtBr no está igualmente intercalado al ADN como al principio.

5. La forma lineal del ADN prácticamente no se modifica.

Ya que el compuesto Cas I se comporta de manera diferente a los anteriores se analiza por separado:

1. Inclusive en el grupo 1 (ver parte exp. pag. 43) donde no se incubo el ADN ni la Casiopeína se observan cambios y desapariciones tenues en las bandas asignadas a las formas relajada y superenrollada.
2. A los 10 minutos de incubación (gpo. 2, pag. 43), se observa más notoriamente disminución en tamaño e intensidad de la banda de la forma superenrollada.
3. Con 15 min de incubación (gpo. 3) se tiene el tiempo necesario para que la Casiopeína interactúe con todas las formas presentes del ADN, inclusive con la lineal, observándose un barrido en la banda, al igual que para la forma relajada (ver fig. 5.1, pag 49). Para las concentraciones mayores, se observa la desaparición de la banda relajada, y a una concentración un poco menor se observa nuevamente el barrido. Parece ser que la interacción menos fuerte es la que se observa con el barrido de la banda, lo cual se explica mediante el rompimiento de la cadena del ADN, y posteriormente, cuando la interacción es mas fuerte (mayor concentración o tiempo de incubación) desaparece la banda por completo, tal vez rompiendo por completo al ADN o bien formando un nuevo complejo que ya no fluoresce en el UV.
4. En la forma superenrollada (fig. 5.1), desde los 15 min se observa la desaparición completa de esta forma de ADN al interaccionar con la Casiopeína, en cualquier concentración usada.

5.1.2 COMPUESTOS DE CASIOPEÍNA I CON ADN LINEAL

Los compuestos que se estudiaron son los siguientes:

1. Cas I gli
2. Cas I val
3. Cas I leu
4. Cas I ile
5. Cas I ser

En todos los geles únicamente se observa una banda debido a que solo está presente la forma lineal del ADN (ver fig. 5.1).

A continuación se muestran y analizan los resultados:

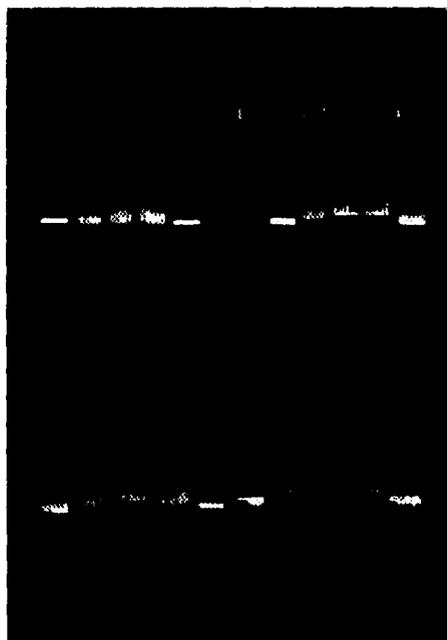


Figura 5.7 Electroforesis en Gel para Cas I gli^{*7} con ADN lineal

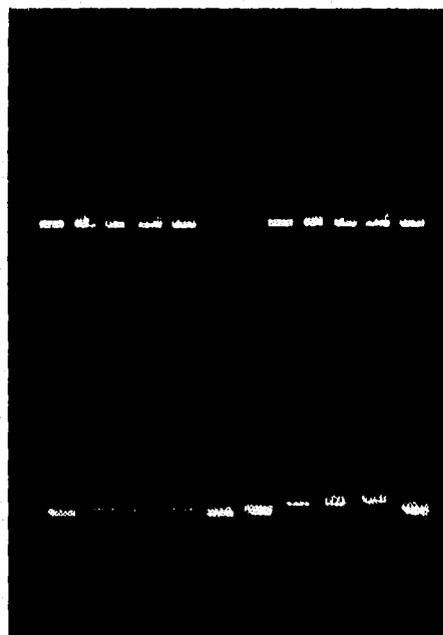


Figura 5.8 Electroforesis en Gel para Cas I val^{*8} con ADN lineal

*7 Tiempo de corrida = 2.5h. Corriente Cte. = 50 V.

*8 Tiempo de corrida = 2.5h. Corriente Cte. = 50 V.

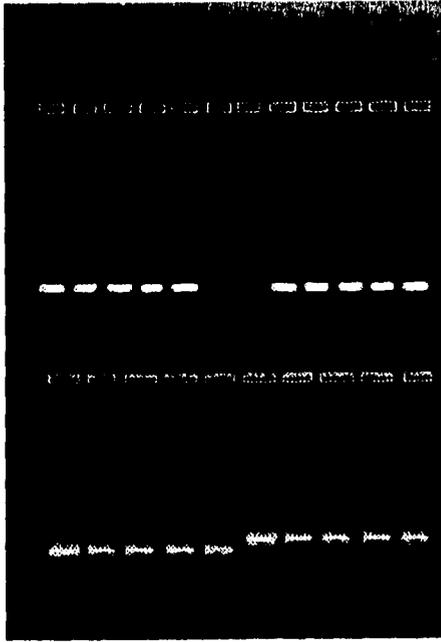


Figura 5.9 Electroforesis en Gel para Cas I leu^{*9} con ADN lineal



Figura 5.10 Electroforesis en Gel para Cas I ile^{*10} con ADN lineal

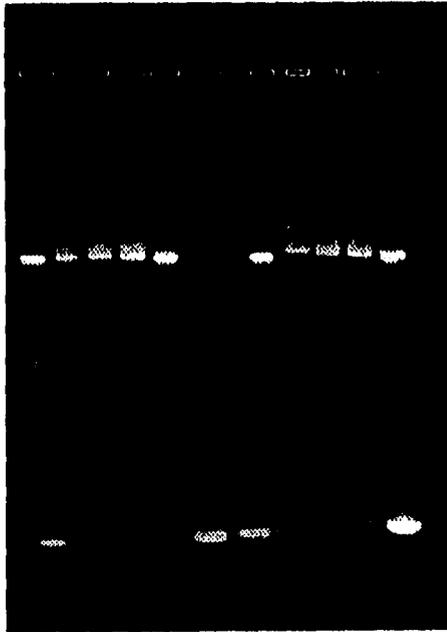


Figura 5.11 Electroforesis en Gel para Cas I ser^{*11} con ADN lineal.

- *9 Tiempo de corrida = 2.5h. Corriente Cte. = 50 V.
- *10 Tiempo de corrida = 2.5h. Corriente Cte. = 50 V.
- *11 Tiempo de corrida = 2.5h. Corriente Cte. = 50 V.

El comportamiento que se observa para casi todos los geles de estos compuestos de Casiopeína I es el mismo:

1. La interacción aumenta al aumentar la concentración de la Casiopeína y el tiempo de incubación.
2. Se observa una clara interacción de los compuestos de Casiopeína I con el ADN lineal, aún sin requerirse de la incubación para ser observada en la mayoría de los casos, ya que se observa un barrido de las bandas en las tres concentraciones más altas, lo cual se puede explicar mediante el corte o la degradación de la cadena del ADN por la Casiopeína. La concentración más baja que se utilizó no fue suficiente para poder observar algún cambio.
3. También se observa un retardo en la movilidad de la banda, es decir, una curvatura entre los 5 carriles que constituyen cada grupo (ver figura 5.1), ya que la banda que corresponde a la concentración más alta de la Casiopeína avanza menos en el gel que la banda del carril en donde no hay Casiopeína, así, conforme la concentración de Casiopeína va disminuyendo, la interacción va siendo menor y la movilidad de la banda se va asemejando a la de la banda sin Casiopeína, por eso se observa una curvatura. Este fenómeno se explica debido a que el compuesto de coordinación interacciona con el ADN formando un nuevo complejo que posee una estructura mucho más abierta y además es más grande, por lo tanto tarda más tiempo en moverse.
4. A medida que aumenta el tiempo de incubación, además del barrido de las bandas se observa una disminución en la intensidad de las mismas, ya que la concentración del ADN inicial libre ya no es la misma porque una parte ya reaccionó con la Casiopeína.

Debido a que tanto la Cas I leu como la Cas I ile son insolubles en agua y parcialmente solubles en etanol al 5 % (ver parte experimental pag. 42), y que los geles de electroforesis en este disolvente no mostraron ninguna interacción apreciable, se decidió llevar a cabo la electroforesis de dichos compuestos en DMSO para descartar la posibilidad de que la falta de interacción se debiera al problema de la solubilidad. El compuesto Cas I ile, a pesar de estar disuelto en otro disolvente presenta el mismo comportamiento descrito anteriormente que para los demás compuestos. El compuesto con leu no presenta interacción, y esto puede deberse a problemas de solubilidad.

5.1.3 COMPUESTOS DE CASIOPEÍNA II CON ADN SUPERENROLLADO

Los compuestos que se estudiaron son los siguientes:

1. Cas II gli
2. Cas II val
3. Cas II leu
4. Cas II ile
5. Cas II ser
6. Cas II his

y las electroforesis en gel de agarosa obtenidas se muestran a continuación:

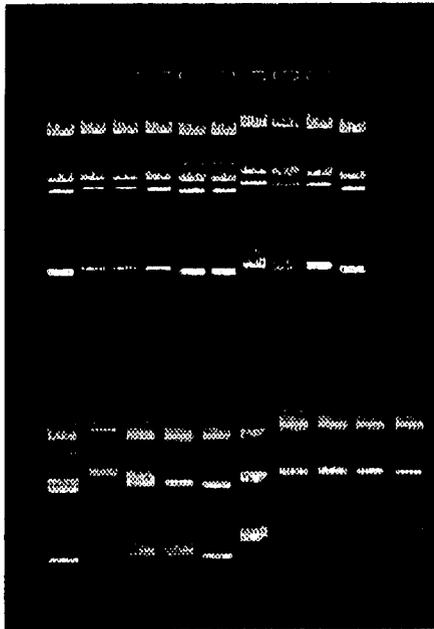


Figura 5.12 Electroforesis en Gel para Cas II gli^{*12} con ADN superenrollado

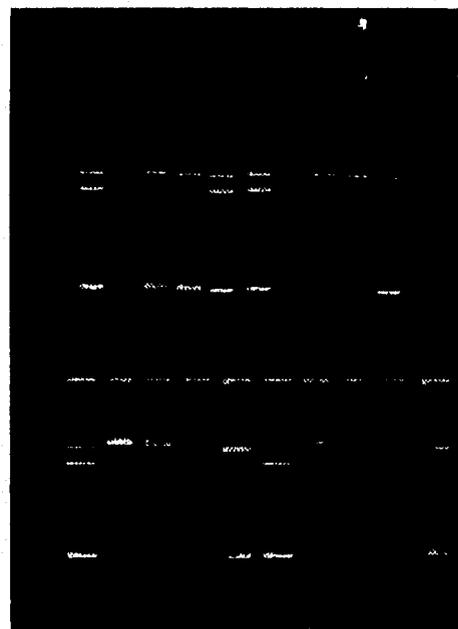


Figura 5.13 Electroforesis en Gel para Cas II val^{*13} con ADN superenrollado

*12 Tiempo de corrida = 3.5h. Corriente Cte. = 50V.

*13 Tiempo de corrida = 16h. Corriente Cte. = 10V.

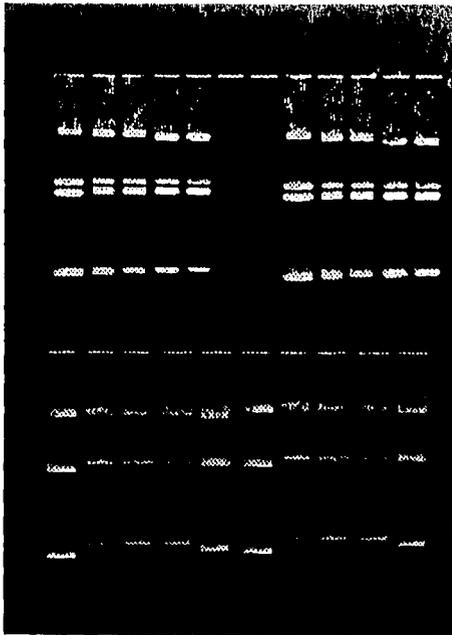


Figura 5.14 Electroforesis en Gel para Cas II leu^{*14} con ADN superenrollado

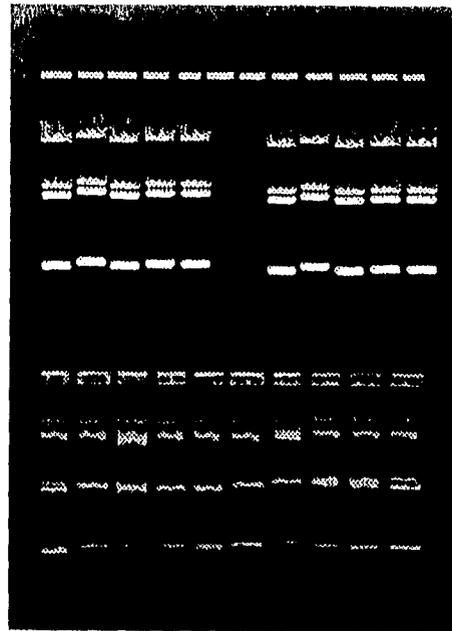


Figura 5.15 Electroforesis en Gel para Cas II ile^{*15} con ADN superenrollado

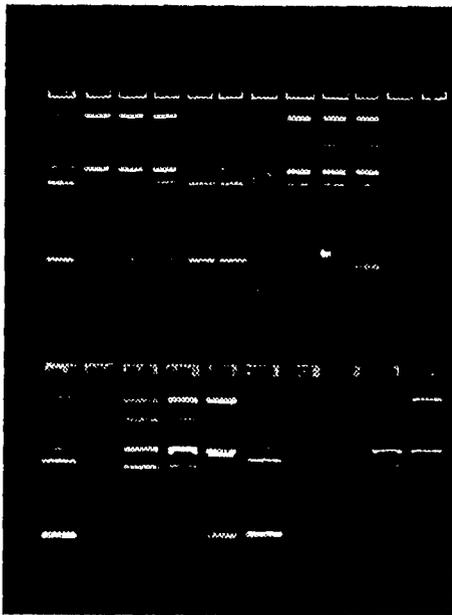


Figura 5.16 Electroforesis en Gel para Cas II ser^{*16} con ADN superenrollado

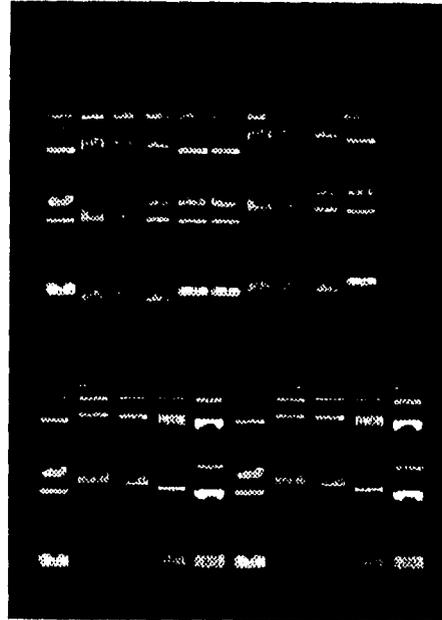


Figura 5.17 Electroforesis en Gel para Cas II his^{*17} con ADN superenrollado

- *14 Tiempo de corrida = 3h. Corriente Cte. = 50V
- *15 Tiempo de corrida = 3h. Corriente Cte. = 50V
- *16 Tiempo de corrida = 16h. Corriente Cte. = 10V
- *17 Tiempo de corrida = 16h. Corriente Cte. = 10V.

Aunque se observan diferentes grados de interacción, en general, todos los compuestos de esta familia de las Casiopeínas interaccionan fuertemente con el ADN superenrollado. A continuación se presenta una discusión sobre los fenómenos observados, la cual se aplica en general a todos los compuestos:

1. El grado de interacción es proporcional a la concentración del fármaco y al tiempo de incubación de las muestras.
2. Aún sin el tiempo de incubación (gpo. 1, fig 5.1) se observa un ligero barrido en las bandas, pero sobre todo, una disminución en la intensidad de la banda correspondiente a la forma superenrollada del ADN, y esta disminución es mucho más marcada si se incuban las muestras a 37 °C, hasta llegar a la completa desaparición de la misma. Esto se explica debido a que la interacción de la Casiopeína es muy fuerte y forma un nuevo complejo en el cual ya no está intercalado el bromuro de etidio y por lo tanto ya no fluoresce.
3. A medida que la interacción se hace más fuerte, por aumento ya sea de la concentración de Casiopeína o del tiempo de incubación, comienza a modificarse también una de las bandas pertenecientes a la forma relajada del ADN, observándose una disminución en la intensidad de dicha banda y una disminución en la movilidad. En este estado topológico del ADN los nucleótidos se encuentran más separados entre sí que con respecto a la forma superenrollada. Se puede decir que el grado de intensidad es casi el mismo para la forma superenrollada que para la forma relajada.
4. Los compuestos de Casiopeína II son capaces de interaccionar aún con la forma lineal de este tipo de ADN (fig. 5.1 gel izquierdo), la cual presenta barrido de la banda en algunas ocasiones, disminución en la intensidad e

inclusive en algunos casos la completa desaparición. Se propone que las causas que provocan estos fenómenos son las mismas que las descritas anteriormente en casos similares.

5. Los compuestos de Cas II con leu e ile, aunque presentan interacción lo hacen en menor proporción, y esto puede deberse a la naturaleza química de los aminoácidos, ya que son los más voluminosos y que poseen una cadena alifática larga (en comparación con la glicina y valina) y por tanto, se ve impedida en cierta medida la interacción y posible intercalación de estos compuestos en el ADN.

5.1.4 COMPUESTOS DE CASIOPEÍNA II CON ADN LINEAL.

Los compuestos que se estudiaron son:

1. Cas II gli
2. Cas II val
3. Cas II leu
4. Cas II ile
5. Cas II ser
6. Cas II his

A continuación se presentan los resultados encontrados:

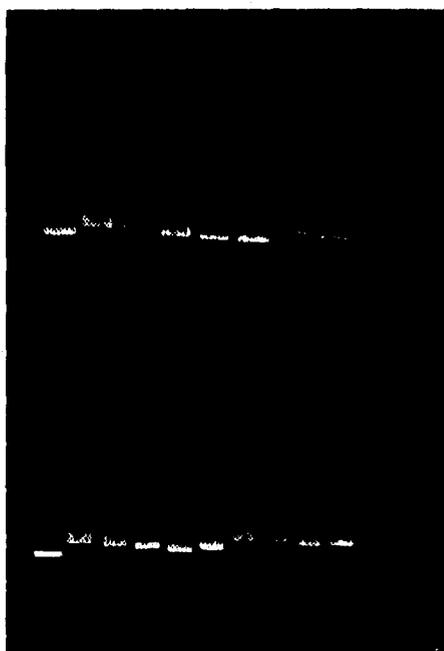


Figura 5.18 Electroforesis en Gel para Cas II gli^{*18} con ADN lineal

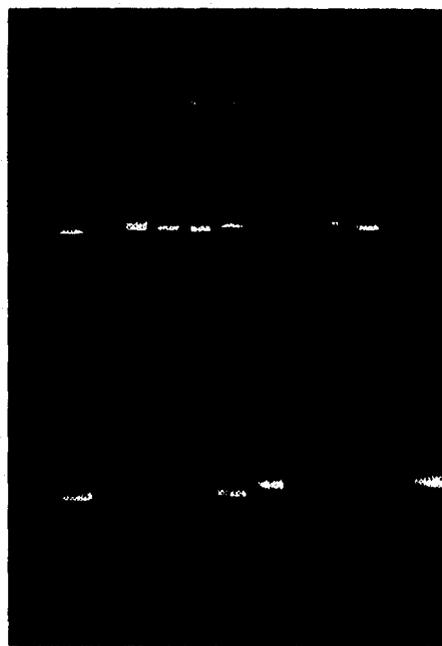


Figura 5.19 Electroforesis en Gel para Cas II val^{*19} con ADN lineal

*18 Tiempo de corrida = 10h. Corriente Cte. = 10V.

*19 Tiempo de corrida = 3h. Corriente Cte. = 50V.

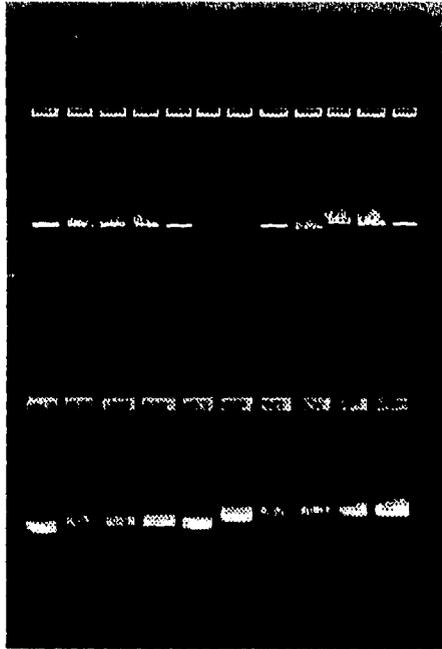


Figura 5.20 Electroforesis en Gel para Cas II leu^{*20} con ADN lineal

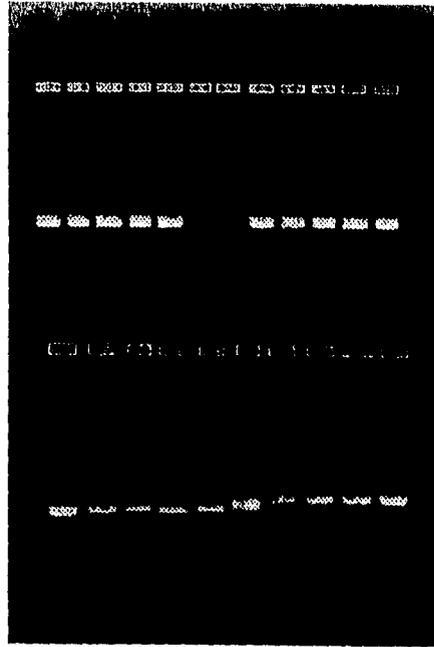


Figura 5.21 Electroforesis en Gel para Cas II ile^{*21} con ADN lineal

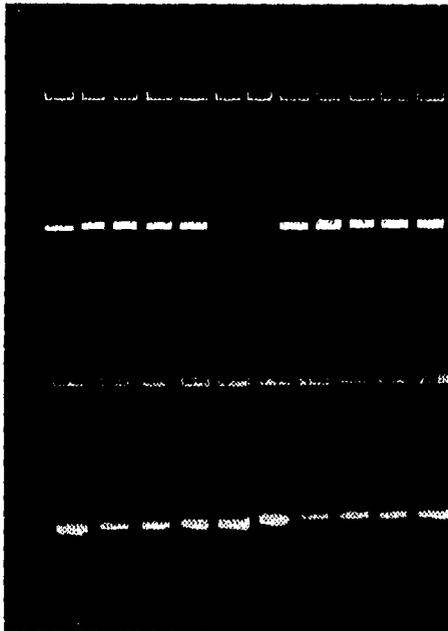


Figura 5.22 Electroforesis en Gel para Cas II ser^{*22} con ADN lineal

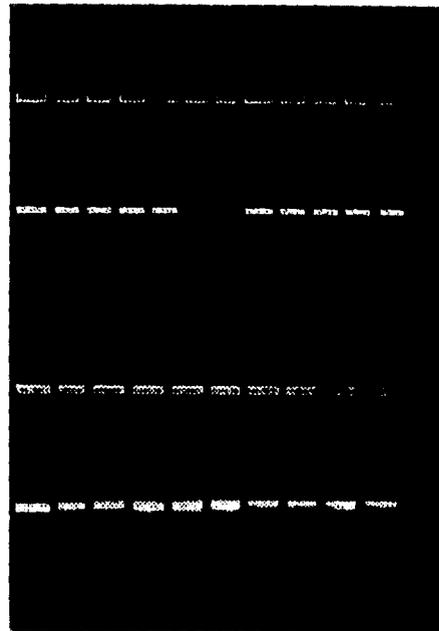


Figura 5.23 Electroforesis en Gel para Cas II his^{*23} con ADN lineal

^{*20} Tiempo de corrida = 2.5h - Corriente Cte = 50.V
^{*21} Tiempo de corrida = 3h - Corriente Cte = 50V

Nuevamente se observa que el comportamiento de esta serie de compuestos frente al ADN lineal es muy similar:

1. La interacción es muy débil.
2. Se observa un ligero aumento en la interacción que es proporcional a la concentración del complejo de coordinación y al tiempo de incubación, aunque este aumento es muy pequeño.
3. Se observa un ligero barrido en la banda y retardo en la movilidad, debido a la interacción de la Casiopeína con el ADN, aunque nunca es de manera intensa.

En las siguientes tablas se pueden resumir los resultados observados para las dos series de Casiopeínas y los dos tipos de ADN:

*²² Tiempo de corrida = 3h. Corriente Cte. = 50V.

*²³ Tiempo de corrida = 2.5h. Corriente Cte. = 50V.

ADN SUPERENROLLADO					
Compuesto	Grado de interacción en general	Cambio de la interacción con la incubación	Cambio obs. en		
			Forma superenrollada	Formas relajadas	Forma lineal
Casgli	L	L	L	L	N
Caslval	L	L	L	L	N
Caslleu	L	M	M	L	N
Caslile	L	F	F	L	N
Caslser	F	F	M.F	F	M
Casllgli	F	F	M.F	M	L
Casllval	M.F	F	M.F	F	L
Casllleu	M	F	F	M	L
Casllile	M	M	M	L	N
Casllser	M.F	F	M.F	M.F	M.F
Casllhis	F	L	M.F	M.F	L

Tabla 5.1 Resultados de electroforesis para las dos familias de casiopéinas con el ADN superenrollado.

ADN LINEAL		
COMPUESTO	Grado de interacción en general	Grado de la interacción con la incubación
Casgli	F	F
Caslval	M	M
Caslleu	N	L
Caslile	M	M
Caslser	M.F	M.F
Casllgli	L	L
Casllval	M	L
Casllleu	L	L
Casllile	L	L
Casllser	L	L
Casllhis	N	N

Tabla 5.2 Resultados de electroforesis para las dos familias de casiopéinas con el ADN lineal.

donde:

N : No existe interacción.

L : Ligera.

M : Moderada.

F : Fuerte.

M.F : Muy Fuerte.

Se puede observar en general que los compuestos de Casiopeína I, para todos los aminoácidos, interactúan ligeramente con el ADN superenrollado, es decir, no se observan cambios muy fuertes en las bandas de los geles, a excepción de la ser en donde la interacción es fuerte.

En contraste, la Casiopeína I con el ADN lineal muestra una interacción muy fuerte, para todos los aminoácidos.

Para los compuestos de la Casiopeína II se puede generalizar un comportamiento observado opuesto al de la Casiopeína I, es decir, sí interactúa fuertemente con el ADN superenrollado y muy levemente con el ADN lineal, en todos los casos.

Al parecer, la interacción entre el complejo de coordinación y la estructura terciaria del ADN está directamente relacionada con el sustituyente de la diimina, y en menor proporción con la naturaleza química del aminoácido que se encuentra directamente unido al átomo de cobre de las Casiopeínas. Es por esto que se observan tendencias generales al comparar la reactividad de la familia de las Casiopeínas y la estructura terciaria de la molécula del ADN, y solamente se observan diferencias en algunos casos particulares para una misma familia en donde el comportamiento es diferente.

Se sabe que compuestos de cobre con geometría plana y sustituyentes voluminosos como pueden ser las fenantrolinas, (como en la Casiopeína I), difícilmente interactúan con el surco menor del ADN ya que se presentan muchos impedimentos estéricos, pero sí es viable la interacción mediante el surco mayor. Debido a esta rigidez en la estructura que presentan estos compuestos se ha observado cierta limitación en cuanto a las maneras de

interaccionar con el ADN, y se ha propuesto a la intercalación como el mecanismo de interacción con el ADN^{31,32}.

Debido a esta rigidez en la estructura de las Casiopeínas I, complejos planos en donde la diimina coordinada al cobre es una fenantrolina disustituída en las posiciones 4,7- por dos fenilos, y debido a la estructura muy compacta que se obtiene en el ADN superenrollado en donde las interacciones entre las bases nitrogenadas son muy fuertes, es difícil que se presente una fuerte interacción entre ambas estructuras rígidas. Cuando se trata de la forma lineal del ADN se contempla el caso contrario, en donde la cadena duplex está totalmente relajada y las interacciones que se dan entre las bases del ADN son menores, por lo tanto, le es más fácil al compuesto de Cu interaccionar y la respuesta observada es mucho más fuerte.

En cuanto a compuestos de fenantrolina con sustituyentes metilos en las posiciones 4,7-, como lo es la Casiopeína II, el tamaño de los sustituyentes disminuye notablemente y el impedimento estérico es menor. Estamos hablando de un compuesto con una geometría mucho más flexible la cual puede llevar a cabo interacciones via surco mayor e inclusive interacciones via surco menor^{30,32}. Con base en el análisis anterior y en la información bibliográfica reportada se puede proponer que la interacción entre la Casiopeína II y el ADN superenrollado se vea favorecida, ya que es "fácil" para el compuesto interaccionar con varias de las porciones del ADN, las cuales se encuentran juntas y disponibles, y la intercalación se vería favorecida. En cambio, para el ADN lineal, aquí están más alejadas las bases y por tanto las probabilidades de que el fármaco interaccione son menores.

Durante una electroforesis en gel de agarosa, la migración de la molécula del ADN es una función tanto del tamaño como de la conformación de la molécula, y las diferencias en la movilidad electroforética son resultado

únicamente de diferencias en la conformación del plásmido³⁹. En todos los casos analizados en donde se observa un cambio en la movilidad de la banda en el gel se obtuvo un retardo. Esto sólo se puede explicar mediante la formación de un complejo entre el ADN y el fármaco en donde éste abra o desenrolle a la cadena superenrollada del ADN, la expanda y forme así una estructura que migre más lentamente en el gel. Esto puede explicarse mediante un superenrollamiento negativo, es decir, un desenrollamiento de la doble hélice, en sentido opuesto al de las vueltas que la enrollan²².

5.2 ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA

El método espectrofotométrico se basa en el cambio observado en el espectro de absorción del ligante que es enlazado a los ácidos nucleicos para determinar si existe interacción y de que tipo. En este trabajo se llevó a cabo un estudio espectroscópico para estudiar el tipo de interacción existente entre las casiopeínas y el ADN.

Se obtuvieron los espectros electrónicos en el UV-visible para los siguientes compuestos:

Cas II gli

Cas II val

Cas II ser

Se emplearon 9 concentraciones para cada uno de los 3 compuestos, las cuales se escogieron arbitrariamente y siempre fueron las mismas en todos los experimentos y para los tres compuestos, en donde C_1 es la más pequeña y C_9 es la más grande. Los aumentos en las concentraciones para llegar de C_1 hasta C_9 son exactamente iguales entre concentración y concentración, y son las siguientes:

C_1 : 1.98E-6 M

C_2 : 3.96E-6 M

C_3 : 5.94E-6 M

C_4 : 7.92E-6 M

C_5 : 9.90E-6 M

C_6 : 1.188E-5 M

C_7 : 1.386E-5 M

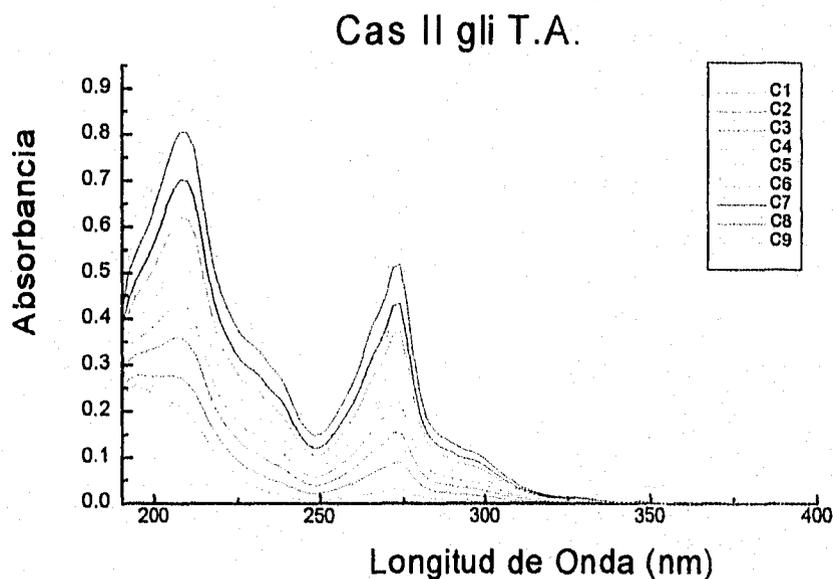
C_8 : 1.584E-5 M

C_9 : 1.782E-5 M

y únicamente se van a analizar los espectros en la región del UV, ya que la banda que se observa en la región del visible asignada a transiciones d-d del metal es mucho menos intensa, y no es posible observar dicha banda debido a que no se pueden usar concentraciones más grandes de casiopeína en los experimentos porque la concentración del ADN que se puede emplear es muy pequeña, por lo tanto se obtendrían los espectros en diferentes escalas, y los cambios que se desean obtener, si es que existe interacción entre las casiopeínas y el ADN no se observarían y serían muy difíciles de cuantificar.

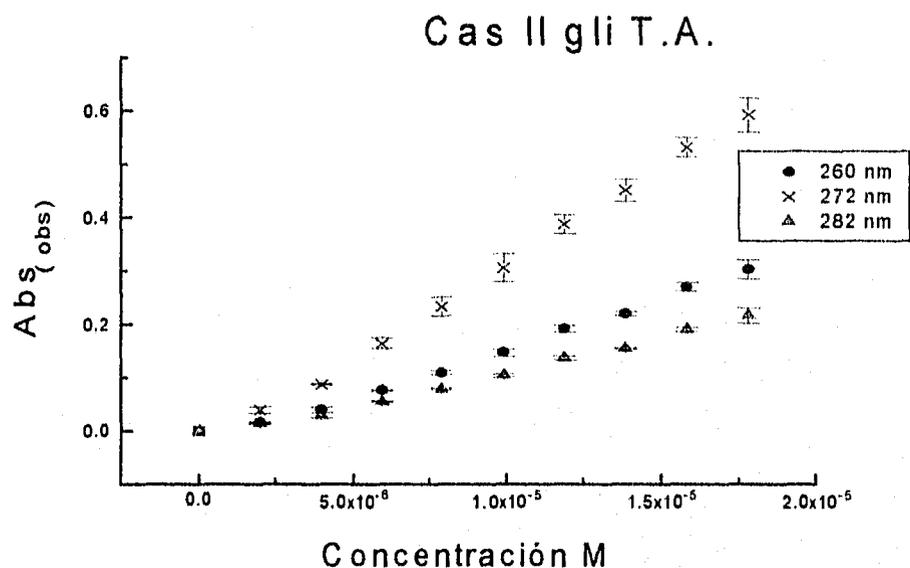
5.2.1 COMPUESTO CAS II gli:

A continuación se presentan los espectros obtenidos para las 9 concentraciones a 25 °C:



Gráfica 5.1 Espectros electrónicos de la Cas II gli a 25 °C.

y a continuación se presenta la gráfica de absorbancia vs. concentración a 3 diferentes longitudes de onda que fueron escogidas arbitrariamente alrededor de los 272 nm, que es donde se presenta el máximo de absorción que corresponde a las transiciones electrónicas entre los orbitales π del anillo de la fenantrolina y es ahí en donde se van a analizar los subsecuentes cambios en los espectros:



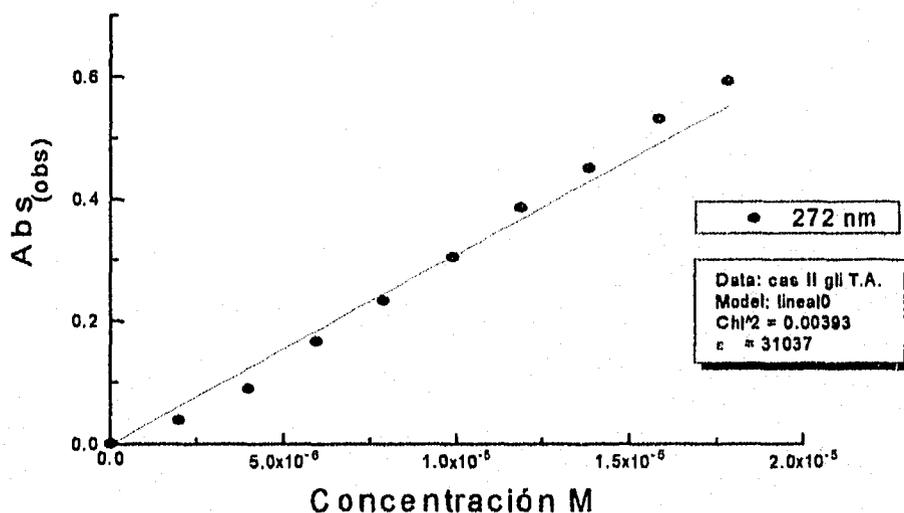
Gráfica 5.2 Gráfica de Abs. vs concentración para la Cas II gli a 260, 272 y 282 nm a 25 °C.

en donde se observa que se obtuvo una línea recta, obteniendo una correlación a los 272 nm de 0.99782.

En los otros valores de longitud de onda también se observa una recta, pero solamente se procederá a utilizar la longitud de 272 nm porque como se observa en la gráfica, $\Delta A/\Delta C$ es mayor.

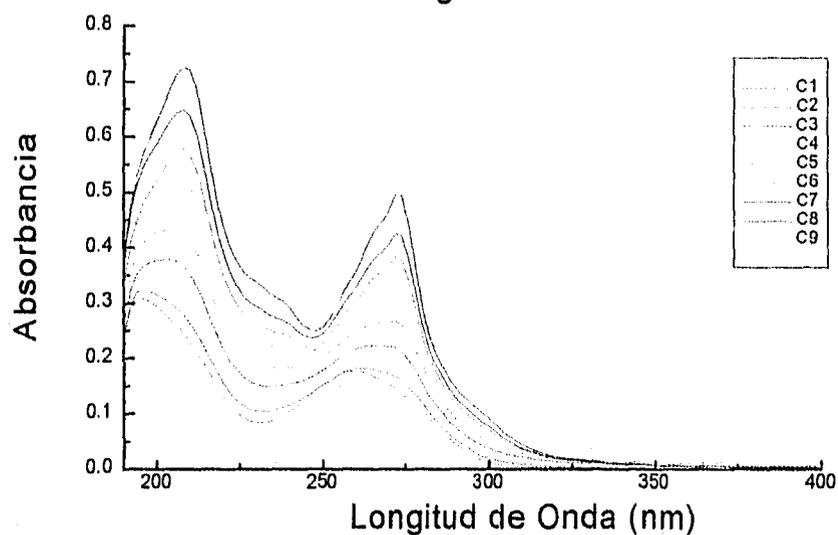
Se ajustó al 0 la línea recta a los 272 nm y la pendiente obtenida ($\epsilon = 31037$) es ahora el valor del coeficiente de extinción (gráfica 5.3). Con este valor se recalculó el valor de absorbancia a 272 nm para las soluciones de casiopeína sola (es decir, sin ADN), ya que las concentraciones son conocidas, mediante la ecuación $A = \epsilon lc$. A estos nuevos valores de absorbancia de la casiopeína sola se les sumó el valor de absorbancia del ADN solo (sin casiopeína) a 272 nm, que siempre es el mismo ya que la concentración del ADN es constante, y finalmente, a este valor de absorbancia, se le restó el valor de absorbancia para el complejo ADN-Casiopeína (gráfica 5.4) formado a partir de la mezcla experimental del ADN y las 9 diferentes concentraciones de casiopeína empleadas, todo esto a T.A. (Gráfica 5.5).

Cas II gli T.A ajustada a 0



Gráfica 5.3 Gráfica de absorbancia vs concentración ajustada a 0 para la Cas II gli a 25 °C.

Cas II gli + ADN T.A.

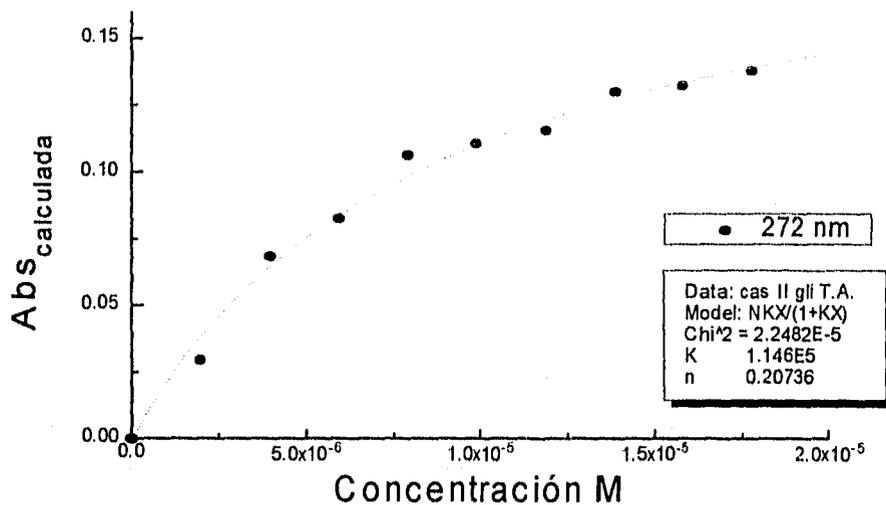


Gráfica 5.4 Espectros electrónicos de la Cas II gli + ADN a 25 °C.

En la gráfica 5.4, la forma del espectro es parecida a la del espectro de la casiopeína sola, salvo que a medida que se aumenta la concentración de casiopeína (a una concentración de ADN constante) el máximo de absorbancia alrededor de los 272 nm se va desplazando hacia la derecha (efecto batocrómico).

Aquí se presenta la gráfica que se obtiene de graficar el valor de absorbancia que es producto de la operación algebraica antes descrita contra la concentración:

Cas II gli T.A.



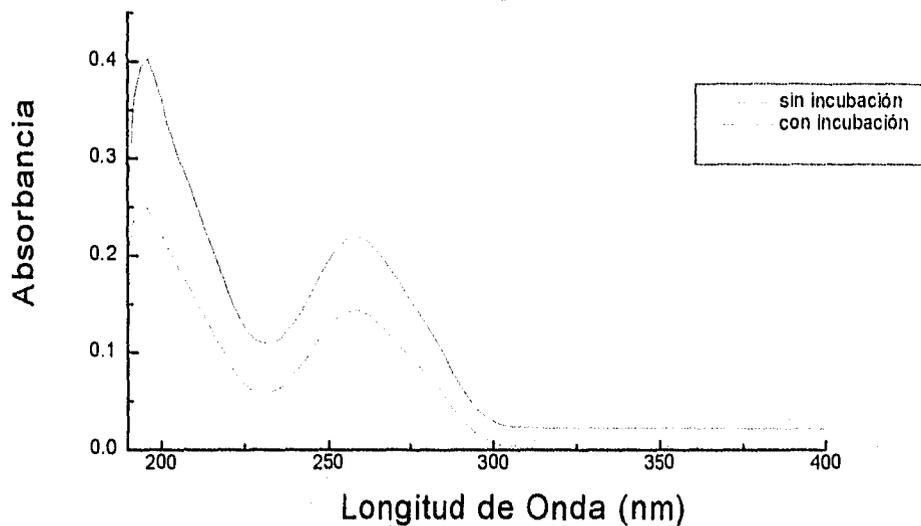
Gráfica 5.5 Gráfica del valor de absorbancia resultante vs concentración de la Cas II gli a 25 °C.

y de acuerdo a la forma de la gráfica se puede decir que la reacción puede ser explicada mediante un modelo de enlace simple, ya que la tendencia que se observa en la gráfica es clara.

A continuación se presentan todos los espectros de las mismas muestras antes estudiadas pero ahora después de haber sido incubadas por 1 h a 37 °C con la finalidad de observar si es que existe algún cambio fundamental de dichos compuestos después de ser sometidos a esa temperatura (muy parecida a la fisiológica).

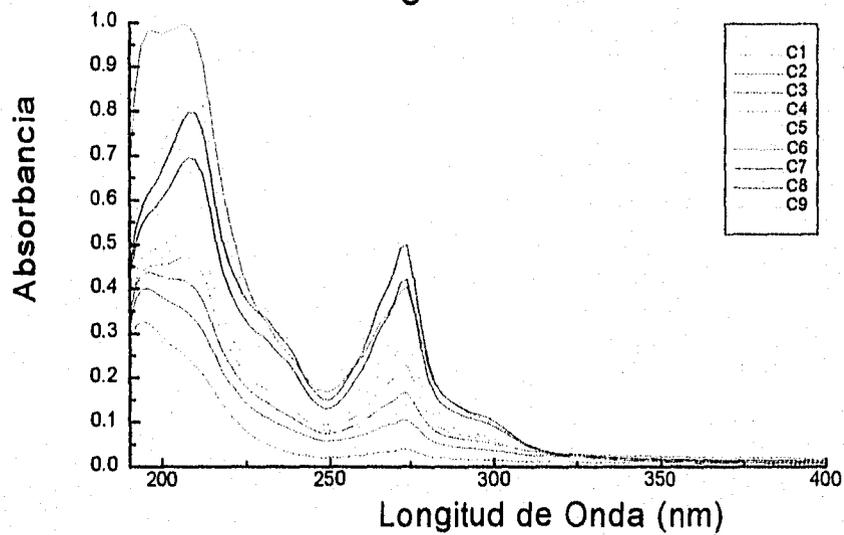
En el espectro del ADN solo (sin casiopeína) se observa básicamente el mismo tipo de espectro, la única diferencia es un pequeño aumento en la absorbancia en general en todo el espectro en el caso de la incubación, pero esto se explica debido a una probable evaporación del disolvente durante el baño María, pero la forma de la banda y su valor de absorbancia máxima no varía.

DNA incubado y sin incubar



Gráfica 5.6 Espectros electrónicos del ADN solo incubado a 37 °C y sin incubado a 25 °C.

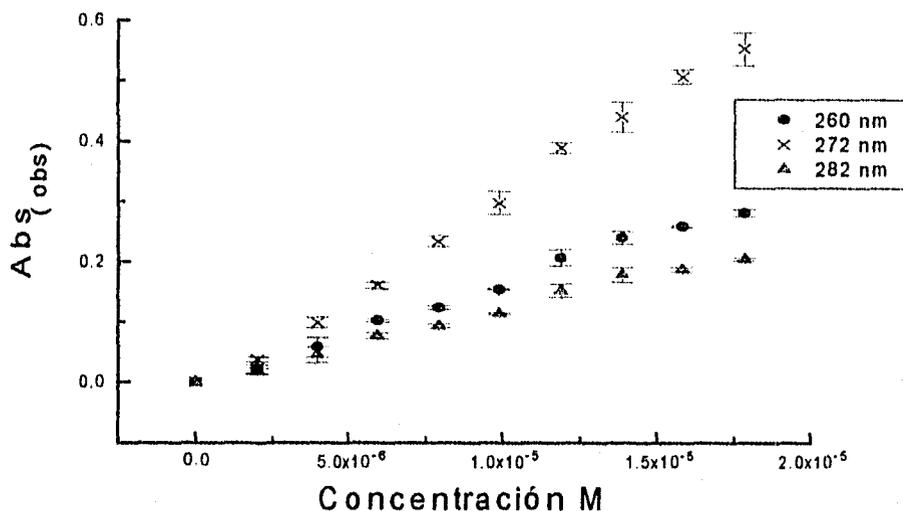
Cas II gli incubada 37c



Gráfica 5.7 Espectros electrónicos de la Cas II gli después de incubarla 1 h a 37 °C.

Observamos que aún después de la incubación se mantiene la linealidad y se sigue trabajando bajo la ley de Beer, sobre todo a los 272 nm:

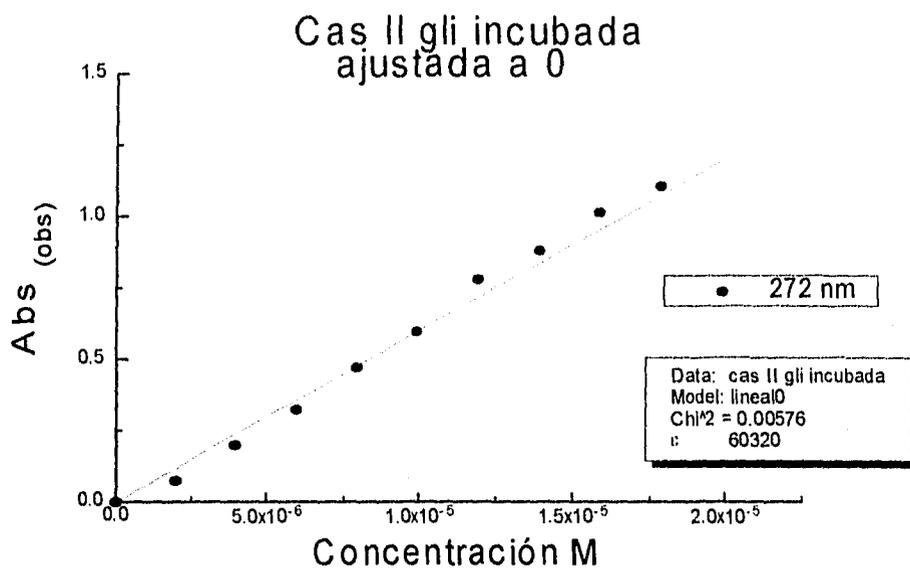
Cas II gli incubada 37 C



Gráfica 5.8

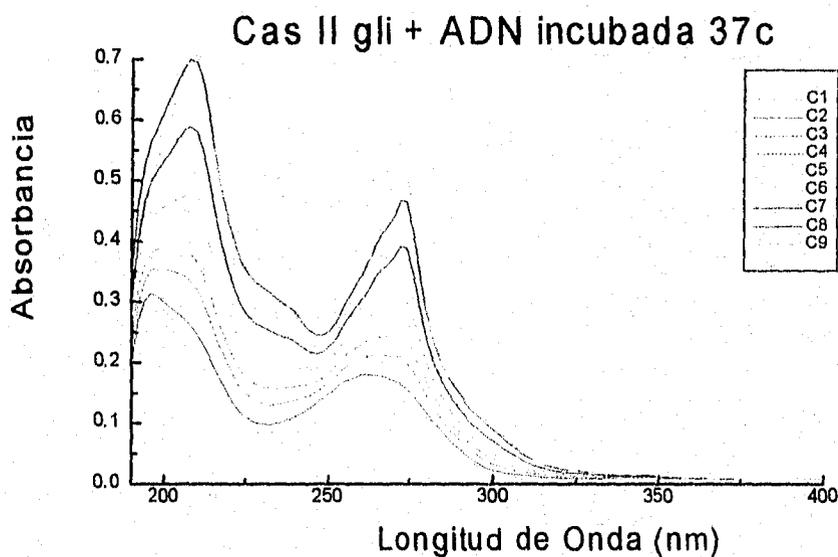
Gráfica de absorbancia vs concentración de la Cas II gli después de incubar 1 h a 37 °C.

Nuevamente se ajusta a 0 la línea recta obtenida a los 272 nm para calcular un nuevo valor de absorbancia de la casiopeína sola mediante el coeficiente de extinción extraído de la pendiente, cuyo valor es de 60320, el cual se incrementó casi al doble después de la incubación.



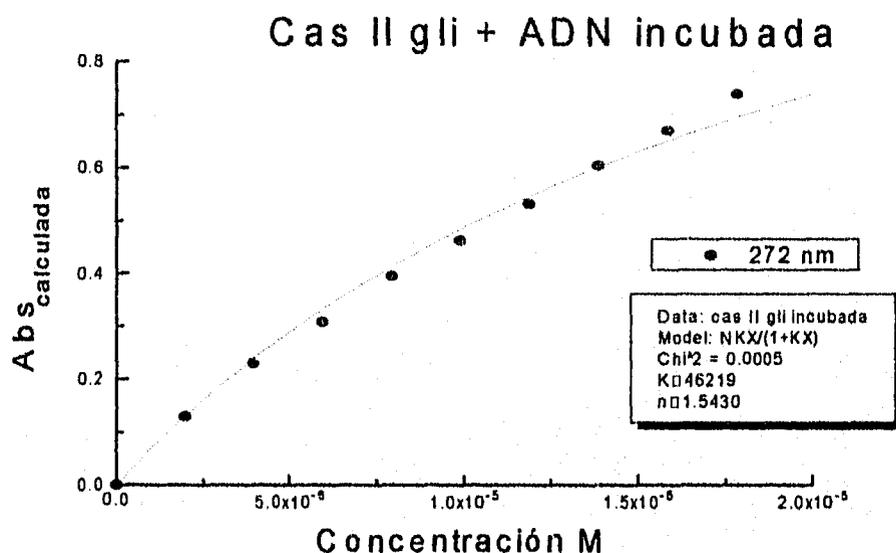
Gráfica 5.9 Gráfica de cas II gli incubada a 37 °C y ajustada al 0.

Este es el espectro del compuesto del fármaco con el ADN después de incubar, y se sigue observando el mismo corrimiento del máximo de absorción a valores de mayor energía.



Gráfica 5.10 Espectros electrónicos de la Cas II gli + ADN incubada 1 h a 37 °C.

Con el valor calculado de absorbancia a 272 nm para la casiopéina incubada, el valor de absorbancia del ADN solo incubado y el valor del compuesto fármaco-ADN incubado, se obtuvo la siguiente gráfica, de la misma manera que la descrita anteriormente para los compuestos sin incubar, y se vuelve a obtener una curva, la cual se explica mediante un modelo de enlace simple:



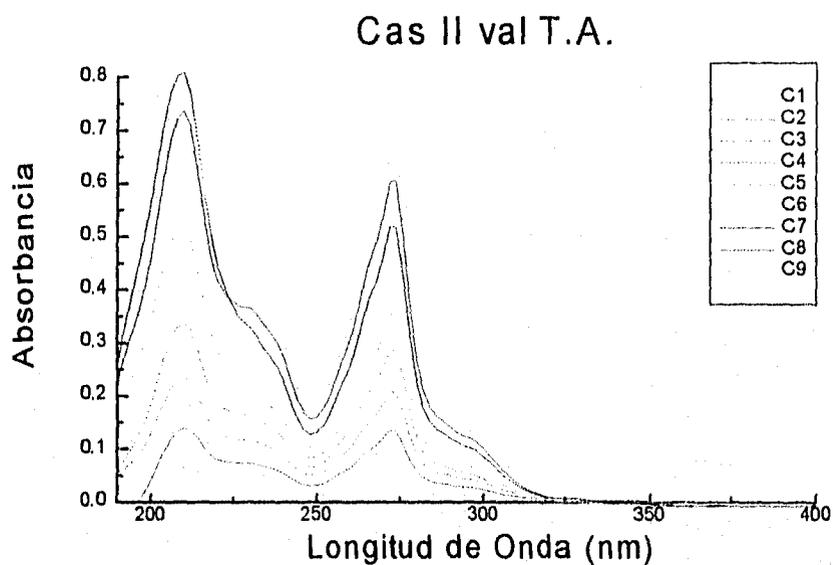
Gráfica 5.11

Gráfica de absorbancia calculada contra concentración para las muestras incubadas a 37 °C.

y se puede observar que el valor de la constante de asociación disminuyó a un poco menos de una tercera parte del valor de la constante sin incubar, además de que el número de sitios de enlace en el ADN aumentó notablemente.

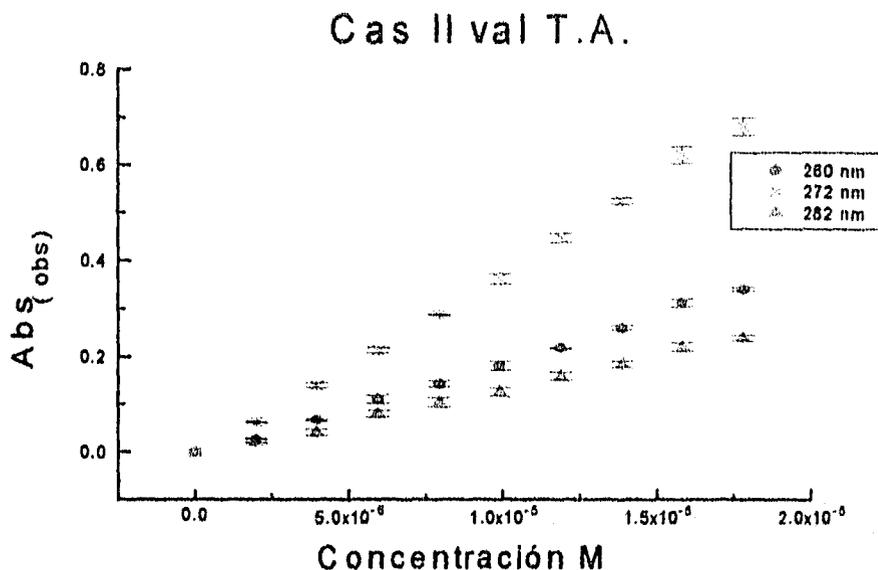
5.2.2 COMPUESTO CAS II val.

Se llevaron a cabo la misma serie de espectros que se obtuvieron para el compuesto con gli pero ahora con val, tanto a T.A. como con una hora de incubación, con el fin de conocer nuevamente el valor de la constante de asociación y el número de sitios enlazados en el ADN:



Gráfica 5.12 Espectros electrónicos de la Cas II val a T.A.

y para corroborar que se estaba trabajando experimentalmente con valores de concentración que forman una línea recta bajo la ley de Beer se hizo la siguiente gráfica:

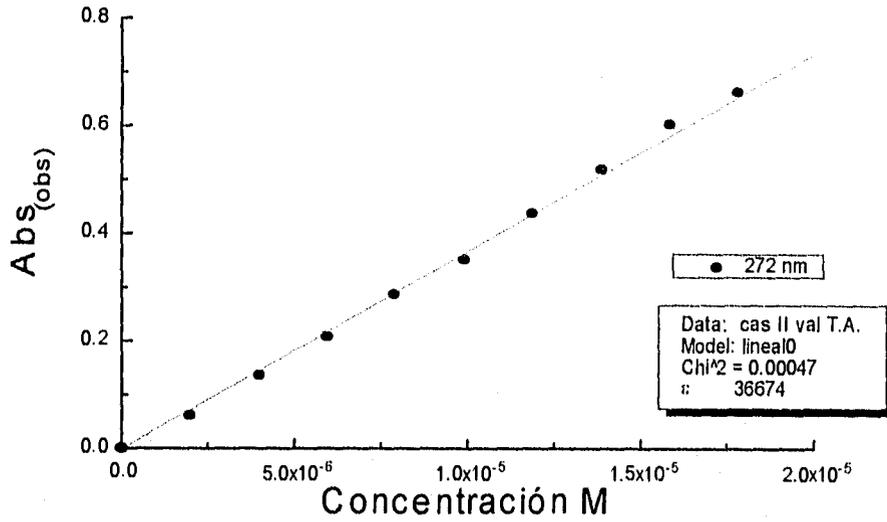


Gráfica 5.13 Gráfica de absorbancia vs. concentración de la Cas II val a T.A.

en donde se observa una línea recta en los 3 diferentes valores de longitud de onda. En la recta a 272 nm se obtuvo una correlación de 0.99953, y nuevamente se va a elegir este valor de longitud de onda para las subsecuentes gráficas y análisis, y para poder hacer una comparación de estos resultados con los obtenidos con el compuesto de gli.

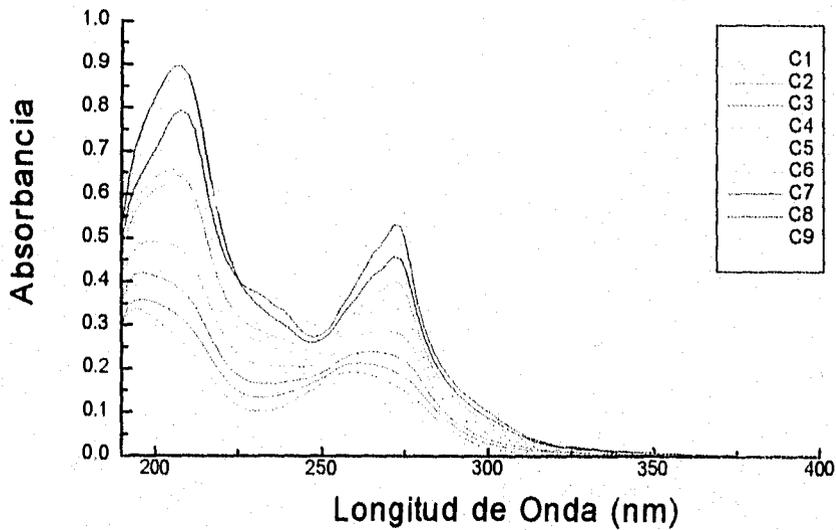
Se tomó la recta obtenida a los 272 nm y se ajustó la pendiente para que pasara por el cero. El resultado de la pendiente, o bien, el coeficiente de extinción para la CasIIval a 272 nm es de 36674. Con este valor, y con los valores de concentración ya conocidos se calcularon nuevamente los valores de Absorbancia de la Casiopeína. A estos valores se les sumó el valor de Absorbancia a 272 nm del ADN y finalmente se les restó el valor de absorbancia del complejo CasIIval-ADN (gráfica 5.16). En este último espectro se observa, al igual que para el compuesto con gli, una banda en 272 nm mas ancha que en el caso de la Casiopeína sola, y conforme aumenta la concentración de la Casiopeína, el máximo de absorción se desplaza hacia la derecha:

Cas II val ajustada a 0



Gráfica 5.14 Gráfica de abs. vs. concentración ajustada a 0 a 25 °C.

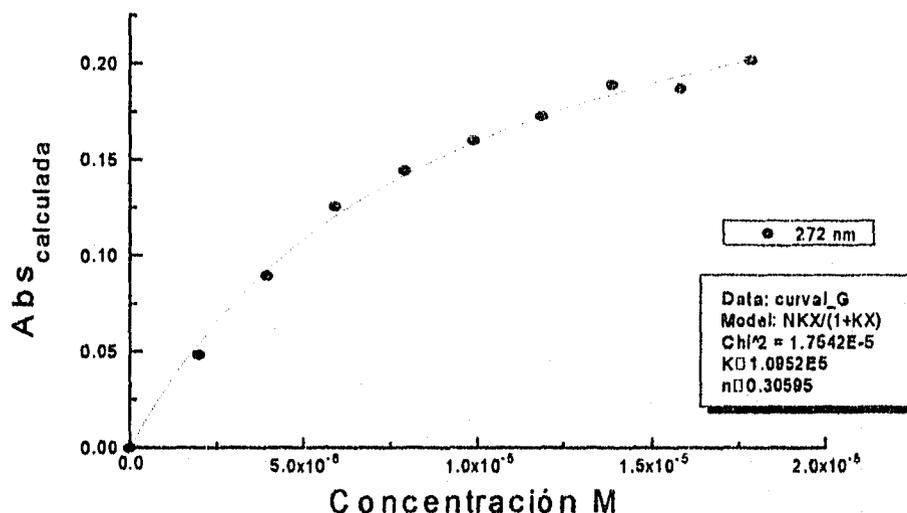
Cas II val + DNA T.A.



Gráfica 5.15 Espectros electrónicos de la Cas II val + ADN a T.A.

A continuación se grafica el resultado de la absorbancia resultante de la operación algebraica y se puede observar una tendencia clara en la gráfica, que también puede explicarse mediante un modelo simple de enlace.

Cas II val T.A.



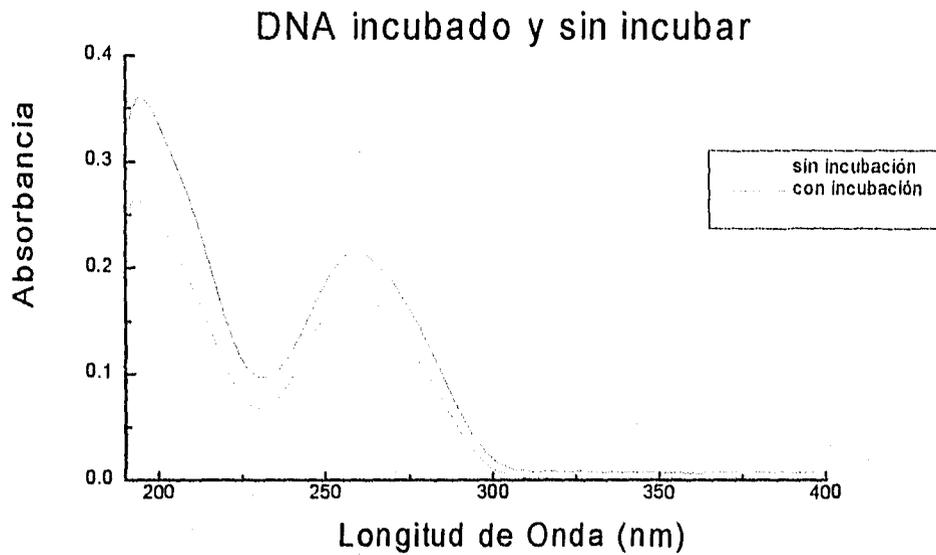
Gráfica 5.16 Gráfica de abs calculada vs. concentración para Cas II val a 25 °C.

Se presentan los espectros obtenidos al incubar las mismas muestras que se midieron a T.A, tanto de la Casiopeína sola, como del complejo ADN-CasIIval como del ADN, simplemente para conocer si existen cambios moleculares fundamentales al ponerlos a 37 °C por una hora y ver si se favorece o no la reacción entre el ADN y la Casiopeína.

Como se mencionó en la parte experimental, en cada sesión de experimentos se midió el espectro del ADN para asegurarse de que el valor de la absorbancia del ADN que se empleaba para hacer los cálculos era el adecuado (ver gráfica 5.17).

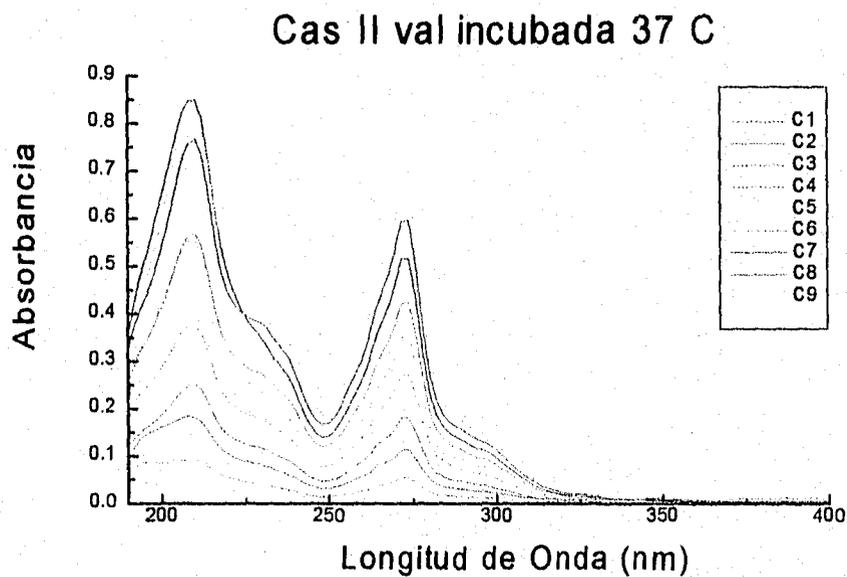
En el espectro de ADN solo no se observan cambios en el ADN que pudieran indicarnos cierto grado de desnaturalización del ADN, simplemente se

observa un aumento en general de absorbancia, lo cual se puede explicar por la evaporación de agua debida al baño María.



Gráfica 5.17 Espectro electrónico del ADN incubado a 37 °C y sin incubar.

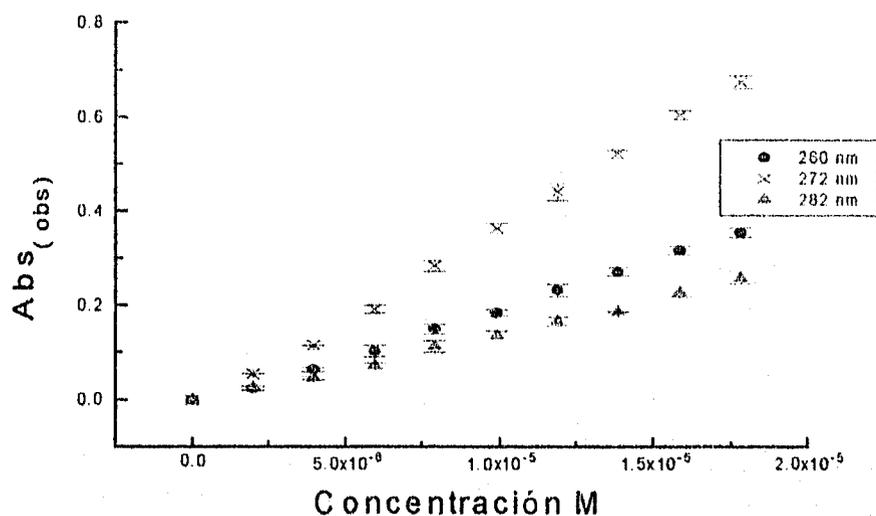
En cuanto a la Casiopeína sola tampoco se observan cambios aparentes en la forma de las bandas ni corrimientos en los máximos de absorbancia.



Gráfica 5.18 Espectros electrónicos de la Cas II val incubada a 37°C.

Aquí se presentan las rectas obtenidas de graficar absorbancia contra concentración, las cuales no presentan ningún cambio debido a la incubación, por lo que los complejos presentan estabilidad a estas temperaturas.

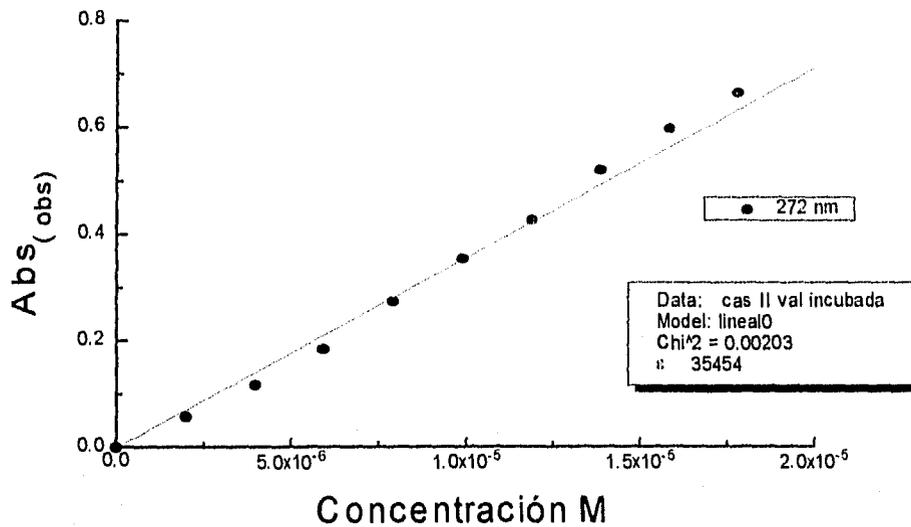
Cas II val incubada



Gráfica 5.19 Gráfica de abs vs. concentración para 260, 272 y 282 nm de la Cas II val incubada.

En la recta ajustada a 0 para la Cas II val se puede ver que el valor del coeficiente de extinción de 35,454 no es muy diferente del encontrado para la cas II val sin incubar (36,674), caso contrario que para el compuesto Cas II gli.

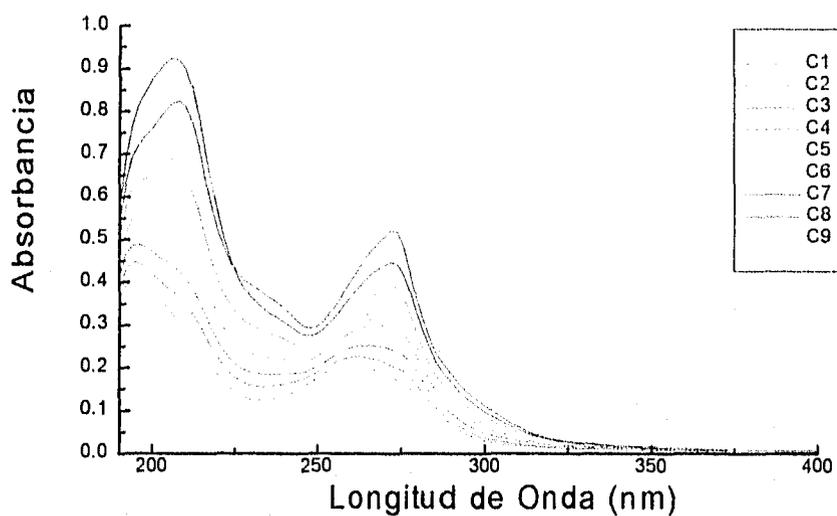
Cas II val incubada 37 C



Gráfica 5.20 Gráfica de abs vs concentración ajustada a 0 para la Cas II val incubada.

En cuanto al complejo Cas-ADN, también se puede afirmar que no presenta cambio significativo al incubarse una hora a 37 °C. Se puede decir que la reacción que se presenta entre el fármaco y el ADN se observa desde el momento en que se ponen en contacto, después de una hora de incubación a esa temperatura no se observa mayor cambio en la reacción que el que se observó al inicio.

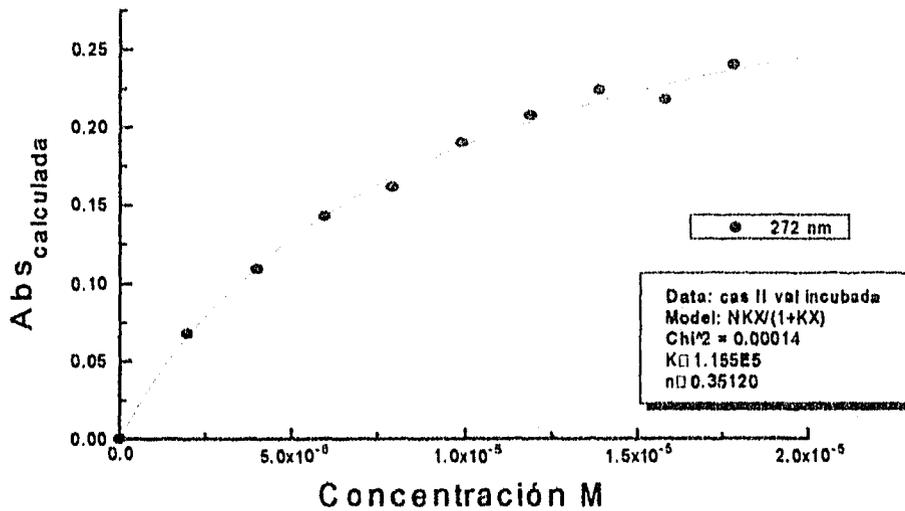
Cas II val + DNA incubada 37 C



Gráfica 5.21 Espectros electrónicos para la Cas II val + ADN incubada a 37 °C.

El modo de interacción se puede explicar nuevamente mediante un método simple de enlace como se puede observar al comparar la curva obtenida experimentalmente y la obtenida mediante el modelo de enlace propuesto, en donde la constante de asociación depende del número de sitios de enlace en la molécula, n .

Cas II val incubada 37 C

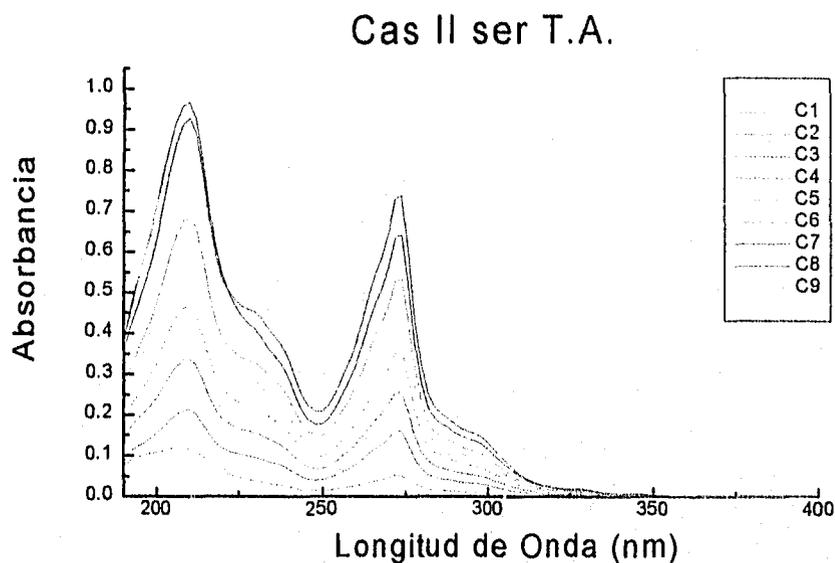


Gráfica 5.22 Gráfica de abs calculada vs concentración para la Cas II val incubada a 37 °C.

Lo que se observa es que no existe un cambio notable en la constante de asociación ni antes ni después de la incubación, ya que el valor solo aumenta ligeramente de $1.0956E5$ a $1.155E5$, al igual que el número de sitios enlazados, de 0.306 pares de bases de ADN por cada molécula de Casiopeína a solo 0.351 . La reacción de asociación $Cas + ADN \rightleftharpoons Cas-ADN$ se desplazó ligeramente a la derecha con la incubación.

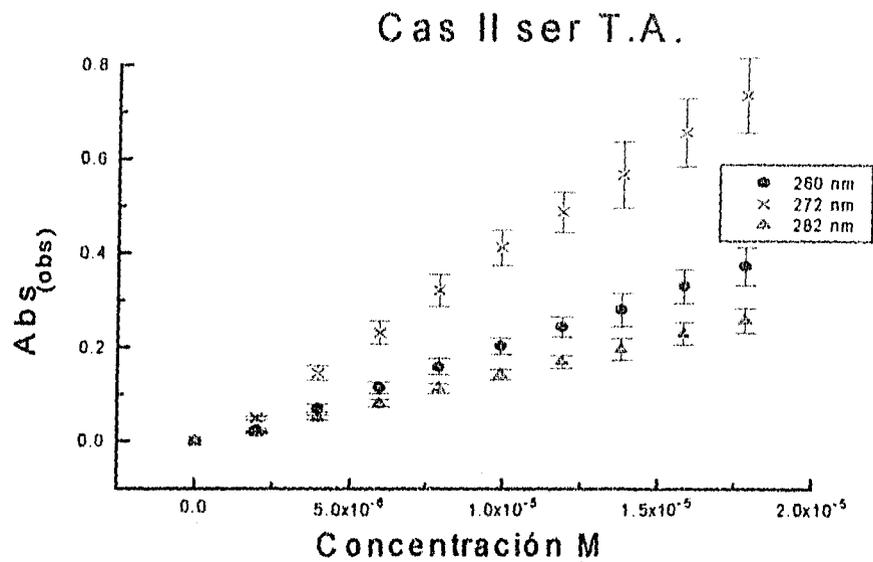
5.2.3 COMPUESTO CAS II ser.

Finalmente se presenta la serie de espectros obtenida para el compuesto con serina. Primero se muestran los espectros a T.A:



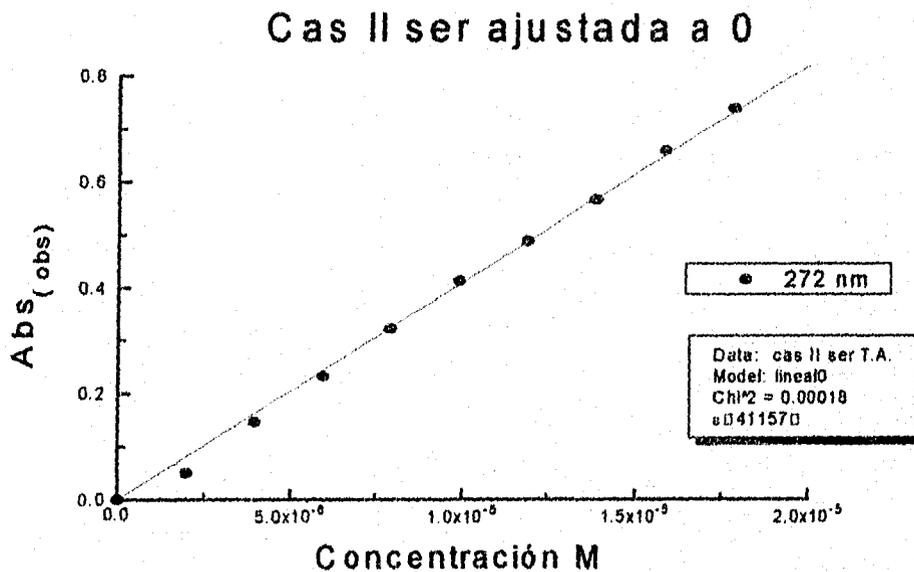
los cuales presentan la misma forma de espectro que los dos compuestos anteriores, ya que los tres tipos de Casiopeína estudiados, gli, val y ser contienen como ligante a la fenantrolina, poseen el mismo número de coordinación y la misma geometría.

En la siguiente gráfica nuevamente se comprueba que las concentraciones preparadas son confiables, y que en los 272 nm es en donde se obtiene el mayor valor de $\Delta A/\Delta C$, como se puede observar directamente de los espectros electrónicos.



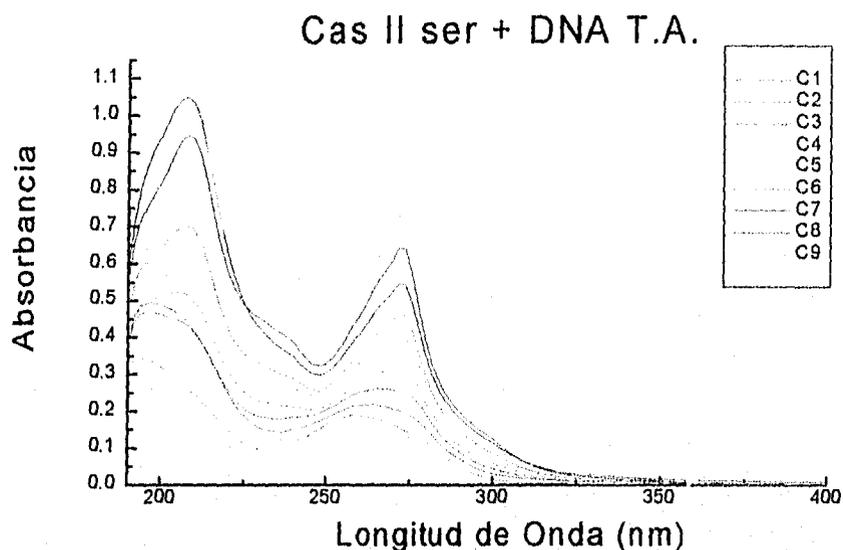
Gráfica 5.24 Gráfica de abs vs concentración de la Cas II ser a T.A.

y se ajustó la línea recta obtenida a los 272 nm para que pasara por el cero para tener mejor precisión en los valores, obteniéndose un coeficiente de extinción de 41157.



Gráfica 5.25 Gráfica de abs vs concentración ajustada a 0 para la Cas II ser a 25 °C.

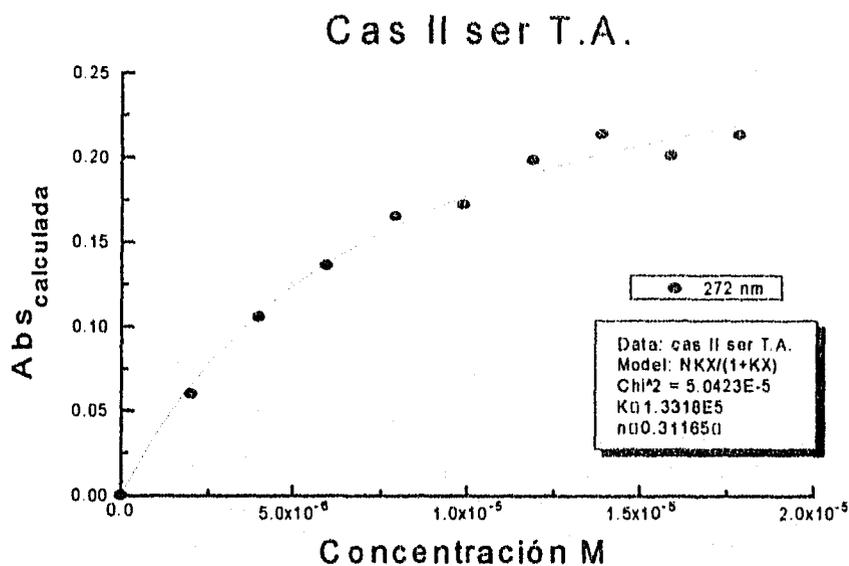
Los espectros electrónicos del fármaco con el ADN tienen la siguiente forma:



Gráfica 5.26 Espectros electrónicos de la Cas II ser + ADN a T.A.

y los espectros presentan, al igual que los dos fármacos anteriores, el mismo corrimiento hacia valores mayores de energía al ir aumentando el valor de concentración de la Casiopeína.

Con el valor de absorción corregido para la Casiopeína sola, obtenido de la gráfica ajustada a 0, con el valor del ADN solo para este experimento y con el de la mezcla CasIIser-ADN se obtuvo un nuevo valor de absorción calculado de igual forma que para los dos casos anteriores. La gráfica resultante es la siguiente:

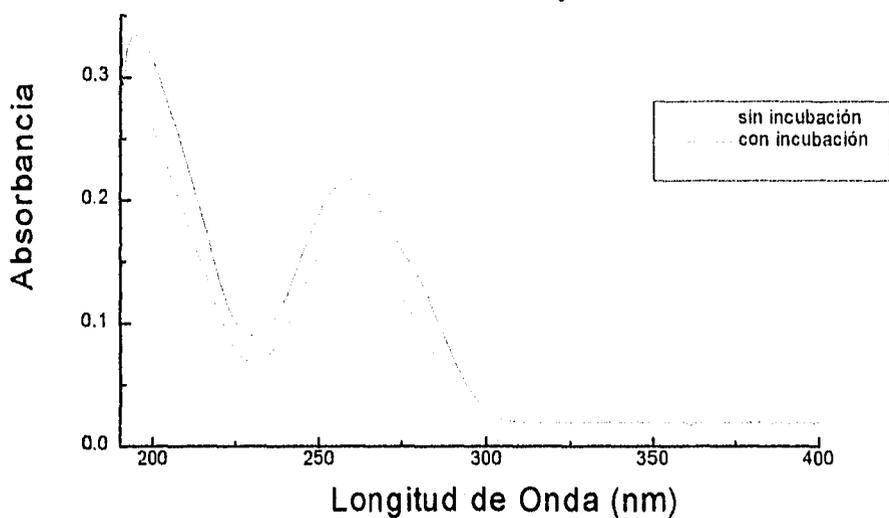


Gráfica 5.27 Gráfica de abs corregida vs concentración para la Cas II ser a T.A.

de donde podemos obtener el valor de la constante de asociación y el número de sitios de enlace del ADN por cada molécula de Casiopeína. El modelo simple de enlace se utilizó nuevamente para interpretar estos resultados.

El espectro del ADN solo correspondiente a este experimento, sin incubar y después de una hora de incubación a 37 °C se muestra a continuación, mostrando ser estable frente al proceso de la incubación.

DNA incubado y sin incubar

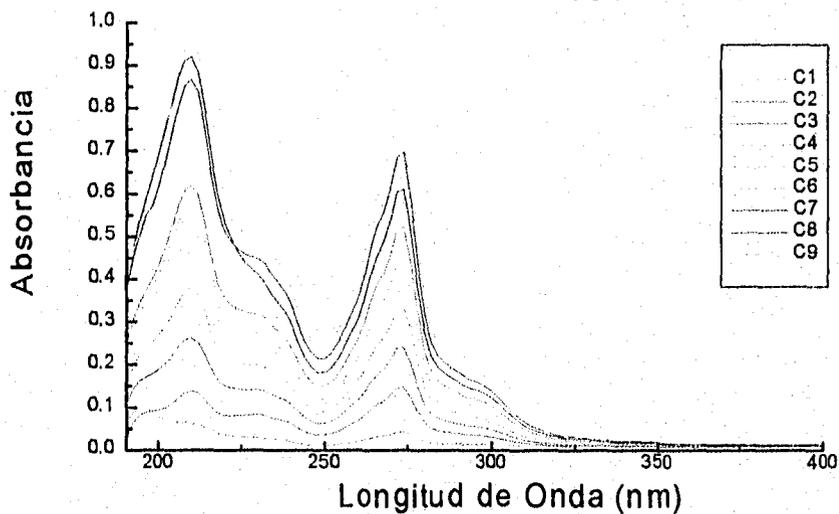


Gráfica 5.28 Espectros electrónicos del ADN a T.A. e incubado a 37 °C.

A continuación se presentan el resto de los espectros de las muestras anteriores después de una hora de incubación a 37 °C en un baño María.

Para la casiopeína sola no se observan cambios:

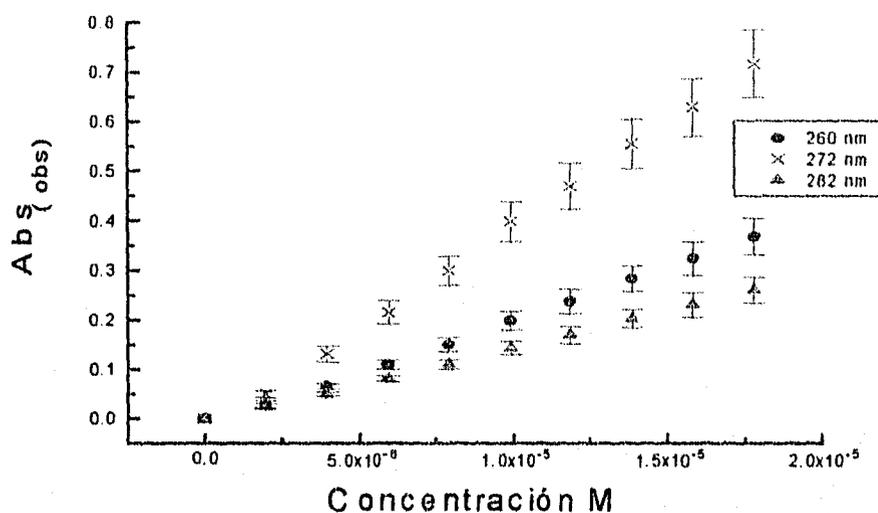
Cas II ser incubada 37 C



Gráfica 5.29 Espectros electrónicos de la Cas II ser incubada a 37 °C.

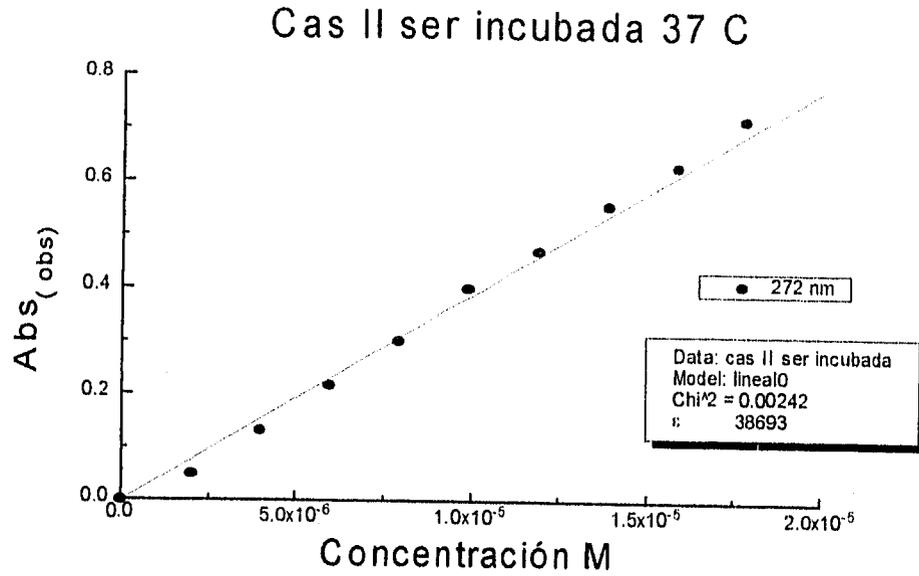
y las gráficas de abs vs concentración siguen siendo líneas rectas. Nuevamente se emplearán los datos únicamente a los 272 nm.

Cas II ser incubada 37 C



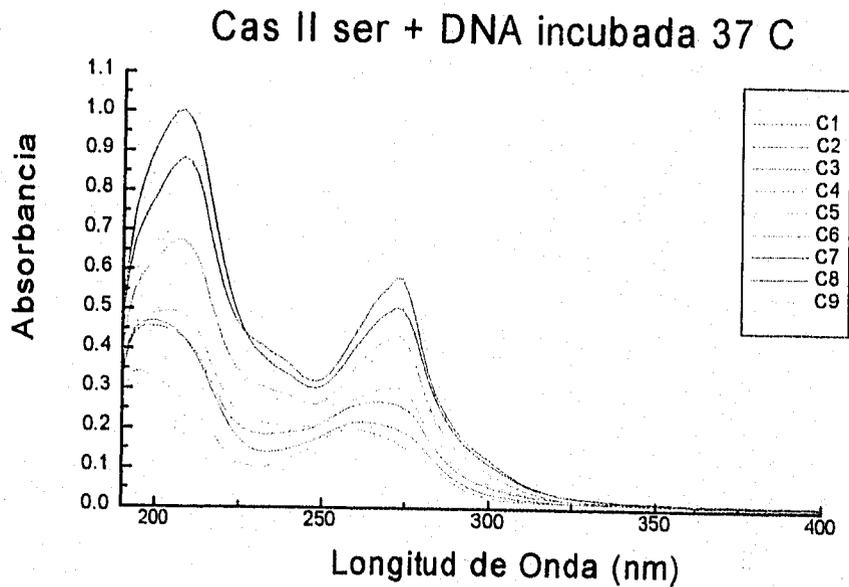
Gráfica 5.30 Gráfica de abs vs concentración para la Cas II ser incubada a 37 °C a 260, 272 y 282 nm.

El valor del coeficiente de extinción para la casiopéina incubada es de 38693, comparado con el obtenido de la casiopéina sin incubar de 41157, siendo ambos valores no muy diferentes. Esta diferencia puede deberse a que con la incubación y la subsecuente evaporación de disolvente, la concentración haya cambiado y por lo tanto también el valor del coeficiente de extinción.



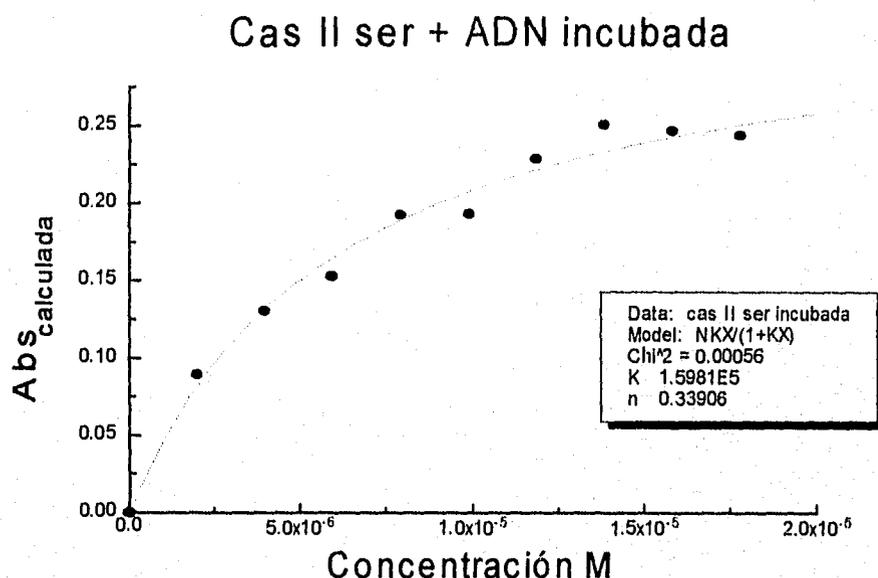
Gráfica 5.31 Gráfica de abs vs concentración a 272 nm ajustada a 0 para la Cas II ser incubada.

Los espectros electrónicos de la Cas II ser-ADN incubados muestran bastante similitud con los espectros de las muestras sin incubar.



Gráfica 5.32 Espectros electrónicos para la Cas II ser-ADN incubada A 37 °C.

y finalmente, con el valor de absorbancia calculado con el nuevo valor del coeficiente de extinción de la casiopeína incubada, con el valor de absorbancia del ADN solo incubado y con el valor del compuesto Cas-ADN incubado se hizo la siguiente gráfica, la cual parece ser explicada mediante el mismo modelo simple de enlace que para los dos casos de Casiopeína anteriores. Se obtuvieron así los valores de la constante de asociación y el número de sitios de enlace.



Gráfica 5.33 Gráfica de abs corregida vs concentración para la Cas II ser incubada.

El valor de la constante de asociación obtenido para el caso incubado es de 1.598E5, un poco mayor al encontrado para las muestras a T.A. de 1.3318E5, al igual que para los números de pares de bases del ADN unidos por cada molécula de casiopeína que fue de 0.339 para el caso incubado, y de 0.3116 para la T.A. Este es un comportamiento muy parecido al presentado por el compuesto con val, en donde la incubación favorece ligeramente la reacción de asociación, lo que no sucede con la gli, en donde el valor de la constante

disminuye notablemente con la incubación. Esto se explica tal vez mediante una reacción de saturación en donde todos los sitios disponibles de la cadena del ADN ya están ocupados, ya que el valor de n aumenta mucho con respecto al valor sin incubar, además de que es el mayor para los tres compuestos, con y sin incubación, por lo cual, al estar ocupados los sitios de enlace ya no es posible que con la incubación aumente el valor de la constante de asociación, al contrario, que disminuya. Esto puede deberse a que la gli es el aminoácido más pequeño que existe y por eso le es más fácil introducirse a la cadena del ADN. Para la val el tamaño ya es mucho mayor que para la gli, al igual que para la ser, por eso el comportamiento de estos dos últimos es más parecido.

Hay que hacer notar que la única diferencia entre los 3 compuestos estudiados es el tipo de aminoácido que está unido al cobre, y que esta diferencia en el aminoácido no es tan importante como para proponer un modo de reacción completamente diferente, ya que en todos los casos se propone un modelo simple de enlace para interpretar las gráficas obtenidas.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los 3 compuestos de casiopeína con los valores de las constantes de asociación (K) y el número de sitios disponibles (n) para cada caso.

<i>Compuesto</i>	Sin incubar		Incubada	
	K	n	K	n
Cas II gli + ADN	1.146E5	0.21	0.4622E5	1.543
Cas II val + ADN	1.0956E5	0.306	1.155E5	0.351
Cas II ser + ADN	1.3318E5	0.3116	1.598E5	0.339

Tabla 5.3 Valores de la constante de asociación y número de sitios disponibles para las 3 casiopeínas empleadas.

6.- CONCLUSIONES

6.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

6.1.1 INTERACCION DE COMPUESTOS DE LA FAMILIA DE LAS CASIOPEINAS I CON EL ADN SUPERENROLLADO Y CON EL ADN LINEAL.

A diferencia del compuesto Cas I ser, la interacción de estos compuestos no es muy fuerte, y esto se explica debido a que la fenantrolina coordinada al Cu tiene sustituidas en las posiciones 4,7 a dos fenilos, lo cual hace que los compuestos presenten impedimento estérico para intercalarse al ADN o para interactuar fácilmente con él.

De la interacción que se observa en algunas de la bandas del ADN superenrollado la forma estructural superenrollada del ADN, es decir, la que migra más fácilmente es la que interacciona en mayor proporción con los compuestos de la familia de las Cas I. Probablemente porque tenemos más cerca más pares de bases que interactúen con la Casipeína I. En cambio en la formas estructurales mas relajadas los pares de bases están más alejados por lo tanto la probabilidad de interacción disminuye.

Se propone la formación de un nuevo compuesto entre el ADN y la Casiopeína que es más grande y por lo tanto, con mayor impedimento estérico, que el ADN solo, por eso la velocidad de migración en los geles disminuye y se retarda la banda.

El comportamiento del compuesto Cas I ser es muy distinto, ya que la interacción es más intensa, debido a la naturaleza química del a.a,

principalmente porque la serina es el único aminoácido de los cinco estudiados con los compuestos de la Cas I que posee un oxígeno como sustituyente, en forma de alcohol, el cual es una base de Lewis y puede atacar a cualquier ácido de Lewis que esté presente en la cadena del ADN, haciéndolo así mucho más reactivo que con respecto a la gli, val, leu e ile, de naturaleza alifática.

Para el caso del ADN lineal con los compuestos de Cas I la interacción es más fuerte para este tipo de ADN que para el superenrollado, ya que la estructura lineal está menos tensionada que la superenrollada, por lo tanto, existe menos impedimento estérico para que el compuesto de Cas I se aproxime a la cadena del ADN e interaccione. El primer tipo de interacción que se presenta, y de menor intensidad es el barrido de las bandas, seguido por un retardo en la movilidad de las mismas, y finalmente una disminución en la intensidad, que se atribuye al mayor tipo de interacción. Lo que se propone para explicar estos comportamientos en el gel es que el compuesto abra o desenrolle la cadena del ADN, después se intercale, formando así un compuesto más grande y pesado que migre más lento y finalmente, que todo el compuesto de Casiopeína desplace al EtBr que se encontraba intercalado al ADN, desapareciendo por completo la fluorescencia.

El ADN lineal y la forma estructural lineal del ADN superenrollado no son las mismas formas topológicas del ADN, además que el primero se encuentra en mayor proporción que el segundo por lo tanto, los resultados en cuanto a la magnitud en intensidad y al tipo de interacción de los mismos compuestos de casiopeína I no son los mismos.

6.1.2 INTERACCION DE COMPUESTOS DE LA FAMILIA DE LAS CASIOPEINAS II CON EL ADN SUPERENROLLADO Y LINEAL.

Para los compuestos de la familia de las Casiopeínas II la fenantrolina unida al Cu tiene sustituidos en la posición 4,7 dos metilos, en lugar de fenilps, lo cual le confiere un menor impedimento estérico y le permite interaccionar de una manera mucho más fuerte con todas las estructuras topológicas del ADN superenrollado.

El primer tipo de interacción que se presenta (en grados de menor a mayor en cuanto a la intensidad de la interacción) es una disminución en la intensidad de las bandas, junto con un retardo en la movilidad y finalmente la desaparición total de las mismas. Esto se explica mediante la intercalación de la Casiopeína y la completa sustitución del EtBr por la Casiopeína.

La interacción entre el ADN lineal y los compuestos estudiados de Casiopeína II en general, es muy pequeña. Los resultados indican que para que exista interacción entre la estructura lineal y la casiopeína II el tamaño de los sustituyentes de la fenantrolina es fundamental. Probablemente es muy pequeña la Cas II para que se lleve a cabo la interacción.

6.1.3 CONCLUSIONES GENERALES

La concentración del fármaco, el tiempo de incubación y la temperatura de incubación son factores que, para todos los casos, aumentan la interacción (siempre y cuando se presente) entre las Casiopeínas y el ADN.

Independientemente del aminoácido que sea (a excepción de la ser), el comportamiento frente a un tipo de ADN de una familia de Casiopeínas es muy

parecido, por lo tanto, el tipo y la magnitud de la interacción lo regula el tipo de sustituyente en la fenantrolina que forma parte de la Casiopeína. El tamaño del sustituyente es fundamental para que se lleve a cabo o no la interacción.

Se encontraron diferencias en cuanto a la magnitud de la interacción dentro de una misma familia de Casiopeínas, atribuyéndose esta diferencia a la naturaleza química del aminoácido.

La estructura terciaria del ADN y el tamaño de los sustituyentes son fundamentales para obtener o no interacciones entre ambos.

Para todos los casos en donde se observa que sí existe interacción, aunque en diferentes grados de intensidad, primero se propone un desenrollamiento de la cadena del ADN, seguido por la intercalación de los compuestos de Casiopeína.

6.2 ESPECTROSCOPÍA ELECTRÓNICA:

6.2.1 CONCLUSIONES GENERALES:

Se pudo obtener la metodología adecuada para obtener los espectros deseados con un margen de error muy pequeño y obtener las constantes de asociación y el número de sitios de enlace.

Las concentraciones empleadas experimentalmente fueron las adecuadas, ya que se pudo trabajar en el intervalo de concentraciones en donde se obtiene una línea recta bajo la ley de Beer.

No se encuentran cambios significativos en la forma de los espectros de las Casiopeínas después de ser incubadas por una hora a 37 °C. Tampoco se observa ningún cambio en la forma de los espectros del ADN solo antes y después de ser incubado.

Se propone un modelo de enlace simple para explicar el modo de interacción entre el ADN y las Casiopeínas II con gli, val y ser estudiadas, en donde existe un solo tipo de sitios de enlace, es decir, que el ligante únicamente se une a un solo tipo de unidad repetitiva en el ADN, por ejemplo a una base o a un par de bases.

Se propone que existe interacción de tipo π - π entre los anillos de la fenantroliná y los anillos de las bases del ADN.

De acuerdo a la magnitud de los valores de las constantes de asociación se propone a la intercalación como el método de interacción entre los compuestos de Casiopeína II con el ADN.

6.2.2 CONCLUSIONES PARTICULARES:

Para el compuesto con glicina se observa una ligera disminución en el valor de la constante de asociación al ser incubada, y un aumento en el número de moléculas de Casiopeínas que se enlazan por cada par de bases del ADN, es decir de n , y esto se explica mediante una reacción de saturación en donde todos los sitios disponibles de la cadena del ADN ya están ocupados.

Para los compuestos de serina y valina se observa en general el mismo comportamiento entre ambas al ser incubadas: aumenta ligeramente el valor de la constante de asociación y el número de sitios de enlace en el ADN. Se

propone que el ligero aumento de la temperatura es suficiente para desplazar el equilibrio de la reacción de asociación hacia la derecha. Sin embargo, no existen fuertes diferencias para los compuestos de valina y serina entre los valores de K y n a temperatura ambiente que al incubarse. Se propone que esta similitud en cuanto a los resultados obtenidos, y esta diferencia notable con respecto al compuesto con glicina es el tamaño del aminoácido, ya que en la glicina es muy pequeño y en la valina y serina el sustituyente presenta un mayor efecto estérico.

BIBLIOGRAFÍA

1. - Pindur, U. et al; *J. Chem. Educ.*; 70; 263-272; (1993).
2. - Lerman, L.S.; *J. Mol. Biol.*; 3; 18-30; (1961).
3. - Berman, H. M. et al; *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*; 10; 87-114; (1981).
4. - Gabbay, E. J. et al; *J.A.C.S.*; 95; 7850-7857; (1973).
5. - Wilson, D. W. et al; *Biopolymers*; 18; 3025-3041; (1979).
6. - Wilson, W. D. et al; *J.A.C.S.*; 107; 4989-4995; (1985).
7. - Müller, W. and Gautier, F.; *Eur. J. Biochem.*; 54; 385-390; (1975).
8. - Olmstead, E. J. et al; *Biochemistry*; 14; 521-526; (1975).
9. - Suzuki, D. T. et al; *Introducción al análisis genético*; McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.; Madrid; 273-274; (1992).
10. - Lippard, S. J.; *Acc. Chem. Res.*; 11; 211-217; (1978).
11. - Sambrook, J; *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. U.S.A.; 6.3-6.35; (1989).
12. - Scovell, H. M.; *J. Chem. Educ.*; 63; 562-565; (1986).
13. - Peacocke, A. R. et al; *Trans. Faraday Soc.*; 52; 261-279; (1956).
14. - Williams, R. J. P.; *J. Chem. Soc.*; 137-145; (1955).
15. - Scatchard, G.; *Ann. N.Y. Acad. Sci.*; 51; 660-672; (1949).
16. - Klotz & Hunston, D. L. et al; *Biochemistry*; 10; 3065-3069; (1971).
17. - Mc. Ghee & von Hippel; *J. Mol. Biol.*; 469-489; (1974).
18. - Izatt, R. M. et al; *Chem Rev.*; 71; 439-481; (1971).
19. - Rosenberg, B. et al; *Nature*; 205; 698; (1965).
20. - Mc. Brien, D.C.H and Slater, T.F.; Biochemical mechanisms of platinum antitumor drugs; Association for International Cancer Research. Symposia No. 4, pp 1.
- 21- Howe-Grant, M. et al; *Biochemistry*; 18; 5762-5769; (1979).
- 22- Barton, J. K. et al; *J.A.C.S.*; 104; 4967-4969; (1982).
- 23- Barton, J.K. et al; *J.A.C.S.*; 106; 2172-2176; (1984).

24. - Sigman, D.S.; *Acc. Chem. Res.*; 19; 180-186; (1986).
25. - Graham, D.R. et al; *J.A.C.S.*; 102; 5419-5421; (1980).
26. - Que, B. G. et al; *Biochemistry*; 19; 5987-5991; (1980).
27. - Marshall, L. E. et al; *Biochemistry*; 20; 244-250; (1981).
28. - Uesugi, S. et al; *J.A.C.S.*; 104; 5494-5495; (1982a).
29. - Goldstein, S. et al; *J.A.C.S.*; 108; 2244-2250; (1986).
30. - Tamilarasan, R. et al; *Inorg. Chem.*; 27; 4082-4084; (1988).
31. - Tamilarasan, R. et al; Metal-DNA Chemistry; American Chemical Society; Washington, D. C.; Chapter 3; pp 48; (1989).
32. - Thederahn, T. B. et al; *J.A.C.S.*; 111; 4941-4946; (1989).
33. - Sigel, H. et al; *Inorg. Chem.*; 22; 925-934; (1983).
34. - Fischer, B. E. et al; *J.A.C.S.*; 102; 2998-3008; (1980).
35. - Ruiz, A. L.; U.S.A.: Patent number 5-107,005; (1992); Patente Mexicana 172248, (1993); Patente Mexicana 172348, (1993).
36. - Certificado de invención Secofi 18001 y 18002.
37. - Solans, X. et al; *Acta Cryst.*; C49; 890-893; (1993).
38. - Guido, J. M.; Análisis funcional de elementos reguladores de la transcripción temprana en el papilomavirus humano tipo 18 (HPV-18). Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 32-33; (1990).
39. - Russo, R. N. et al; *J.Chem. Educ.*; 330-332; (1993).