



Universidad Nacional Autónoma de México
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias
Químicas

Estudio de la densidad electrónica de casiopeínas y
sus interacciones específicas con el ADN

Tesis para optar por el grado de :

Doctor en Ciencias

Presenta:

M. en C. Rodrigo Galindo Murillo



Tutor: Dr. Fernando Cortés Guzmán 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Agradecemos la beca CONACyT No. 270034 y a la DGAPA-PAPIIT No. IN208709. Agradecemos especialmente a la DGTIC-UNAM, por el tiempo brindado en la super computadora KanBalam.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisicoquímica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Doctor Fernando Cortés Guzmán.

A mis 3 S's. Sandrita, Sofía y Sebastián.

Índice general

Introducción	III
1. Antecedentes	1
1.1. Anticancerígenos y ADN	3
1.1.1. El ácido desoxirribonucleico	3
1.1.2. Moléculas intercalantes	14
1.1.3. Moléculas que interactúan con los surcos	20
1.1.4. Moléculas que forman enlace covalente	29
1.1.5. Moléculas nucleasas	32
1.1.6. Iones metálicos y moléculas con metales	34
1.2. Casiopeínas	40
1.3. Interacciones débiles	45
1.4. Estudios teóricos	46
1.4.1. Mecánica Molecular	47
1.4.2. Simulaciones de la interacción molécula-ADN	53
1.4.3. Métodos cuánticos	53
1.4.4. Átomos en Moléculas	55
2. Planteamiento del problema y objetivos	59
2.1. Planteamiento del problema	59
2.2. Objetivos	59

2.3. Metas	60
3. Estudios cuánticos de apilamiento	61
3.1. Metodología	61
3.2. Resultados y discusión	62
3.2.1. Complejo A01A	65
3.2.2. Complejos AXA	67
3.2.3. Complejos X01X	69
3.3. Conclusiones parciales	72
4. Interacciones ADN-cas01	73
4.1. Metodología	73
4.1.1. Parametrización de la casiopeina	75
4.1.2. Propiedades calculadas	77
4.1.3. Métodos cuánticos	80
4.2. Resultados y discusión	80
4.3. Conclusiones parciales	104
5. Conclusiones	107
A. Parámetros helicoidales	109
B. Datos de simulaciones	111

Introducción

La importancia biológica que tiene la interacción de los iones metálicos con el ácido desoxirribonucleico es muy conocida. Los iones metálicos juegan un papel fundamental en una gran cantidad de procesos biológicos del ADN. Por ejemplo, el efecto terapéutico y antineoplásico que tienen los medicamentos basados en platino se debe en gran parte por la formación de aductos del metal con los ácidos nucleicos. Otro metal que interacciona con el ADN es el cobre. La familia de compuestos conocidos como Casiopeínas[®] son una familia de compuestos bis-quelatos de cobre con propiedades antineoplásicas conocidas y probadas *in vitro* e *in vivo*.

El presente trabajo estudia la interacción del compuesto [bipiridina-Cu-acetilacetato] con bases y cadenas de ADN para establecer un primer acercamiento de la interacción del compuesto con el ADN. Al no poseer estructuras cristalinas de ADN interaccionando con la Casiopeína[®] 01, se utilizan diferentes secuencias de ADN y diferentes ubicaciones del compuesto con el fin de obtener el compuesto cas01-ADN más favorable. El estudio se realizó principalmente con la técnica de Dinámica Molecular que permite una simulación de una gran cantidad de átomos, permitiendo realizar modelos solvatados explícitamente. Las secuencias que se utilizaron fueron poly d(AA)₂, poly-d(TT)₂, poly-d(GG)₂, poly-d(CC)₂, poly-d(AT)₂ y poly-d(GC)₂ y el compuesto con cobre se colocó manualmente en 4 diferentes posiciones: Intercalación con la bipiridina, intercalación con el acetyl-acetato, interacción con el surco mayor del B-ADN e interacción con el surco menor. En total se realizaron 24 simulaciones de 20ns cada una, utilizando dinámica molecular. Estos cálculos permiten ver en ese rango de tiempo, un acercamiento a la interacción del compuesto con cobre y el ADN. Se realizaron estudios energéticos para determinar la energía libre de interacción entre el compuesto de coordinación y el ADN y encontrar la estructura mas favorable.

Una vez que se obtuvieron las geometrías estables con dinámica molecular, se utilizó ese punto de partida para realizar cálculos con mayor precisión (cuánticos), y obtener información del compuesto cas01-ADN de energía, e interacciones de largo alcance. El campo de fuerza empleado para ADN probó funcionar de manera adecuada, así como los parámetros que se desarrollaron para el cobre y sus dos ligantes bidentados. Las simulaciones realizadas empleando las técnicas de Química Cuántica ayudaron para corroborar de manera *ab initio* las geometrías propuestas por una técnica de simulación empírica como lo es la dinámica molecular.

Abstract

In the last decades metal complexes have gained a growing interest as diagnostic agents and chemotherapeutic drugs. One of the main tasks is to develop molecules with less toxicity and more activity compared with known anticancer compounds. Several complexes with a metal center different from platinum have been proved. Copper is an essential trace element, important for the function of several enzymes involved in energy metabolism, respiration and DNA synthesis on the cell. The major functions of biological-active copper compounds involve red-ox reactions in which copper react directly with molecular oxygen or hydrogen peroxide to produce free radicals. Copper toxicity comes from its ability to produce reactive oxygen species (ROS), displace other metal ions, peroxidase lipids and directly cleave DNA and RNA. All these properties were taken on advance in the design of copper (II) coordination compounds recorded and patented under the name Casiopeínas. The general formula of these complexes are $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$ and $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ where N-N is non substituted and 2,2'-substituted bipyridine and 1,10-phenanthroline, N-O is α -aminoacidate or peptide and O-O is acetylacetonate or salicylaldehyde. Two compounds of this family $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'}\text{-bipyridine})(\text{acetylacetonato})]\text{NO}_3$ (Casiopeína III-ia) and $[\text{Cu}(4,7\text{-dimethyl-1,10-phenanthrolina})(\text{glycinato})]\text{NO}_3$ (Casiopeína II-gly) have been evaluated in vitro and in vivo showing cytotoxic, genotoxic, and antineoplastic activity.

The action mechanism is still not completely elucidated. However, there is evidence that supports the idea that these compounds are able to inhibit cell proliferation and produce cell dose-dependent death by apoptosis through mechanisms dependent and independent of caspase activation. The apoptosis observed might be the result of several processes like generation of ROS or mitochondrial toxicity, that can act alone or in concomitance. Furthermore, experimental data shows that these compounds interact with DNA. Chikira et al. found, using EPR studies, that mono(1,10-phenanthroline)-copper(II) and ternary complexes with amino acids bind to DNA with several different binding modes. Rivero-Müller et al. found that casiopeinas bind to DNA and degrade DNA and RNA in the presence of reducing agents. It is possible that the casiopeina interacts with DNA by stacking due to the planar moiety corresponding to the diimine or the acetylacetonate moiety. The present work studies the interaction between the compound [bipyridine-copper-acetonate]

(cas-01) and DNA bases using molecular dynamics and quantum chemistry methodology. Using the stable geometries obtained from the molecular dynamics studies, a quantum optimization was performed in order to obtain its wavefunction. Atoms in Molecules theory was then used to further investigate the direct interactions of the copper complex with the DNA bases.

Capítulo 1

Antecedentes

A pesar de que nuestro conocimiento de las bases moleculares de las transformaciones neoplásicas es primitivo, se han realizado grandes avances en las últimas 3 décadas en el tratamiento de éstas malformaciones que no eran curables con cirugía o radiaciones antes de 1970. La principal modalidad ha sido el avance en la quimioterapia, utilizando un espectro amplio de principios activos, medicamentos, hormonas y productos naturales [1].

El concepto de *quimioterapia* así como un número de sus conceptos básicos se originaron del trabajo de Paul Ehrlich, quien acuñó en 1901 el término refiriéndose al tratamiento sistémico de enfermedades de tipo infeccioso y neoplasias [2]. Ehrlich desarrolló un sistema que permitía el trasplante de neoplasias en roedores, los cuales usaba para realizar estudios y pruebas de medicamentos directamente en nuevas neoplasias o neoplasias en crecimiento. La quimioterapia se puede definir como el tratamiento de alguna enfermedad a través del uso de productos químicos [2]. Esto incluye enfermedades infecciosas así como neoplásicas. El tratamiento de cancer empleando sustancias químicas se conoce como quimioterapia en donde se maximiza la muerte de células neoplásicas tratando de minimizar el efecto tóxico en las células sanas. Con la mayoría de las neoplasias malignas, el mayor peligro es la diseminación de la enfermedad a todo el organismo. Por definición, una neoplasia maligna tiene la propiedad de producir metástasis haciendo el tratamiento por cirugía imposible a menos que se realice antes de la propagación de células malignas por el cuerpo. De la misma manera, para la radioterapia, se necesita tener un control localizado de la enfermedad. No es una terapia viable si se ne-

cesita tratar con radiaciones en diferentes puntos del cuerpo. Siguiendo los requerimientos expuestos y en parte por los descubrimientos dados por azar, una variedad de moléculas han demostrado su eficiente tratamiento contra el cancer humano. La tabla 1.1 muestra un resumen relativamente completo de los medicamentos utilizados hoy en día para el tratamiento de las neoplasias clasificados por su base funcional y descriptiva.

	Inducen apoptosis	Tipos de cancer susceptibles a apoptosis
Etoposide	Camptothecina	Limfoma
VM26	Hidroxyurea	Leucemia
m-AMSA	Ara-C	Carcinoma de pecho
Dexametasona	5-Azacidina	Carcinoma de ovario
Vincristina	Mostazas de nitrógeno	Carcinoma de colon
cis-Platino	Metotrexato	Cancer de próstata
Ciclofosfoamida	Clorambucil	Adenocarcinomas
Adriamicina	Bleomicina	Cancer testicular
Paclitaxel	BCNU	Glioma
5'-Fluorouracilo	Actinomicina D	
5'-Fluorodeoxiuridina	Melphalan	
Radiación		
Hypertermia		
Terapia hormonal		

Cuadro 1.1: Agentes quimioterapéuticos asociados a la inducción de apoptosis en tipos específicos de neoplasias.

El mecanismo de acción se conoce en muchos, pero no de todos estos medicamentos. Entre ellos están los agentes alquilantes que son moléculas altamente reactivas capaces de alquilar directamente al ADN. Algunos agentes alquilantes son capaces de realizar una doble función, por ejemplo, el bisulfano, que reacciona con el ADN formando enlaces entre las cadenas y causando apoptosis. Otro grupo de agentes enlazantes son los complejos con platino basados en la estructura original del *cis*-Pt(II)(NH₃)₂Cl₂ conocida como cisplatino. En los últimos años se desarrollaron nuevos compuestos derivados del cisplatino, uno de ellos conocido como carboxiplatino que tiene un dicarboxilciclobutano formando un complejo con el platino. Las interacciones y aductos que estos compuestos forman con las cadenas de ácido

nucléico impiden la replicación debido a la incapacidad del ADN a separarse durante la síntesis de nuevas cadenas de ácidos nucleicos. La Actinomicina D (dactinomicina) y la plicamicina forman complejos con ADN, inhibiendo eficientemente la transcripción de la mayor parte del material genético, mientras que la daunorubicina se une al ADN por medio de la intercalación entre los pares de bases nitrogenadas, inhibiendo la síntesis de ADN y ARN.

1.1. Anticancerígenos y ADN

El ácido desoxirribonucleico celular es uno de los principales blancos para los medicamentos anticancerígenos. Dependiendo del modo de interacción con el ADN, estas moléculas se pueden clasificar en: *moléculas intercalantes*, *moléculas que interactúan con los surcos*, *moléculas que forman enlaces covalentes* y *moléculas nucleasas*. Pueden distorsionar la estructura de doble hélice del ADN o alquilar una sola hebra inhibiendo la replicación y transcripción y por lo tanto, evitando la reproducción celular.

1.1.1. El ácido desoxirribonucleico

La estructura química primaria del ácido desoxirribonucleico está formado de unidades monoméricas de ácido nucleico llamadas *nucleótidos*. Estos están formados a su vez por un fosfato, un azúcar y una base aromática de purina (*pur*) o pirimidina *pyr*. La figura 1.1 muestra la estructura química y los nombres de los azúcares y la numeración de los átomos de los anillos (C y N) de las bases nitrogenadas [3].

Todos los átomos de carbono en las bases del ADN y los azúcares son asignados con números únicos de posición. Esto es cierto también para los nitrógenos de los anillos aromáticos de las bases. El resto de los átomos o grupos presentes en la cadena (H, O, NH₂ y P) son numerados de acuerdo al carbono o nitrógeno al que están unidos. El grupo metilo de la timina se le asigna en nombre único de C7 por la IUPAC. Los azúcares poseen la configuración β -D-estereoisomérica como se muestra en la figura 1.1, que es una referencia a la orientación relativa de los grupos OH. Los átomos que pertenecen a los azúcares se distinguen a aquellos que pertenecen a alguna base por uno o dos tildes (‘ó ’) en el número del átomo. La unidad química

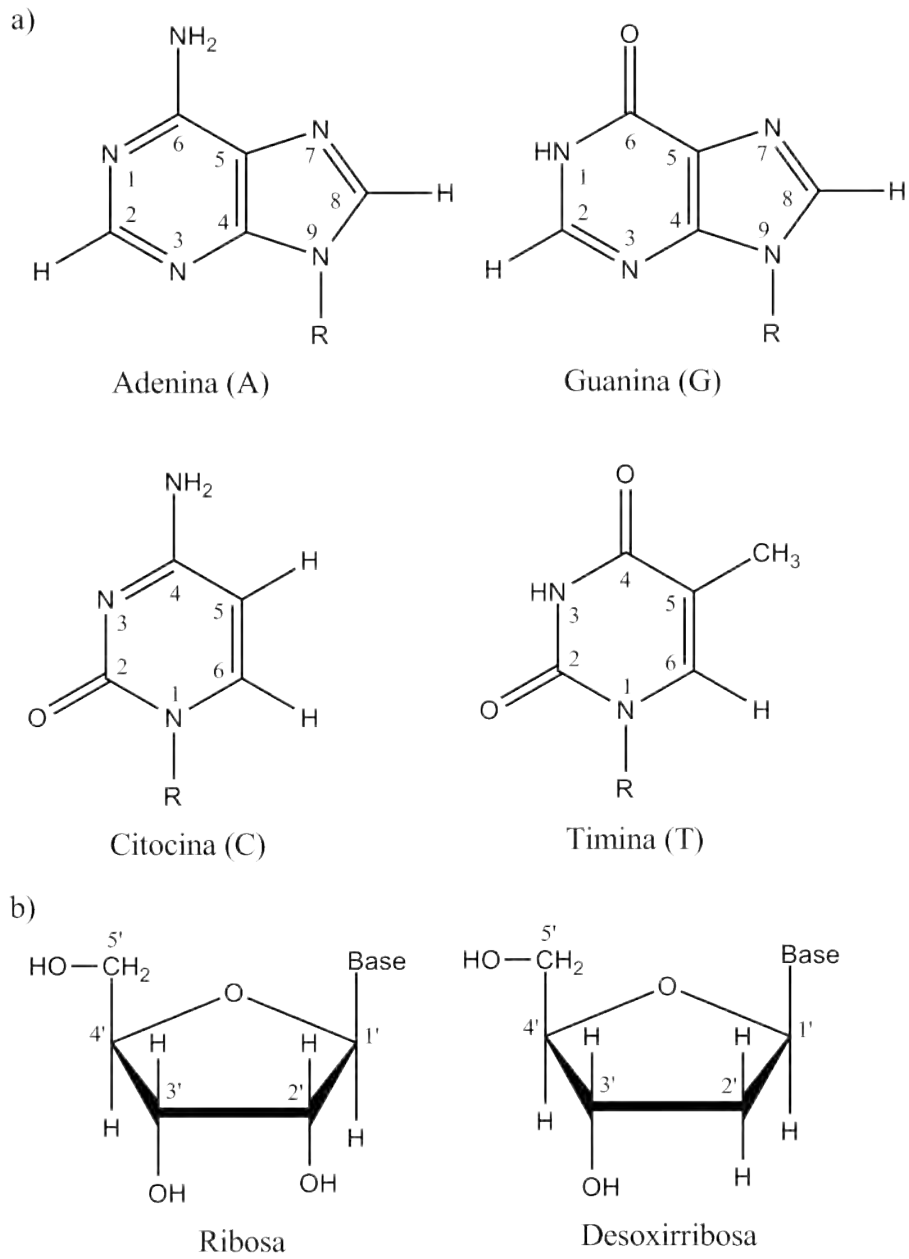


Figura 1.1: Estructura química de los constituyentes de los ácidos nucleicos. Las bases nitrogenadas (a) y los azúcares (b). Se muestra la nomenclatura de la IUPAC para nombrar a los átomos.

que solo contiene el azúcar y la base nitrogenada se llama *nucleósido* y el ester fosfato del nucleósido se llama *nucleótido*. Los nucleósidos se abrevian combinando una letra mayúscula representando la base y una letra minúscula representando el azúcar. Por ejemplo, la adenosina que tiene una ribosa y una adenina, se nombre: “rA” (ver figura 1.4). Los nucleótidos se nombran agregando una “p” para representar el fosfato, como se ve en la figura 1.4, así, por ejemplo, el 5'-nucleótido, la abreviación es “pN”, y para el 3'-nucleótido, “Np”. En la figura 1.4, si la base es guanina, se refiere a la guanosina-5'-monofosfato, abreviado comunmente como 5'-GMP.

Los ácidos nucléicos como el ADN y ARN son polynucleotidos, el esqueleto de soporte consiste en azúcares y enlaces fosfodiester, como se muestra en la figura 1.3. En los ácidos ribonucleicos (ARN), los azúcares son ribosas y cuatro nucleósidos, rA, rU, rC y rG. En el ácido desoxirribonucleico, todos los azúcares son 2'-desoxirribosa y cuatro nucleósidos, dA, dT, dC y dG. Para ambas cadenas de polynucleótidos, cada azúcar tiene dos enlaces ester en la posición 5'O y 3'O. La cadena de ADN tiene entonces, cierta “dirección” que se define como un conjunto continuo de átomos comenzando en la posición 5'O hacia la posición 3'O (5'→3'). Éste conjunto de átomos se llama el “esqueleto” de la cadena de ácido nucléico o *backbone*. Una cadena de polynucleótidos se abrevia como ...pNpNpNpNpNp..., donde la izquierda es llamada la posición 5' y la derecha como la posición 3'.

La estructura secundaria del ADN (o de cualquier polinucleótido) consiste en regiones de 3 dimensiones que tienen estructuras ordenadas y simétricas, cada una formada por los apilamientos de los nucleótidos y ensambladas por los puentes fosfodiester presentes entre cada una de las unidades del ácido nucléico. La mayoría de las bases nitrogenadas son casi planas, teniendo variaciones de planaridad no mayor a 0.2Å. Las distancias de enlace y los angulos para las bases nitrogenadas se presentan en la figura 1.5.

Las bases aromáticas son el componente genético central y contribuyen a la estabilidad de la cadena por medio de interacciones débiles y fuerzas de van der Waals entre los electrones π presentes en los motivos aromáticos. A diferencia de las bases nitrogenadas, el anillo de furanosa no es plano, posee una configuración de sobre o *envelope* debido a los angulos de enlace entre los átomos de carbono y oxígeno. Los grupos fosfato que funcionan de puente entre los nucleótidos son *fosfodiesteres*, en donde el enlace ester (P-O) forma un enlace “sencillo” que tiene características de doble enlace debido

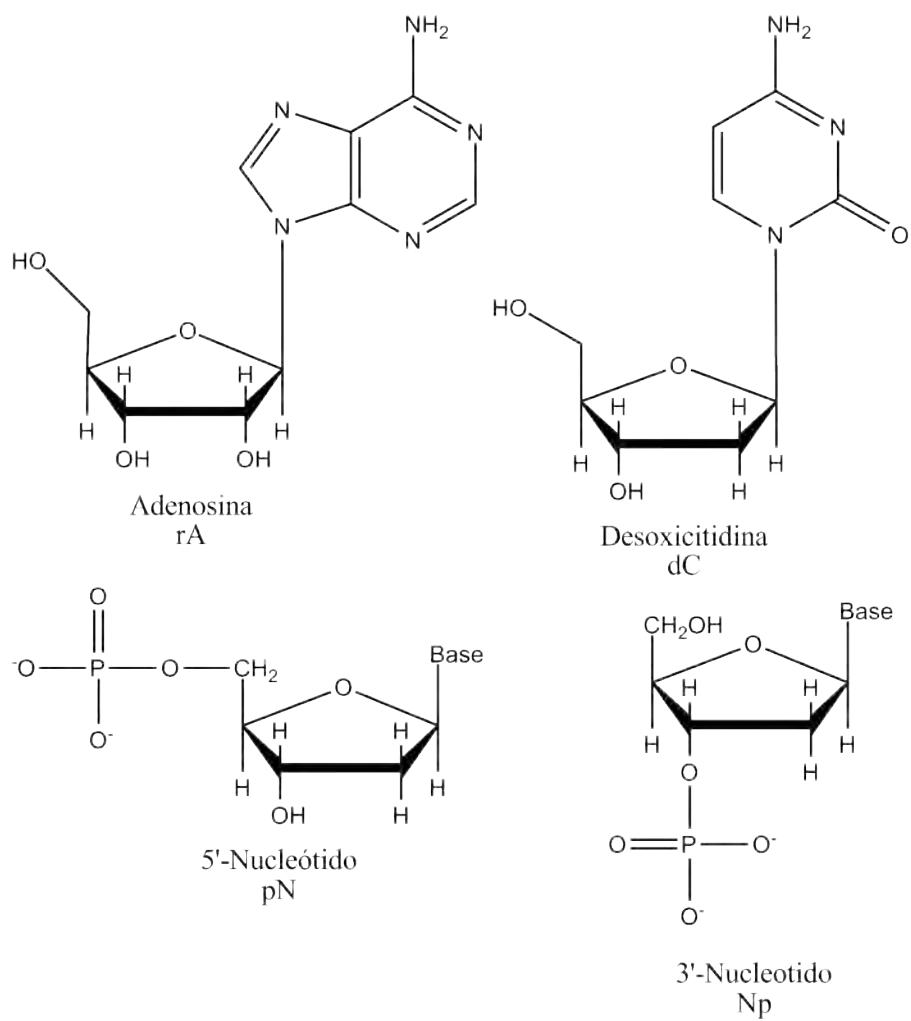


Figura 1.2: Estructura química de los nucleósidos y los nucleótidos.

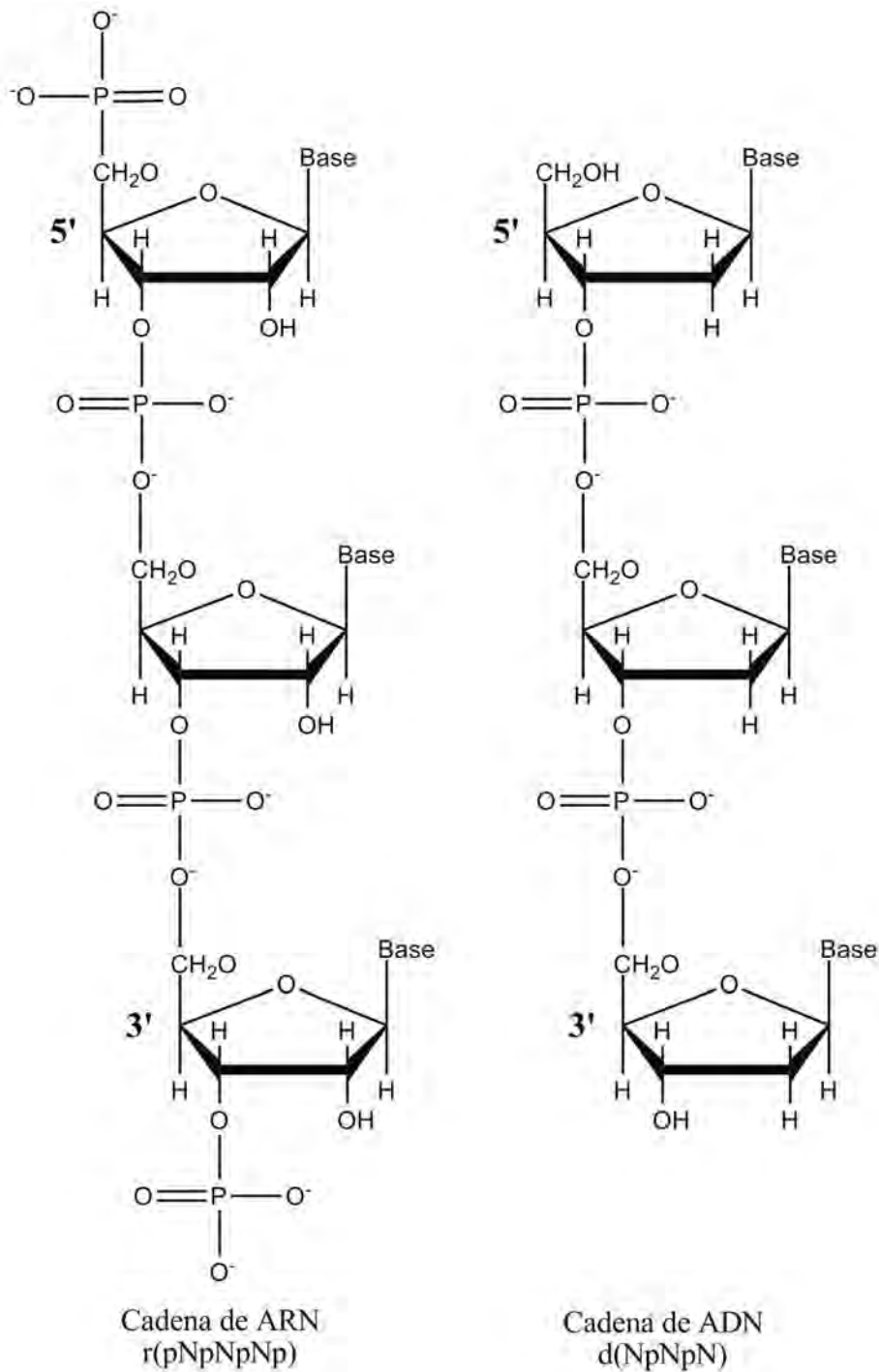


Figura 1.3: Estructura química de un polinucleótido. Los oxígenos terminales, O5' y O3' se designan de acuerdo al número del átomo de carbono al cual están unidos.

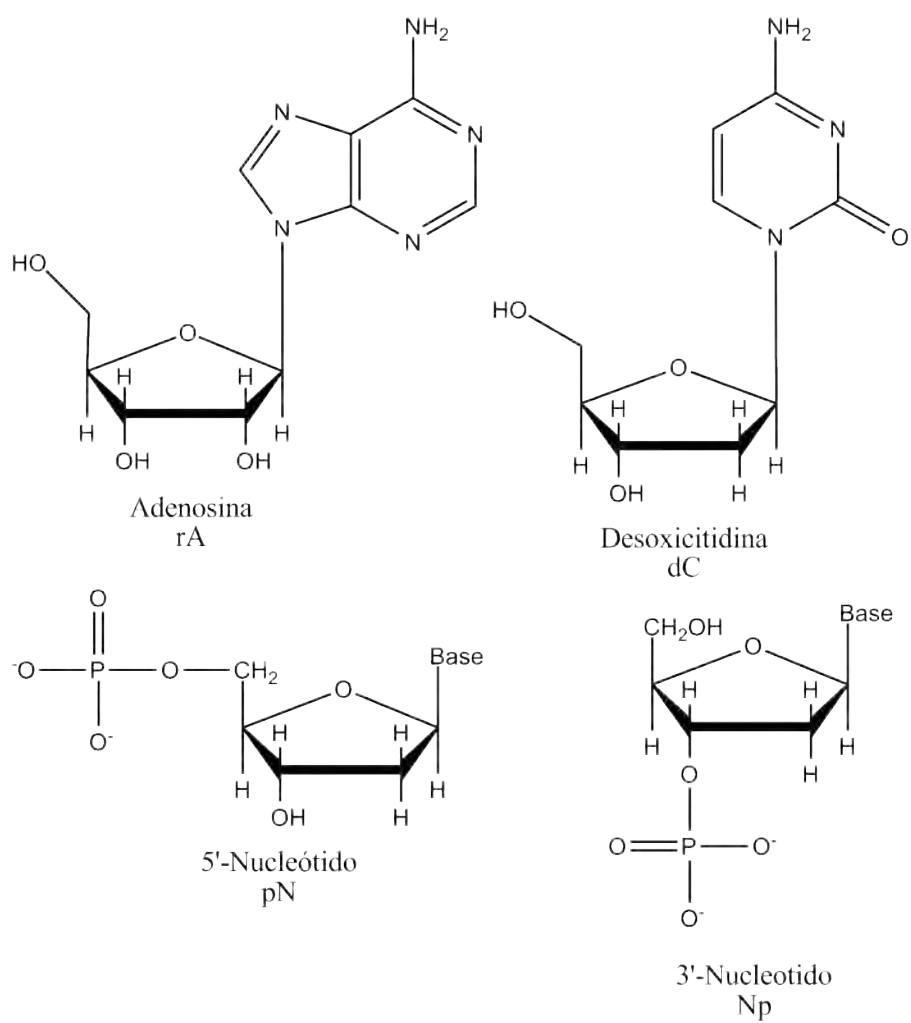


Figura 1.4: Estructura química de los nucleósidos y los nucleótidos.

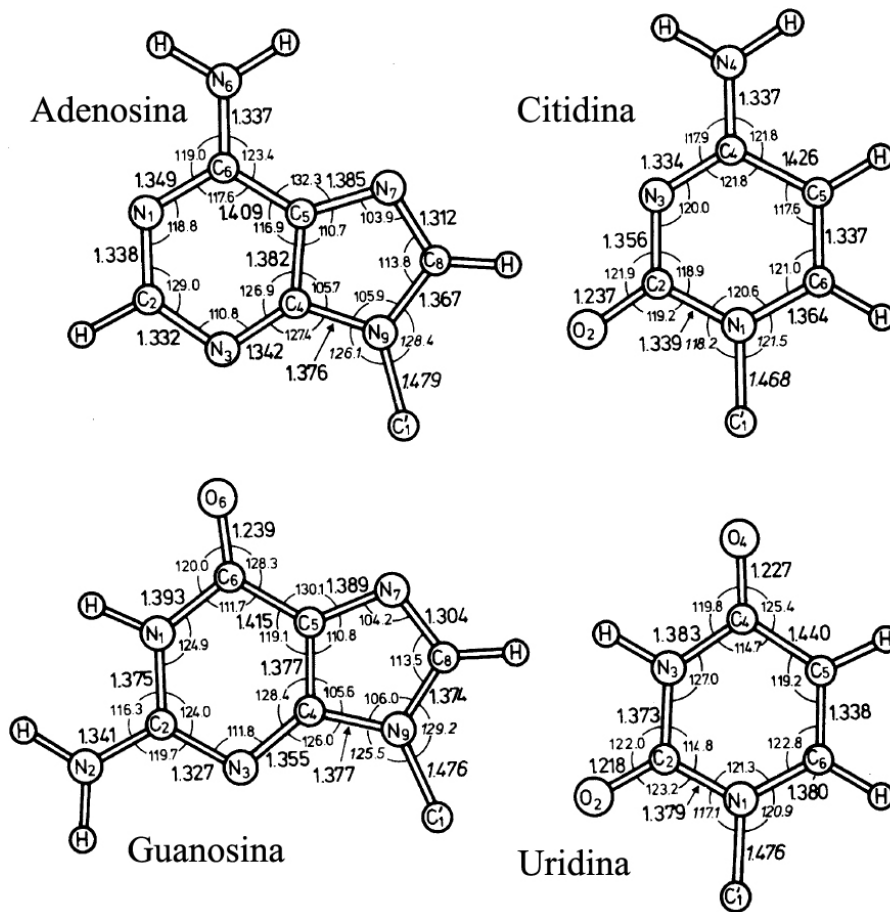


Figura 1.5: Distancias de enlace promedio (Å) y ángulos de enlace promedio (°) [4].

a la deslocalización electrónica π . Este comportamiento se ve reflejado en el hecho que los enlaces P-O sencillos o dobles varían entre 1.59-1.63 Å [4], que es una distancia interatómica ligeramente menor a un enlace sencillo estándar de 1.87 Å. De la misma manera, el ángulo para un enlace P-O-C es de alrededor de 120°, que es mas grande de lo esperado para un átomo de oxígeno con hibridación sp^3 . Como éstos enlaces son enlaces sencillos con cierto grado de doble enlace, tienen el efecto de permitir un cantidad reducida de flexibilidad y torsión a la cadena de soporte del ADN.

Las formas del ADN

El ADN tiene una plasticidad estructural significativa y puede adoptar una gran variedad de conformaciones tridimensionales. Existe raramente como una sola cadena, prefiere asociarse en una doble-hebra o estructuras “duplex”. Las más comunes de las conformaciones de doble-cadena se conocen como tipo “A”, “B” y “Z”. Más del 90 % de las secuencias de ADN conocido caen en la conformación estructural de tipo “B-ADN”. Por ejemplo, el ADN celular que se encuentra en *Escherichia coli*, el virus P22 y la cromatina de todos los organismos superiores, es B-ADN. La cadena polynucleótida está altamente cargada y es neutralizada por cationes como K^+ y Na^+ . Estos cationes tienen un efecto significativo en la estructura del ADN.

La cadena polinucleótida de B-ADN se caracteriza por una hélice “derecha”. El término viene del hecho que cuando uno apunta en el centro del eje de la hélice con el pulgar derecho, el dedo se curva en la dirección del giro de la cadena. Para una hélice “derecha”, las hebras se enrosacan hacia la dirección de las manecillas del reloj cuando el eje de la hélice apunta hacia arriba. En la forma de B-ADN, las hélices corren de manera antiparalela con respecto a cada una y se unen coaxialmente (Fig. 1.6b).

La terminación 5' de una hebra esta apareada con la punta 3' de la otra en una orientación tipo cabeza-cola. Las dos cadenas estan unidas por medio de puentes de hidrógeno entre dos bases, cada uno proveniente de una hebra, formando pares de bases específicas. El B-ADN forma una vuelta complea en aproximadamente 10 residuos, tiene un diámetro aproximado de 24Å y un giro de aproximadamente 35.5Å (Cuadro 1.2). El giro de una hélice es la cantidad de elevación necesaria para completar un giro de 360° .

El apareamiento de bases nitrogenadas consiste en guanina con citocina (G-C) y adenina con timina (A-T). Estas interacciones se conocen como interacciones de *Watson-Crick* (Fig. 1.7). Existen otro tipo de apareamientos que se presentan en condiciones especiales y no se revisarán en el presente trabajo. Las bases nitrogenadas presentan un motivo aromático interno que posee una gran deslocalización electrónica tipo π . Esta deslocalización permite que las bases sean planas y estabilizan el apilamiento vertical de la cadena. Los pares de bases forman planos que están apilados uno sobre el otro a lo largo del eje de la doble hélice, y están orientados de manera perpendicular con respecto al eje.

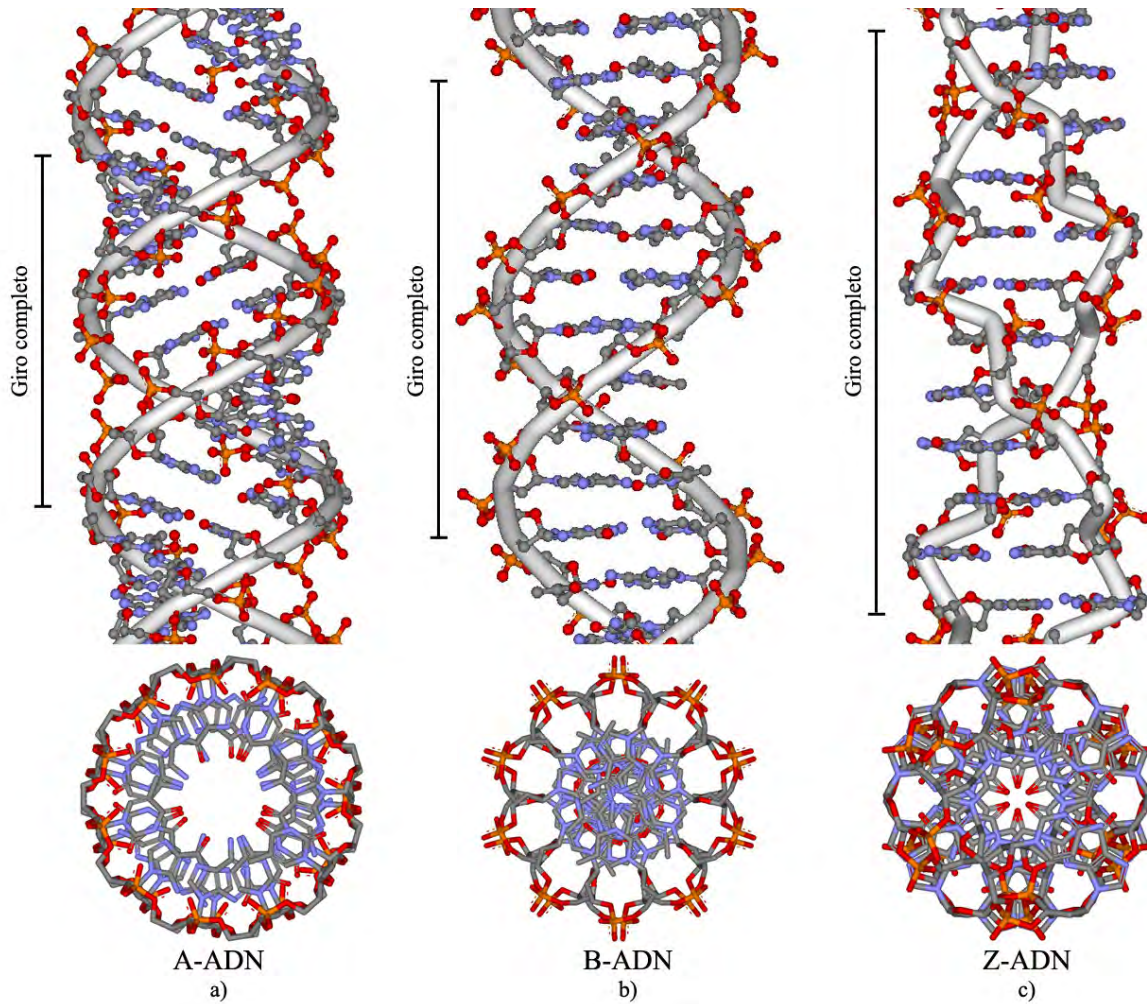


Figura 1.6: Vista lateral de fragmentos de cadenas de (a) A-ADN, (b) B-ADN, y (c) Z-ADN. Se muestra el giro aproximado. La forma A tiene el menor giro, por lo tanto el giro mas corto. Los pares de bases poseen el mayor ángulo de inclinación con respecto al eje. El giro de la forma Z es el menos compacto. Nótese la alternancia entre las configuraciones *syn* y *anti* en los ángulos dihedros de los azúcares. La forma B tiene un giro y una distancia moderada, con ángulos dihedros regulares.

Característica estructural	Forma		
	A	B	Z
Sentido de las hélices	Derecha	Derecha	Izquierda
Diámetro	25.5 Å	23.7 Å	18.4 Å
Pares de bases (PB) por giro	10.7	10.5	12
Inclinación de PB	+19°	-1°	-9°
Levantamiento/PB	2.56°	3.38°	3.71°
Surco menor	ancho	delgado	delgado
Surco mayor	delgado	ancho	superficial

Cuadro 1.2: Características geométricas de diferentes formas helicoidales de ADN.

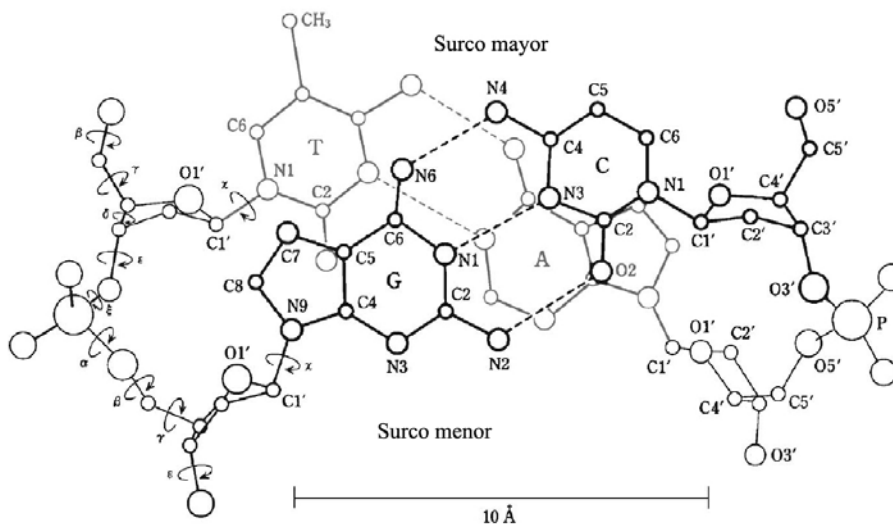


Figura 1.7: Vista sobre el eje de la estructura del B-ADN. Se muestra el apareamiento de los pares de bases A-T, G-C.

Como ya se mencionó, los grupos fosfato del ADN están cargados negativamente y como hay un gran número de éstos grupos en la cadena, la carga neta es muy alta. La repulsión electrostática entre dos hebras de ADN es suficiente para impedir la formación de que se forme una cadena duplex. Para contrarrestar esta tendencia, es necesaria una suficiente concentración de cationes para mantener la electroneutralidad. Los cationes principales en el ambiente celular son los iones monovalentes K^+ y Na^+ , que en solución se encuentran hidratados. Estos cationes estabilizan el ADN agrupándose electrostáticamente alrededor de los grupos fosfato, formando una cadena alrededor del ADN. El agrupamiento de cationes alrededor del ADN se conoce como *condensación de cationes* o *salt condensation*. Cationes divalentes como el Mg^{2+} también pueden estabilizar el ADN pero lo hacen uniendo dos grupos fosfatos en cadenas opuestas. Esto hace que los cationes divalentes estabilicen mejor el ADN y frecuentemente se utilizan para cadenas no estándares como cadenas distorcionadas o triples hélices. La mayoría de las características estructurales más importantes del B-ADN, así como las de A- y Z-DNA se resumen en la tabla 1.2. Las coordenadas atómicas del B-ADN fueron propuestas por Wilkins y sus colaboradores [5, 6, 7], con una revisión más extensa realizada por Arnott y otros [8, 9].

Para que las cadenas de ácidos nucleicos sean biológicamente activas, se requiere mantener una estructura regular para ser reconocidos por las proteínas como una secuencia de letras codificando información genética. Al mismo tiempo, debe de tener la suficiente flexibilidad para que permita a las hebras de la doble cadena, disociarse y asociarse durante la transcripción y la replicación. Las propiedades intrínsecas de la desoxirribosa permite esta propiedad. Los azúcares actúan como una unión entre los grupos fosfatos y la cadena lateral (las bases nitrogenadas) y pueden funcionar como una "junta universal" que provee la suficiente cantidad de movimiento y flexibilidad a toda la estructura del ADN. Por medio de cristalografía de rayos-X de monocristales de oligodesoxyrribonucleótidos, se han encontrado muchas diferentes estructuras del B-ADN [10].

Cuando la humedad es mayor al 75 %, la sal sódica de ADN (Na-ADN) adopta una conformación tipo A-ADN principalmente y adopta la forma B-ADN cuando la humedad es alrededor del 92 %. Que las formas A y B sean conformaciones de la misma molécula de ADN se confirma con la observación que cambios de humedad inducen cambios reversibles entre las formas A y B [11]. Así como la forma B del ADN, la forma A (Fig. 1.6) está formada por

una hélice de doble cadena “derecha”. Cada cadena antiparalela a la otra. En contraste con el B-ADN, el punto medio de los pares de bases se localiza fuera del eje de la hélice, y tiene una inclinación de alrededor de $\sim 19^\circ$. En general, la estructura del A-ADN es mas corta, mas ancha y mas compacta que el B-ADN. El giro del A-ADN es significativamente menor ($\sim 28^\circ$) en contraste con el B-ADN ($\sim 36^\circ$) y tiene 11 pares de bases por vuelta en lugar de 10. El ancho entre pares de bases es mas pequeño ($\sim 2.6\text{\AA}$) comparado con el B-ADN ($\sim 3.4\text{\AA}$). Una característica importante de la forma A del ADN es que la desoxirribosa se encuentra en una conformación $C3'-endo(N)$, en lugar de la conformación $C2'-endo(S)$ perteneciente a la forma canónica del B-ADN. Las diferencias se resumen en la tabla 1.2.

Otro tipo de configuración estructural encontrado en la naturaleza, en un menor porcentaje es la doble cadena de Z-ADN. Esta estructura presenta una gran diferencia con respecto a las formas A y B, pues es una forma “zurda”. Esto significa que si uno sujeta una hebra de Z-ADN con la mano izquierda y apunta el pulgar hacia la dirección del eje de la hélice, el giro de la hélice va a ser en la misma dirección que la dirección de los dedos de la mano. Uno de los primeros reportes de esta conformación es la estructura cristalina de la secuencia de oligo-ADN $d(CGCGCG)_2$ [12, 13]. Esta estructura doble (Figura 1.3) tiene los enlaces estandar de Watson-Crick en el par de bases G-C, pero los ángulos de enlace glucosídicos (χ) de las bases de guanina adquieren una conformación *syn* mientras que la citosina permanece en la configuración estandar *anti*. Como la secuencia alterna entre G y C, los azúcares alternan entre las configuraciones *syn* y *anti*. El residuo desoxyguanosina tambien presenta diferencias pues se encuentran en la conformación $C3'-endo(N)$, mientras que el residuo de la desoxycitosina están en la conformación $C2'-endo(S)$. Numerosos estudios han mostrado que una cadena $\text{poly}(dG-dC)_2$ se presentan en la forma de Z-ADN en solución y la conformación es estabilizada por varias modificaciones químicas en las bases nitrogenadas [10].

1.1.2. Moléculas intercalantes

El concepto de *intercalación* se comenzó en 1961 por Lerman [14] y modificado en 1966 por Pritchard [15]. Estos trabajos postulan que moléculas aromáticas policíclicas planas como las acridinas (Figura 1.8) pueden formar un “sandwich” (intercalar) entre dos pares de bases de una cadena de ADN de

doble hélice, donde la mayor fuerza de enlace sería la interacción de van der Waals entre los electrones π de las moléculas y los anillos heterocíclicos de las bases nitrogenadas y se refuerza la unión por la interacción iónica de los nitrógenos cargados positivamente de los anillos de las acridinas y el oxígeno del grupo fosfodiéster del ADN (Figura 1.9). Otros trabajos corroboraron esta hipótesis por medio de estudios de cristalografía de rayos-X en una serie de acridinas acomplejadas con dinucleósidos.

Una de las moléculas más conocidas como intercalante es la proflavina (conocida también como *proflavin* y *diaminoacridina*, Figura 1.8). Ha sido utilizada como un desinfectante bacterioestático contra muchas bacterias gram-positivas así como un antiséptico. Ahora conocemos que estas moléculas funcionan principalmente intercalándose entre las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, causando deleciones o inserciones en la secuencia de las bases al momento de la replicación o transcripción. Por esta razón, es un agente mutagénico. Se han realizado análisis de rayos-X en complejos de proflavina con la doble hélice r(CpG) [16]. Estos estudios (a una proporción de medicamento:dinucleótido de 3:2) proporciona una muy buena imagen de como esta molécula se puede intercalar.

En la figura 1.10 se observan dos moléculas de proflavina apiladas sobre y debajo del duplex, mientras que una tercera molécula está *intercalada* entre los pares de bases de C-G y G-C. La distancia entre los pares de bases se ha incrementado para permitir la inserción de la molécula, y las 5 unidades aromáticas forman planos casi con una separación vertical equidistante. Los grupos amino de la molécula que se intercala forma dos puentes de hidrógeno (líneas punteadas en la figura) con los oxígenos del fosfodiéster y dos más puentes de hidrógeno con los oxígenos hidroxilos O(2') de las ribosas de la citocina.

El ejemplo anterior ilustra que los pares de bases en el ADN o ARN se estiran cuando una molécula se intercala entre éstos. Esto causa un alargamiento general de la cadena de ADN debido a un desenrollamiento parcial de la doble hélice. Como la separación sucesiva de los pares de bases es aproximadamente de 3.4 Å en el B-ADN, la distancia se tiene que incrementar considerablemente para poder acomodar los voluminosos anillos aromáticos de la molécula. La expansión de la hélice es capaz de variar en un amplio rango (1.8-4.5 Å), así como el desenrollamiento (11-48°), dependiendo de la estructura de la molécula intercaladora y los nucleótidos involucrados [1].

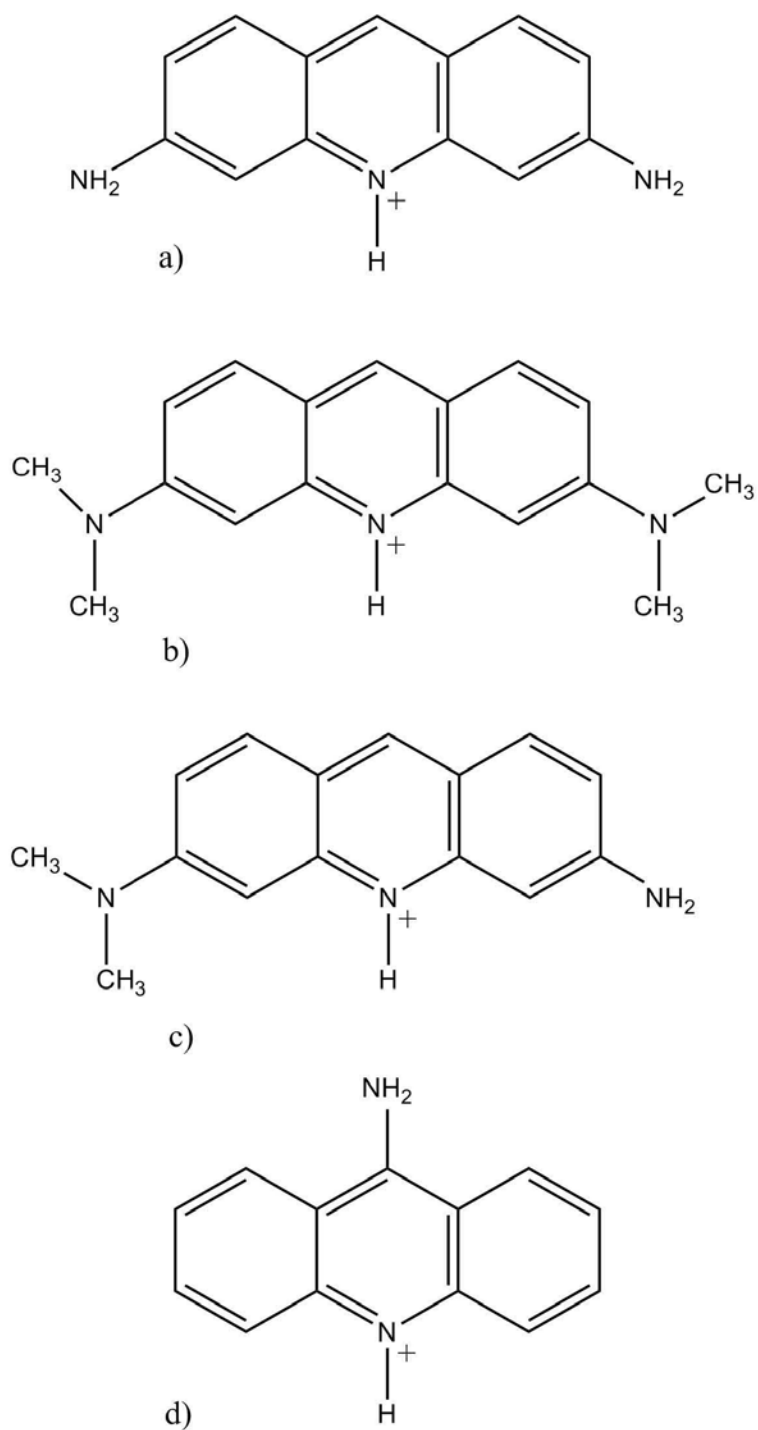


Figura 1.8: Fórmula química de la (a) proflavina, (b) naranja de acridina, (c) N, N-dimetilproflavina, y (d) 9-aminoacridina.

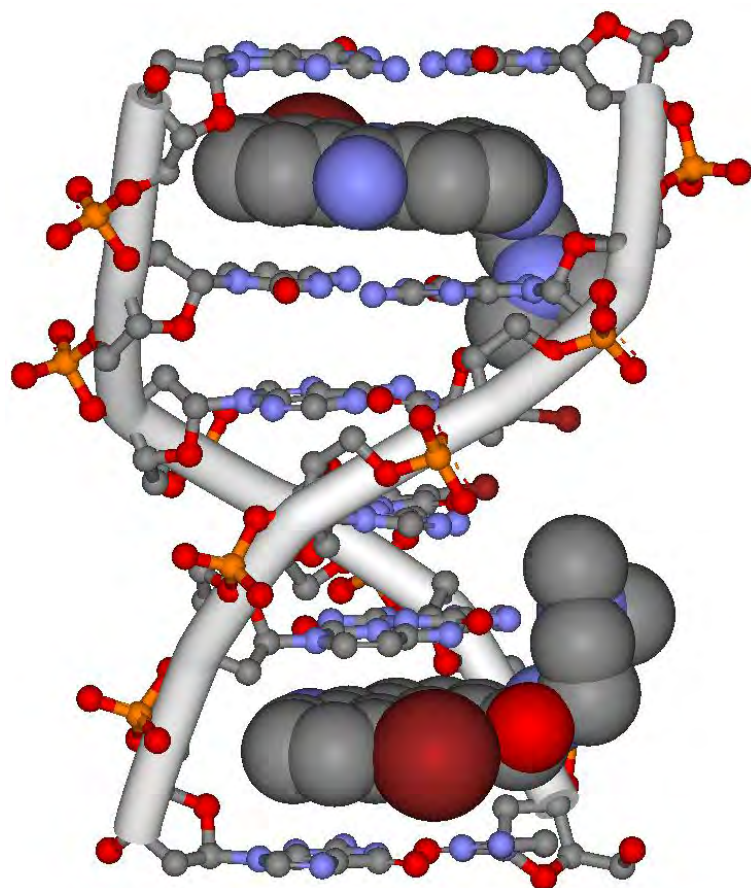


Figura 1.9: Estructura del complejo de acridina-4-carboxamida (DACA) intercalado en $d(\text{CGACGC})_2$ (PDB No. 367D).

La intercalación es el modo más común de interacción de pequeñas moléculas con el ADN, sin embargo, cada molécula tiene una preferencia de unión única. Algunas moléculas prefieren intercalarse entre un par de bases 5'-purina-pirimidina-3' en lugar de 5'-pirimidina-purina-3' o viceversa, mientras que otras moléculas no muestran ninguna diferencia en orden, pero muestran preferencia por ciertas secuencias de pares de bases. Por ejemplo, la aclacinomicina se intercala en CpG o GpC, mientras que la adriamicina se une a secuencias TpA o ApT en el ADN (Figura 1.11). Minúsculas diferencias en los mecanismos de unión determinan la preferencia de la secuencia para la intercalación en cada molécula, y generalmente resultan en diferencias en

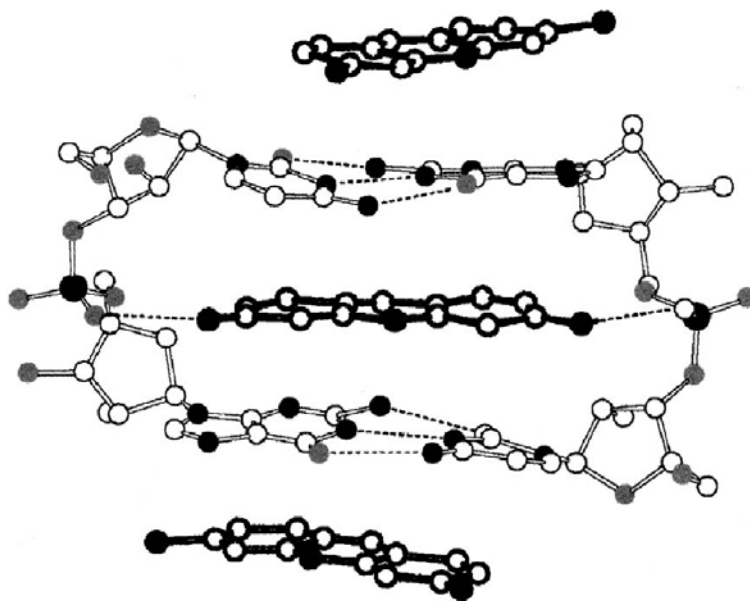


Figura 1.10: Estructura cristalina de la proflavina-d(CpG) (relación 3:2). Los átomos de nitrógeno y fósforo se muestran en negro y los oxígenos en gris. Las líneas punteadas representan puentes de hidrógeno

los resultados citotóxicos y farmacológicos. La intercalación de las moléculas está limitada a la regla del *vecino excluyente*, que dice que una molécula no puede ocupar dos sucesivos espacios entre los pares de bases. La regla está basada en experimentos donde se observa que la relación de la molécula con los grupos fosfatos siempre es menor a 0.2 (lo cual es el valor esperado si la unión se realiza saltadamente). La relación sería 1 si todos los posibles lugares de intercalamiento entre pares de bases fueran ocupados [17]. La regla del vecino excluyente aplica solo a cadenas de oligonucleótidos y ADN con un gran número de pares de bases. Pequeños oligonucleótidos, como los dinucleótidos, pueden acomodar una mayor concentración de moléculas intercalantes. La intercalación de moléculas entre las bases nitrogenadas del ADN o ARN alteran la transición $\pi - \pi^*$ del cromóforo intercalado. Esto es visible en la región visible del espectro como un corrimiento al rojo de aproximadamente 10 nm o más. La geometría exacta de las moléculas intercaladas y los pares de bases del ADN es diferente para cada caso y se puede determinar por medio de cristalografía de rayos-X o espectroscopía de RMN.

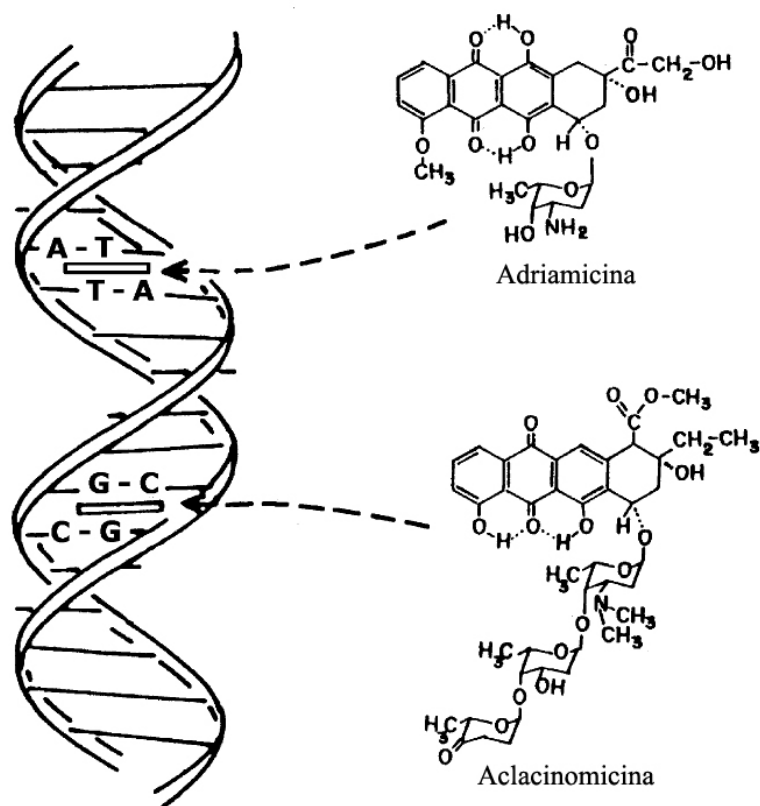


Figura 1.11: Diferentes estructuras interaccionan con diferentes posiciones del ADN.

Uno de los intercaladores más reconocido es el bromuro de etidio (Figura 1.12). funciona como un agente antimicrobiano, trypanocida y como agente fluorescente. Inhibe la síntesis del ácido nucleico dependiente del ADN [18]. Realiza estas funciones de manera muy eficiente por medio de intercalación con el ADN, interrumpiendo el proceso celular. Por lo mismo, es un potente carcinógeno y mutagénico. La molécula aislada absorbe luz en la región del visible a una máxima absorción en 480nm. Después de intercalarse con el ADN, la absorción máxima se corre a los 518nm y decrece la intensidad máxima.

Algunas otras moléculas reconocidas por ser claros ejemplos de intercalación son la daunomicina, la ditrisarubicina B, la aclacinomicina A y B, nogalamicina y una docena de derivados de cada una de las moléculas men-

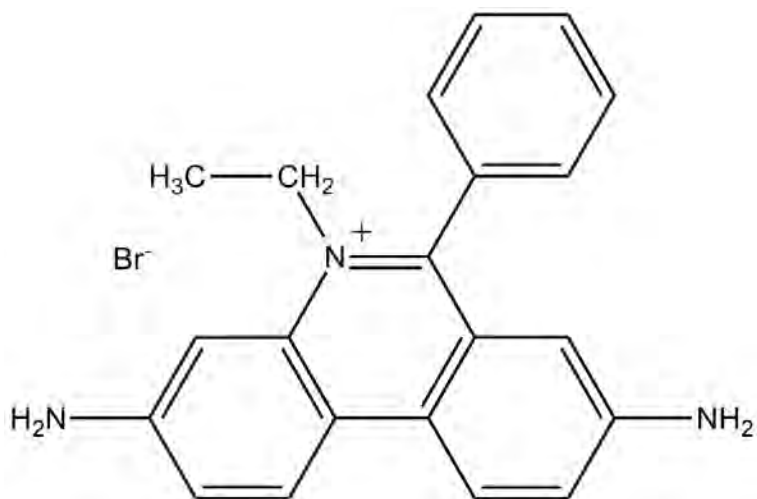


Figura 1.12: Estructura química del bromuro de etidio.

cionadas. Además de las moléculas capaces de intercalarse entre las bases nitrogenadas, existen moléculas con largas cadenas que permiten una doble o triple intercalación en diferentes puntos del ácido nucleico. Estas moléculas se sintetizaron tratando de crear enlaces de intercalación más fuertes y una mejor selectividad. Los intercaladores múltiples contienen motivos intercaladores conectados por cadenas que no se unen de ninguna forma a la cadena de polynucleótidos (Figura 1.13) [19].

1.1.3. Moléculas que interactúan con los surcos

La doble hélice de la estructura del ADN tiene un surco mayor y menor, con ancho y profundidad diferente, y un extremo de las bases nitrogenadas están expuestos al surco mayor, mientras que el otro extremo está expuesto al surco menor (Figura 1.3).

Como se puede ver en la figura 1.14, los antibióticos naturales como la netropsina y la distamicina son moléculas largas, flexibles y con forma de luna creciente, y contienen dos y tres anillos *N*-metilpirrol, respectivamente, que están conectados con una cadena peptídica directamente al grupo de la carga positiva ($C(NH_2)(NH_2)^+$) en la posición terminal. Como se verá a continuación, éstas moléculas encajan perfectamente en el surco menor de una

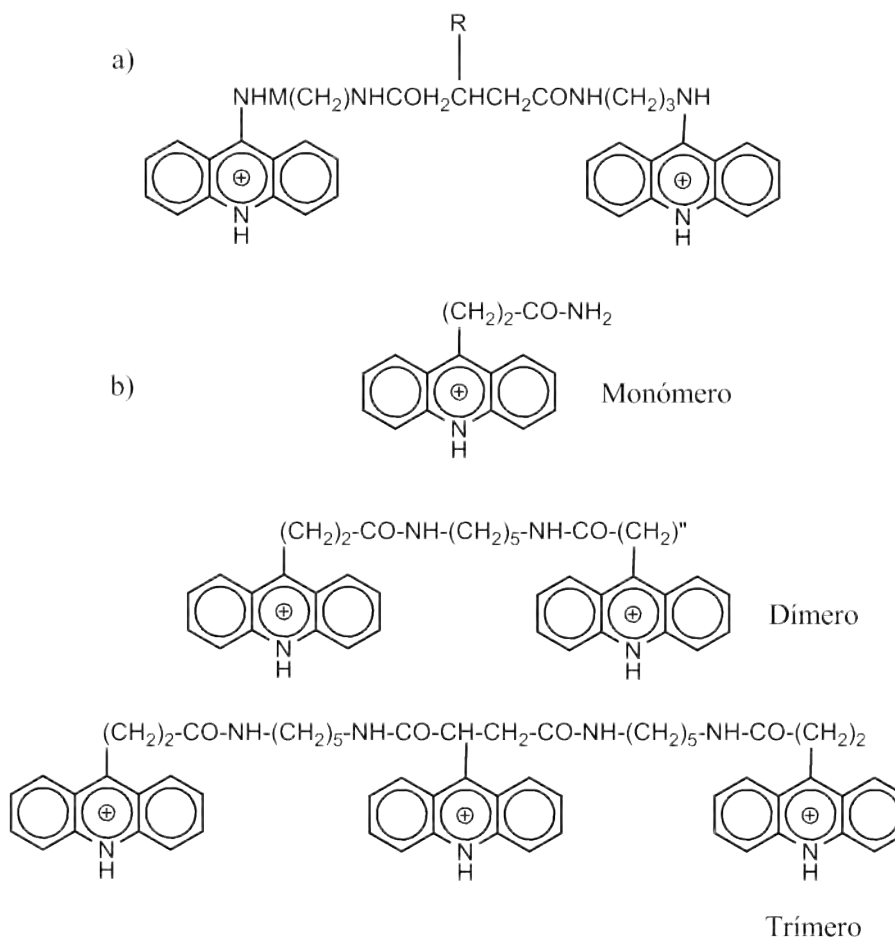
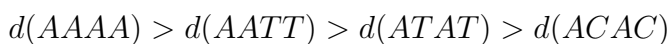


Figura 1.13: (a) Estructuras de acridinas bis- y tris-; (b) estructuras de acridinas mono, bis- y tris- intercalantes.

región rica de AT en el B-ADN, y sus aductos son estabilizados por enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas e interacciones de van der Waals. Estas moléculas no pueden unirse a una secuencia GpC, porque el grupo NH_2 de la guanina se inserta al surco menor y dificulta un buen acomodo de unión.

La netropsina se une a regiones ricas en AT con el siguiente orden de preferencia:



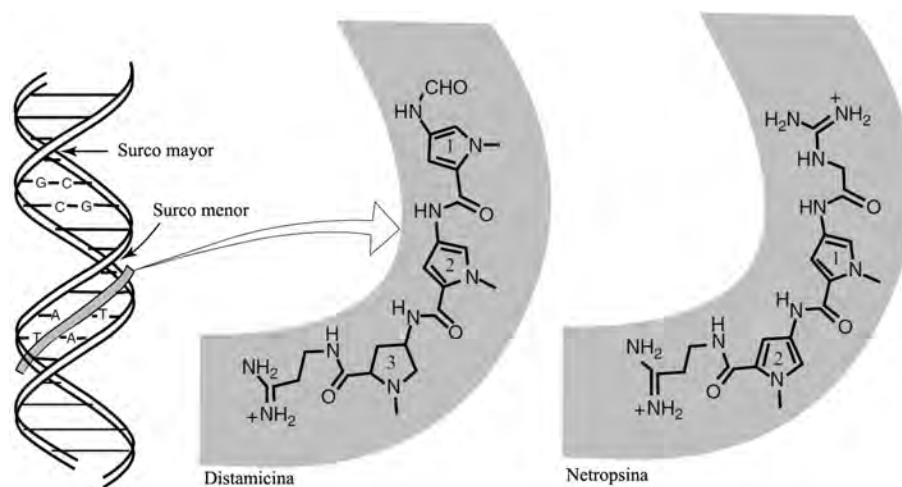
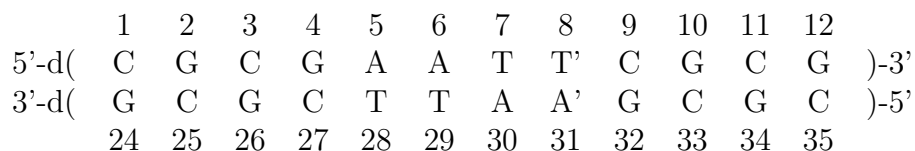


Figura 1.14: Dibujos conceptuales de unión al surco menor.

Hasta el momento, el mayor interés de la investigación está enfocada al origen de la especificidad de esta secuencia y el diseño de moléculas sintéticas que posean una preferencia por secuencias más largas. Se han sintetizado para este propósito un número de análogos de la distamicina y la netropsina y su selectividad de secuencias de bases nitrogenadas en ácidos nucleicos se han estudiado por medios experimentales, espectroscópicos y con métodos de Química Computacional. En general, se han clasificado en tres tipos: (1) crecimiento de una cadena peptídica, (2) reemplazo del *N*-metilpirrol por un imidazol u otros anillos, y (3) disminución de la carboxiamida ($\text{NH}-\text{C}=\text{O}$) [20]. Dickerson y sus colaboradores [21, 22] determinaron la estructura cristalina del complejo 1 : 1 de la netropsina acomplejada con un dodecámero de doble cadena:



La molécula se une a la región central AATT en el surco menor, reemplazando moléculas de agua en el “hueco” de hidratación. La unión de la netropsina es a través de tres puentes de hidrógeno bifurcados con el N3 de

la adenina o el O2 de la timina en el interior del surco. Las fuerzas electrostáticas y puentes de hidrógeno son responsables por una unión fuerte de la molécula con los átomos que forman el surco del B-ADN, sin embargo, la especificidad a cierta secuencia es determinada por contactos cercanos de van der Waals entre el C2H de la adenina y los anillos de pirrol CH(C5 y C11) o el CH₂(C2 y C16) de la netropsina. Los grupos catiónicos terminales NH₂(N1 y N10) están unidos al N3 de la adenina por puentes de hidrógeno (A₅ y A₁₇) y no a los oxígenos del grupo fosfato perteneciente a la cadena principal del B-ADN. Puentes de hidrógeno se encontraron en el análisis por rayos-X de la distamicina unida a d(CGCAAATTTGCG)₂ [23]. Este tipo de estructuras se denominaron “clase I” [22]. Por otro lado, se han encontrado estructuras con diferentes maneras de unión de la netropsina con el surco menor. Estudios con rayos-X de la molécula unida a d(CGCGATATCGCG)₂ [24] y d(CGCG’AATTCGCG)₂ (G’=O6-etilguanina) [25] sugieren un arreglo desordenado donde la molécula se une en dos diferentes orientaciones. Estos casos se conocen como de “tipo II”. La posición de la molécula en el surco menor se desplaza hacia el par de bases siguiente en la cadena y no existen puentes de hidrógeno bifurcados como los observados en los aductos de clase I. La especificidad de la secuencia de AT observada en la netropsina no se puede explicar con una estructura clase II. Estudios teóricos empleando dinámica molecular soportan la estructura de la netropsina unida al oligo d(GGAATTC)₂ como un complejo de clase I [26].

Pelton y Wemmer [27] determinaron la estructura de la distamicina formando un complejo con la cadena d(CGCGAATTCGCG)₂ utilizando espectroscopía 2D NMR y simulaciones teóricas con dinámica molecular. La molécula encaja en la región AATT en el surco menor y forma puentes de hidrógeno bifurcados como los observados por el aducto de la netropsina (Figura 1.15). Los anillos pirrólicos 1 y 2 están casi paralelos entre ellos pero el anillo 3 necesita rotar considerablemente para entrar al surco. El complejo se caracteriza por tener contactos de van der Waals entre el C2H de la adenina y los protones H3 del pirrol. Se ha sugerido que, además de los enlaces por puente de hidrógeno y la estabilización electrostática, se presentan interacciones de apilamiento entre los átomos O1’ de los azúcares de las adeninas y los tres anillos pirrólicos, contribuyendo a una mayor estabilidad del aducto. La distamicina forma un complejo 2 : 1 con la doble cadena d(CGCAAATTGGC)·d(GCCAATTTGCG). Pelton y Wemmer [28] determinaron la estructura en solución de este complejo utilizando espectros-

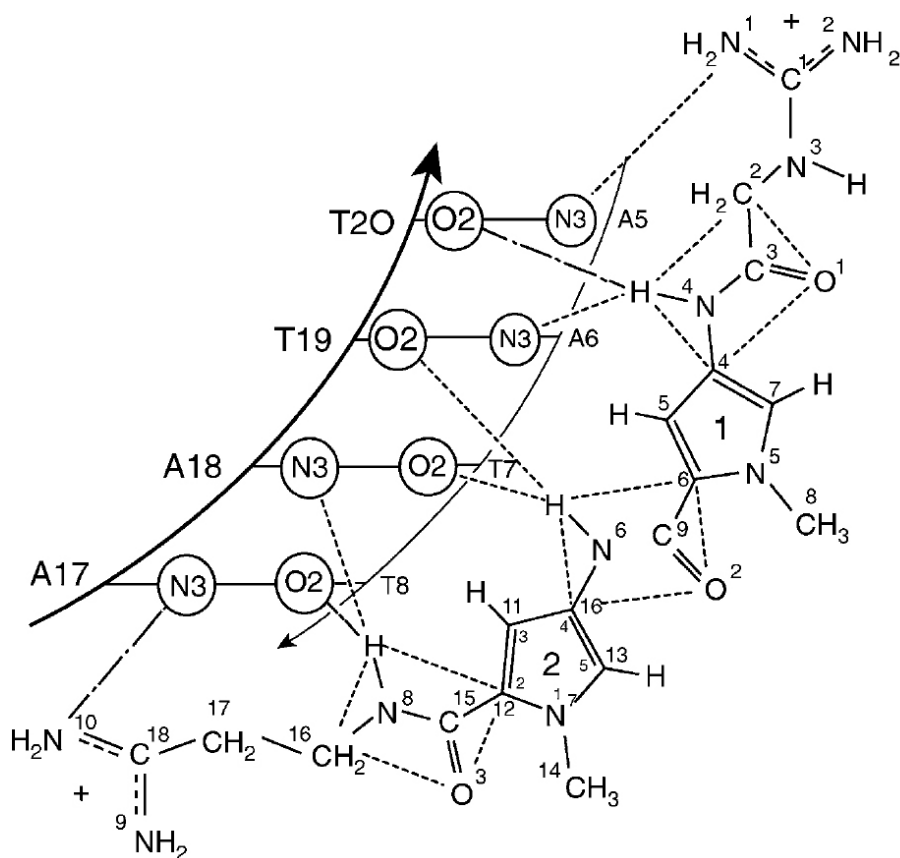


Figura 1.15: Diagrama de la netropsina unida al surco menor del dodecámero. solo se muestran los átomos de la adenina N3 y de la itmina O2. Las líneas punteadas con punto indican que los enlaces N-N o N-O son distancias de puentes de hidrógeno y las líneas punteadas muestran distancias de 3.2 Å o mayores.

copía 2D NMR y técnicas de refinamiento molecular. Como se puede ver en la figura 1.16, dos moléculas de distamicina se unen a la región 5'-AAATT-3' y adquieren una orientación antiparalela, logrando disminuir la repulsión electrostática entre dos cargas positivas. Estudios de dinámica molecular muestra que el surco menor incrementa de tamaño expandiéndose para acomodar dos moléculas en esta orientación. [29]

Existen numerosos derivados de la netropsina y la distamicina, ambos naturales y sintéticos. Sus interacciones con oligonucleotidos y ADN se han estudiado utilizando numerosas técnicas fisicoquímicas. La mayoría de estos

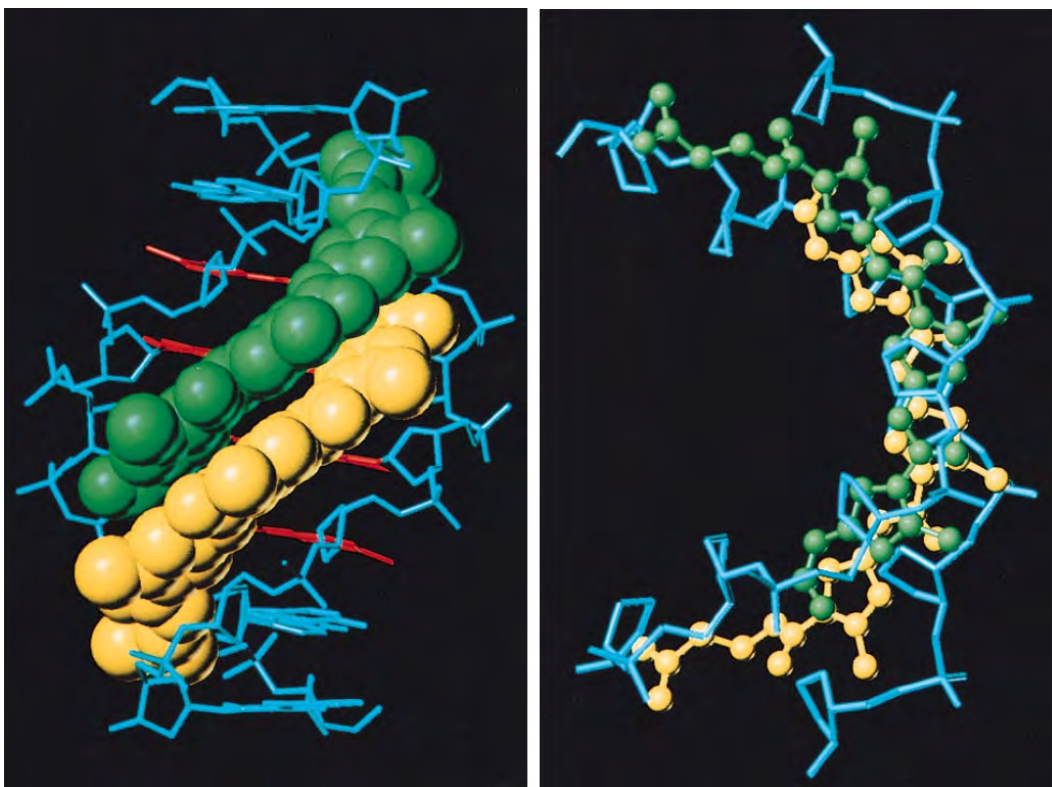


Figura 1.16: Diagrama del complejo 2:1 distamicina-d(CATATTC)₂.

derivados tienen preferencia a una región rica en AT del ADN. Unión con secuencias de GpC son desfavorables por interferencias estéricas entre los protones H3 de los anillos pirrólicos y el grupo exocíclico NH₂ de la guanina. Algunos derivados se pueden unir a regiones de 5 a 7 pares de bases con secuencias de A-T y G-C. La netropsina contiene tres amidas (NH-C=O) que pueden reconocer cuatro pares de bases en secuencias sucesivas. Dervan y colaboradores [30, 31] han demostrado que un oligo(*N*-metilpirrolcarboxamida) conteniendo n amidas ($n-1$ anillos pirrólicos) puede reconocer $(n+1)$ secuencias de pares de bases, y esta regla de $n+1$ es válida hasta $n=7$ pues los péptidos más largos que $n=7$ ya no pueden encajar en el giro natural del B-ADN. Dervan, Wemmer, y colaboradores realizaron una extensa investigación de péptidos de oligopéptidos con anillos pirrólicos y con imidazoles y determinaron la estructura en solución de aducto 2:1 de la molécula ImN con la

secuencia d(GCATGACTCGG)·d(CCTTGTTAGGC) [32]. Muchos medicamentos sintéticos que buscan formar una unión con las cadenas de ADN contienen una variedad de anillos aromáticos y/o anillos heterocíclicos en lugar de anillos de *N*-metilpirrol como los contienen la distamicina y la neptrosina. Estos compuestos también asumen una forma estructural de luna creciente y se unan a una región rica en AT en el surco menor del ADN por medio de puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones coulombicas. Un ejemplo típico es la molécula Hoechst 33258, en la figura 1.17. Contiene dos anillos de benzimidazol en el centro con un anillo fenólico y un grupo cargado de *N*-metilpiperazina.

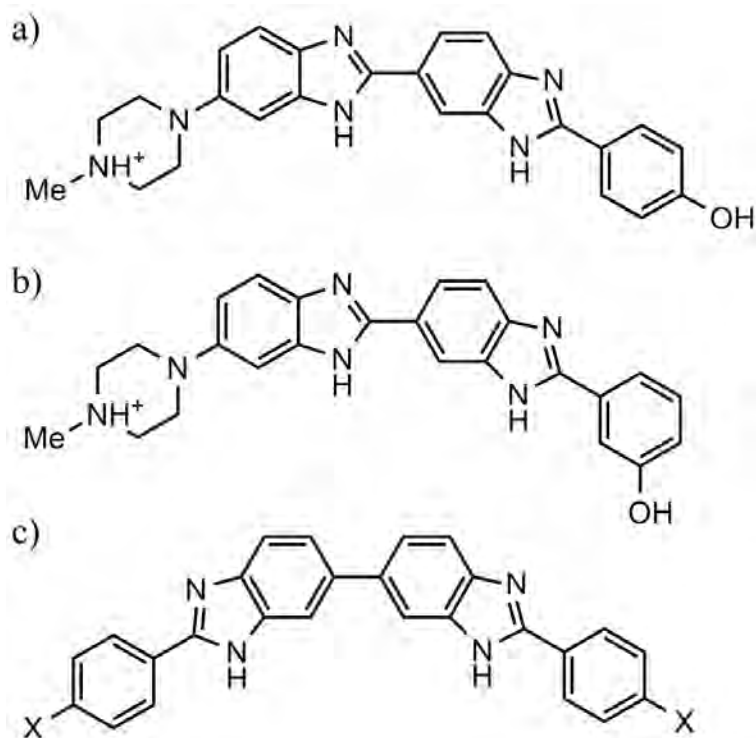


Figura 1.17: (a) Estructura del compuesto Hoechst 33258, (b) el análogo *meta*-hidroxilo y (c) un compuesto bisbenzimidazol.

Los antibióticos y antitumorales cromomicina A₃ y la mitramicina, Fig. 1.18, son extraídos de las bacterias *Streptomyces griseus* y *Streptomyces plicatus* respectivamente. Estas moléculas consisten de un anillo cromóforo de

aglicon unido por un disacárido (A-B), un trisacárido (C-D-E), y una cadena lateral hidrofílica. A diferencia de las moléculas que se unen al surco menor en una sección rica en pares de bases AT, la cromicina (A_3) y la mitramicina se unen a una región rica en bases GC del oligonucleótido con una proporción de 2:1 (molécula/complejo) en presencia de iones divalentes metálicos como el Mg^{2+} .

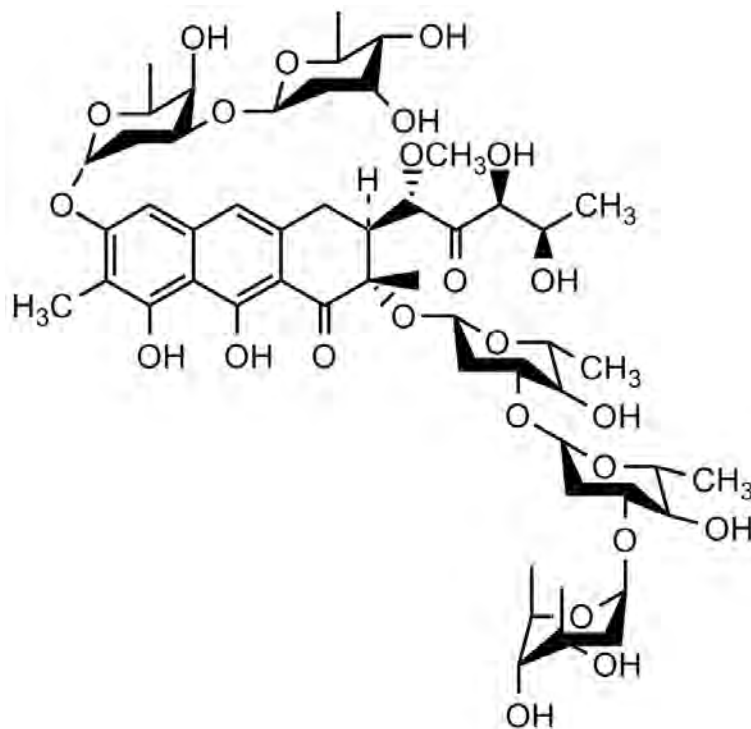


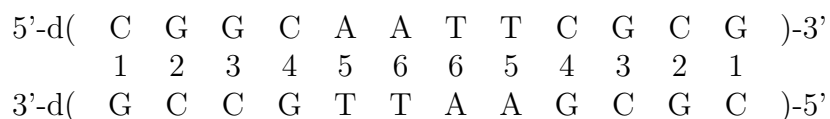
Figura 1.18: Estructura de la mitramicina.

La estructura en solución del complejo cromomicina-d(TTGGCCAA)₂ se determinó utilizando espectroscopía 2D-NMR y mostró como la molécula se una a la región central GGCC como un dímero simétrico e induce como es de esperarse, un cambio conformacional en la cadena de doble hélice B-ADN, resultando en un surco menor mas ancho y profundo en el sitio de unión. Esto es en contraste con lo que ocurre con la netropsina y la distamicina que se unen al surco menor en una región rica en pares de bases AT con un cambio conformacional mínimo del ADN. Se ha sugerido que la especificidad hacia

las bases GC están asociadas a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos OH de la mitramicina con los átomos N3 (aceptor) o el grupo NH₂ (donador) de la guanosina. La molécula topotecan (Tpt), es otro ejemplo de moléculas que se unen al surco menor del ADN, con especificidad a sitios de GpC. El grupo de Streltsov realizó estudios de espectroscopía y dicroísmo circular para confirmar la formación del complejo [33], sin embargo, no se observan cambios conformacionales importantes en la cadena principal del ADN.

Interacción con surcos e intercalación simultaneas

Como se observó en la sección 1.1.2, la molécula de actinomicina D es un *intercalador* típico en un sitio GpC, mientras que la netropsina es una molécula típica de *unión al surco* en el sitio ApT. Utilizando espectroscopía NMR, Patel y colaboradores [34, 35] demostraron que estas dos moléculas se pueden unir simultáneamente a la secuencia de 12 pares de bases:



Una variedad de moléculas híbridas (*combilexinas*) en donde una molécula que forma una interacción con el surco menor se une covalentemente con un intercalador por medio de ligantes especiales se han sintetizado por Bailly y sus colaboradores [36]. La unión de moléculas espera tener una mayor estabilidad y especificidad con las secuencias de bases a comparación de los componentes por separado. Se puede ver un ejemplo en la figura 1.19 de la molécula ThiaNetGA en donde un análogo de la netropsina (ThiaNet) está unido a una amino-acridina. Estudios del comportamiento de esta molécula muestran la unión con el surco menor del motivo ThiaNet mientras que la acridina esta parcialmente intercalada. Existen muchas otras propuestas de moléculas con comportamiento híbrido que aun están en etapa de prueba para detectar actividad biológica y su mecanismo de unión con los ácidos nucleicos.

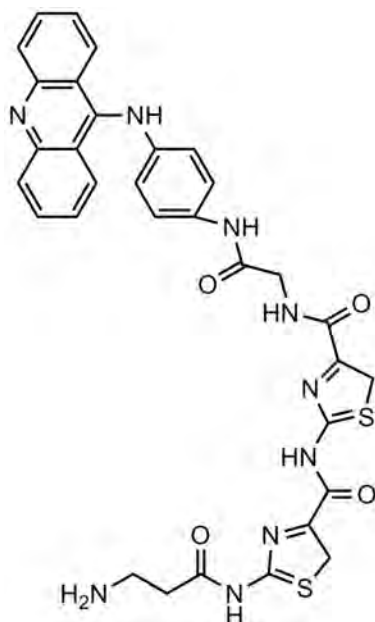


Figura 1.19: Estructura de la molécula híbrida ThiNetGa.

1.1.4. Moléculas que forman enlace covalente

Algunas moléculas antitumorales inhiben la replicación y transcripción del ADN por medio de *unión covalente* con las bases nitrogenadas del ADN. Estas moléculas también se conocen como *agentes alquilantes* porque en la formación del aducto, los nucleótidos son alquilados por este tipo de principios activos. Algunos de estos ejemplos incluyen la interacción con metales de transición que se revisarán a fondo en la sección 1.1.6.

La molécula (+)CC1065 es un antitumoral quiral de alta potencia que se extrae de *Streptomyces zelensis*. Como se muestra en la figura 1.20, está formada por 3 subunidades, dos de las cuales (**B** y **C**) son muy similares, y la subunidad **A** forma un *enlace covalente* con el átomo N3 de la adenina. Basándonos en el análisis de rayos-X realizado por Chidester y sus colaboradores [37], la molécula es curva y presenta un leve giro con donadores de puentes de hidrógeno. En el mismo análisis, los investigadores encontraron que la máxima interacción ocurre con poly(dA-dT)₂. Aunque la molécula de (+)CC1065 presenta citotoxicidad en diferentes líneas de células tumorales

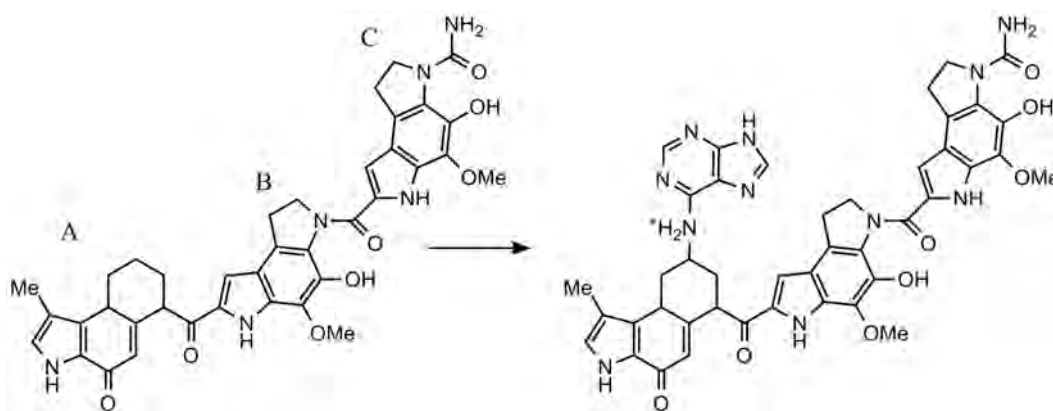


Figura 1.20: Estructuras del compuesto CC1065 y el aducto con la adenina. El compuesto posee una conformación (+) en el carbono quiral C4a.

humanas, retarda la muerte en ratones y conejos a una dosis mucho menor que la terapéutica. Por este motivo, se abandonó la investigación clínica. Para entender el origen de su citotoxicidad y para desarrollar nuevas moléculas con mayor eficiencia terapéutica, se han sintetizado un cierto número de derivados de la estructura original y han sido probados con los ensayos biológicos acostumbrados.

Los compuestos (+)-duocarmicina A (DA) y (+)-duocarmicina SA (DSA) son compuestos similares a la molécula de (+)CC1065 (Fig. 1.21) alquilan el átomo N3 de la adenina en el surco menor de una cadena de ADN. Se conoce que las duocarmacinas se unen preferentemente a las secuencias 5'-(A/T)-A-A-A*-3' y a 5'-(A/T)-T-T-T-A*-Pu-3'. Lin y Patel [38] estudiaron la estructura en solución del DA en presencia de una cadena de 19 nucleótidos por medio de espectroscopía 2D-NMR y encontraron una interacción covalente en la adenina 12 de la secuencia. Se pueden observar cambios en el surco menor en donde se encuentra la molécula, que reflejan la hibridación del átomo C2 de la DA. La preferencia de secuencia en la D-A y D-SA son similares, prefiriendo una secuencia de 5'-AAA* 5'-TTA* 5'-TAA* 5'-ATA*. Adicionalmente, A o T se unen con más facilidad que G o C en la cuarta 5' base de la secuencia analizada. El DSI es un análogo del DSA pero sin los tres grupos metoxi en el anillo B del DSA. El aducto se estudió por medio de espectroscopía ^1H . En el estado libre, las subunidades A y B de estas moléculas son coplanares. Cuando se realiza la alquilación, las subunidades

giran, y el ángulo de giro relativo de las dos subunidades es de 45° para el DSA y 37° para el DSI. Mientras más grande el giro, mayor la deformación del ADN en el sistema conjugado. Como resultado, el DSA es más reactivo y su capacidad de alquilación es mayor que la del DSI.

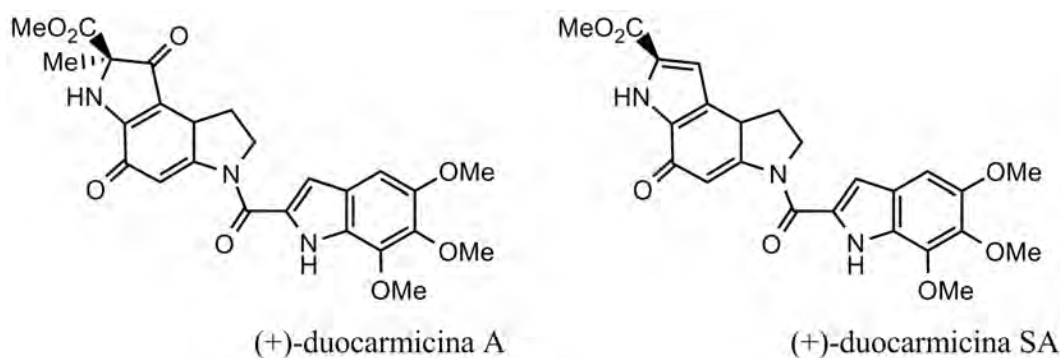


Figura 1.21: Estructuras de la duocarmicina.

Otro derivado de (+)CC1065 es la bizelesina. Está formada por dos subunidades **A** de (+)CC1065 unidas por un ligante rígido y una dos bases de adenina en cadenas opuestas. La estructura en solución del aducto con el decámero $d(\text{CGTAATTACG})_2$ se determinó por medio de espectroscopía $^1\text{H NMR}$ [39]. En este caso, ocurre una unión entre diferentes hebras de ADN directamente sobre las adeninas que resulta un dos aductos. Un aducto contiene el paso ApT en donde ambas adeninas están orientadas de manera *syn*, mientras que el otro aducto contiene el paso ApT orientado de manera *anti* sin mostrar ninguna evidencia de puentes de hidrógeno con las timinas. Existen otras moléculas conocidas como agentes alquilantes de bases nitrogenadas y/o cadenas de ADN. De las más importantes podemos mencionar la antramycin y la tomamicina, aisladas de diferentes cepas de *Streptomyces*. Las ecteinascidinas, aisladas de *Ecteinascida turbinata*; las mitomicinas, extraídas de *Streptomyces caespitosus*; y los agentes alquilantes intercaladores como la hedamicina, la altromycin B, los antibióticos con antraciclinas como la daunorubicina (DAU) y la doxorubicina (DOX), el antibiótico SN07, entre una gran variedad de moléculas similares.

1.1.5. Moléculas nucleasas

En 1966, Umezawa y sus colaboradores [40] descubrieron una familia de antibióticos de tipo glicopeptídicos llamadas *bleomicinas* (BLMs), aislados como complejos con cobre de *Streptomyces verticillius*. La molécula de BLM que no contiene cobre puede unirse a cadenas de ADN con una preferencia de 5'-GpC-3' y en presencia del ión ferroso y oxígeno molecular, en 5'-GpT-3'. La figura 1.22 muestra la estructura más común de la bleomicina, BLM-A₂ que consiste de un dominio que se une al ADN y un dominio que se une al metal, ambos unidos por un ligante especial. El primero dominio es un anillo de bis-tiazol (BTZ) en donde el sustituyente terminal contiene un grupo dimetilsulfonio (grupo R). Existen moléculas análogas al BLM-A₂ como el BLM-B₂ y la peplomicina, donde la variación se da en el grupo R. El dominio donde está presente el metal es una molécula de β -aminoalaninapirimidina- β -hidroxihistidina, el cual se coordina con un ión metálico como el Fe(II) o el Co(II) por medio de cinco átomos de nitrógeno, para formar una estructura de pirámide de base cuadrada distorsionada. La coordinación con el O₂ en la posición axial es la forma activa del BLM, y este intermediario tiene una vida media muy corta pues produce especies radicales y extrae el 4'H de la desoxirribosa, resultando en una escisión de la cadena de ADN. Se han realizado muchas investigaciones para determinar el modo de unión del BLM con cadenas de ADN y entender un mecanismo de reacción para la unión del ion metálico hacia el ADN. [41, 42, 43]

Otro tipo de antibióticos descritos a detalle por el grupo de trabajo de Yue son las enedinas [44], como las calicheamicinas, esperamicinas y las neocarzinostatinas tiene su actividad antineoplásica debido a su unión con las dobles cadenas de ADN. Esta familia de moléculas contienen anillos de enedina que producen especies reactivas al activarse por medio de agentes reductores como el tiol o algunos otros métodos. Existe una variedad de interacciones entre estas moléculas y el ADN, específicamente, hacia los protones de los azúcares de los nucleótidos. Como la unión hacia el ADN de doble cadena es una de las principales formas de citotoxicidad, estas moléculas son altamente citotóxicas, y su actividad antitumoral se ha reportado como mil veces más alta que la adriamicina o la doxorubicina. El mecanismo de acción de los antibióticos de enedina ha sido estudiado por Smith y Nicolaou. [45]

La esperamicina A₁ (Fig. 1.23) es un antibiótico y un anticancerígeno extraído de la *Actinomyces verrucosopora*. Se une a los sitios nucleicos de una

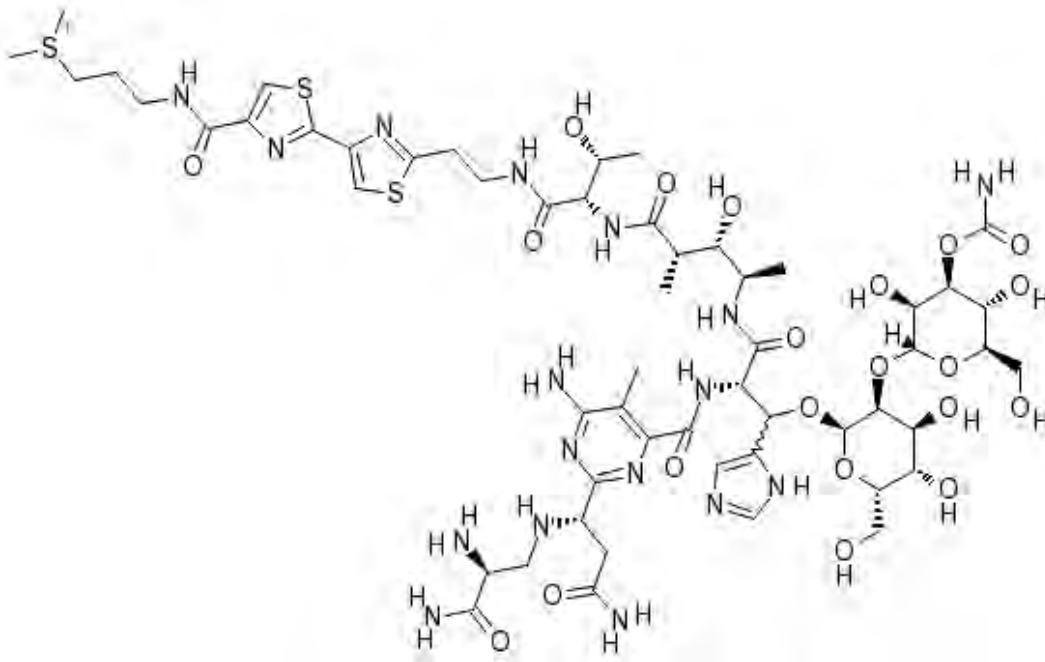


Figura 1.22: Estructuras de la bleomicina.

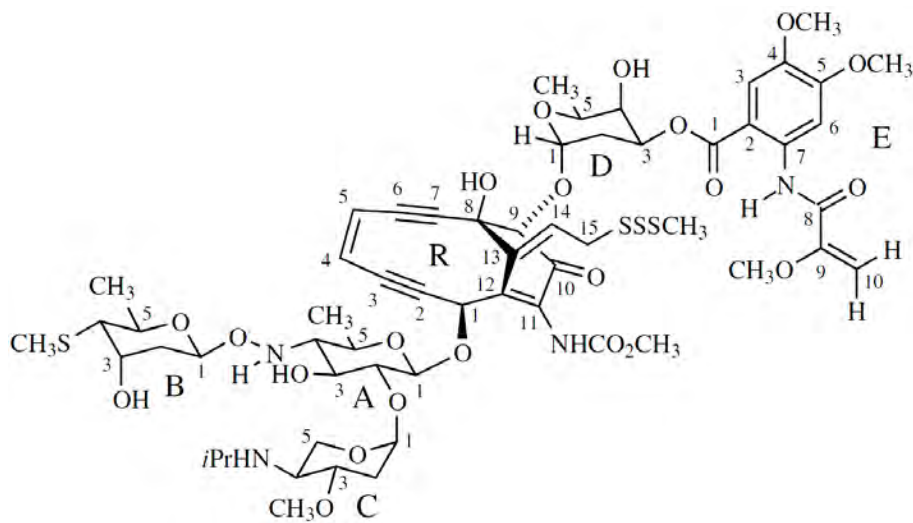


Figura 1.23: Estructuras de la esperamicina A₁.

sola cadena, así como a los de doble cadena cuando son activados por agentes reductores (tioles) o luz UV. A pesar que la esperamicina A_1 no muestra ningún tipo de preferencia a cierta secuencia, se ha visto que el punto de unión de preferencia estén el orden de $T > C > A > G$. El origen de su actividad citotóxica es la unión al sitio 3-ene-1,5-dieno (anillo R), que produce especies reactivas. Como se muestra en la Fig. 1.23, el anillo R está unido a un trisacrido (anillos A-B-C) en un punto, y una fucosa (anillo D) en el lado opuesto. Para determinar el modo de unión de la esperamicina A_1 , Kumar y colaboradores [46] estudiaron la estructura del complejo 1:1 en solución con cadenas duplex de 8 pares de bases utilizando espectroscopia NMR-2D y cálculos de dinámica molecular. Estos trabajos mostraron 88 puntos de unión intermoleculares, la mayoría observados en el dominio E de la molécula y en los pares de bases G_2-C_{15} . Se encuentran en estos trabajos el dominio E del grupo metoxiacril intercalado en el surco menor del ADN entre los pares de bases G_2-C_{15} y G_3-C_{14} y el anillo R, junto con los anillos de los motivos A-B-C centrados en el segmento $A_4-T_5-C_6$. Los átomos prorradicales C_3 y C_6 de la enedina se alinean con los hidrógenos H_5' del C_6 y el H_4' de la C_{14} . El residuo tiometil del azúcar (anillo B) está interactuando con el surco menor con sus caras sandwichadas entre las paredes del surco, y el átomo de azufre forma un puente de hidrógeno con el protón de la amina de la G_{11} . La conformación de la doble hélice es del tipo B, sin embargo, se puede notar un severo desenrollamiento cerca del sitio de intercalación y ensanchamiento del surco menor cubriendo la enedina. Los cambios de estructura en el B-ADN son resultado de (1) la complementariedad de la base del surco menor con la molécula que se intercala, (2) intercalación del anillo de natranilato entre las bases puricas, y (3) creación de enlaces de hidrógeno intermolecular entre el azúcar con el tiometil y la cadena de ADN.

1.1.6. Iones metálicos y moléculas con metales

La interacción de iones metálicos y compuestos de coordinación con metales de transición y los ácidos nucleicos tuvo un avance significativo a raíz del descubrimiento del cis-platino [diaminodicloroplatino] y principios activos similares como potentes inhibidores de neoplasias en los años 60's [47]. La importancia biológica que tiene la interacción de iones metálicos y ácidos nucleicos es evidente. Uno puede mencionar la importancia que tiene la presencia de iones metálicos en muchos procesos naturales donde los ácidos

nucléicos están involucrados con un papel principal. Las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos poseen diferentes afinidades hacia los iones metálicos. El orden de estabilidad para los metales de transición 3d formando complejos con nucleobases son: $G > A$, $C > T$ [48]. En condiciones fisiológicas de temperatura y pH, los sitios de unión de preferencia para las nucleobases son: guanina N7, adenina N1 y/o N7, citosina N3 y timina O4. Para los nucleótidos, la relación de unión entre una base nitrogenada o el grupo fosfato depende mucho del tipo del ión metálico. Eichhorn y Shin estudiaron el efecto de un grupo de iones metálicos sobre la temperatura de fusión del ADN (figura 1.24) [49].

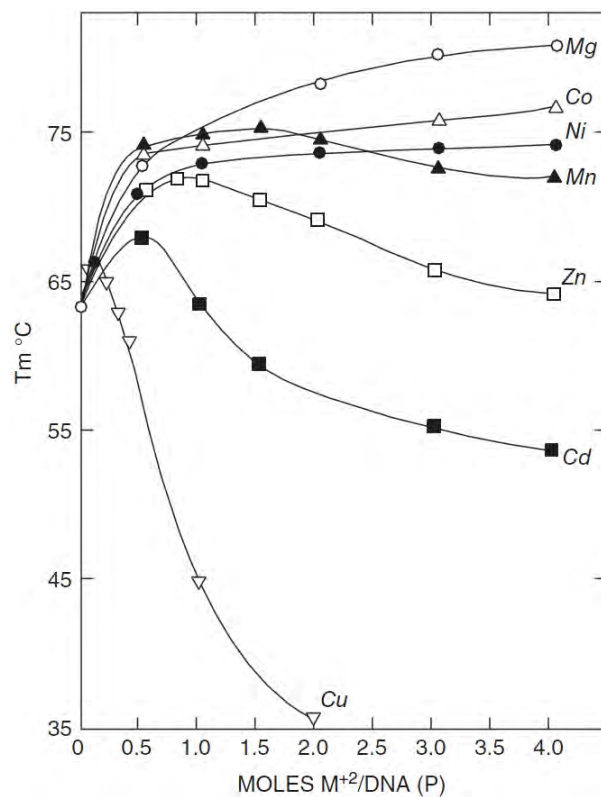
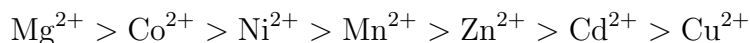


Figura 1.24: Variaciones de la temperatura de fusión de soluciones de ADN como función de la concentración de iones metálicos divalentes.

Los autores sugieren que los iones magnesio incrementan la T_m uniéndose a los grupos fosfatos del ADN y estabilizando la doble hélice, mientras

que los iones de cobre disminuyen T_m uniéndose a las bases nitrogenadas y desestabilizando el esqueleto de la doble hélice. Basado en las variaciones de T_m inducidas por los iones metálicos, se sugiere que el orden relativo para la afinidad de los metales con los grupos fosfato del esqueleto del ADN es:



Los iones metálicos pueden interactuar con ácidos nucleicos de dos diferentes maneras: *unión difusa* y *unión de sitio*, ambas son importantes para la estructura y función de los ácidos nucleicos. En la *unión difusa*, el metal y el ácido nucleico mantienen su capa de hidratación y la interacción es por medio de las moléculas de agua [50]. Esta es una interacción de largo alcance de tipo Coulómbica, en donde los cationes metálicos se acumulan alrededor del ácido nucleico de manera deslocalizada: por ejemplo, como contraiones. En la *unión de sitio*, el metal se encuentra coordinado con ligantes específicos del ácido nucleico; la coordinación puede ser directa (de esfera-interior) o por medio de moléculas de agua (de esfera-exterior). En la unión de esfera-exterior, solo la esfera de solvatación más interna del metal se mantiene intacta, y el metal y los ligantes del ácido nucleico comparten esferas de solvatación. En la unión de esfera-interior hay un contacto directo del metal con el ácido nucleico. Es necesario para que se realice la unión de esfera-interior, la previa des-solvatación del ión metálico y del sitio de unión del ácido nucleico antes de que una interacción ocurra. El mecanismo de unión de esfera-interior se inicia probablemente por una unión difusa, en donde el metal y el ácido nucleico están separados por no más que dos capas de moléculas de solvente [51]. Este paso es controlado por la difusión del solvente. El siguiente paso es que el ión metálico y el ácido nucleico formen un complejo de esfera-exterior, separados solamente por una capa de solvente. Este paso depende principalmente de las atracciones electroestáticas y los puentes de hidrógeno entre el metal y el ácido nucleico. En el paso final, el metal y el ácido nucleico realizan un contacto directo (unión de esfera-interior). La nucleoatracción del sitio de coordinación es el principal factor de unión. En los últimos dos pasos, los efectos estéricos también realizan un papel importante. Existen diversos estudios para cuantificar la importancia del potencial electrostático molecular (MEP) en el sitio de unión del ácido nucleico donde se forma el enlace entre la esfera-interior del complejo. Se encontró una correlación alta entre estos factores, y hay sido utilizados para predecir los sitios de unión del ADN más reactivos para la metalación o la metilación [52, 53].

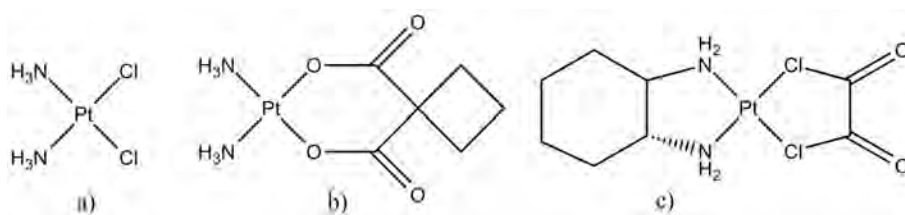


Figura 1.25: Estructuras del cisplatino (a), carboplatino (b) y oxaliplatino (c).

En 1965, Rosenberg y colaboradores observaron [47] la actividad biológica de complejos de platino durante una investigación del efecto del campo eléctrico sobre el proceso de crecimiento de células de *Escherichia coli*. En el trabajo siguiente [54], descubrieron que algunos complejos de platino poseían propiedades antitumorales. Entre esas moléculas, el complejo de platino cuadrado-plano, *cis*-diamindicloroplatino(II), *cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂ (abreviado como *cisplatino*) resultó ser extremadamente eficiente para tratar neoplasias como cancer testicular y de ovario. El efecto del cisplatino como agente quimioterapéutico se origina probablemente en un ataque al ADN. Desde entonces, se han realizado un sin número de estudios en búsqueda de medicamentos más potentes, con un gran rango de actividad y tratando de reducir los efectos tóxicos al mínimo. Hasta el momento, más de 3000 análogos del cisplatino se han preparado para ensayos clínicos. Sin embargo, solo unos pocos compuestos se usan actualmente en la terapia clínica: el cisplatino, el carboplatino y el oxaliplatino (figura 1.25).

Cuando el cisplatino se encuentra en presencia del ADN, se forman los cuatro compuestos mostrados en la figura 1.26b [55]. En todos los casos, los ligantes Cl del cisplatino se reemplazan por los átomos N7 de la guanina o adenina para formar enlaces covalentes Pt-N (figura 1.26a), mientras que los dos ligantes NH₃ permanecen intactos. En 1985 y 1988, Lippard y su grupo [56],[57] reportaron la estructura del *cis*-[Pt(NH₃)₂(pGpG)] por medio de cristalografía de rayos-X confirmando la formación de aductos.

Otros metales se han utilizado para encontrar una molécula capaz de incrementar la eficiencia del cisplatino, tratando de bajar la toxicidad. Los metales más comúnmente empleados son el Pd(II), Au(III), Ru(III), Cu(II), Zn(II) y otros. Algunos de los complejos metálicos muestran citotoxicidad

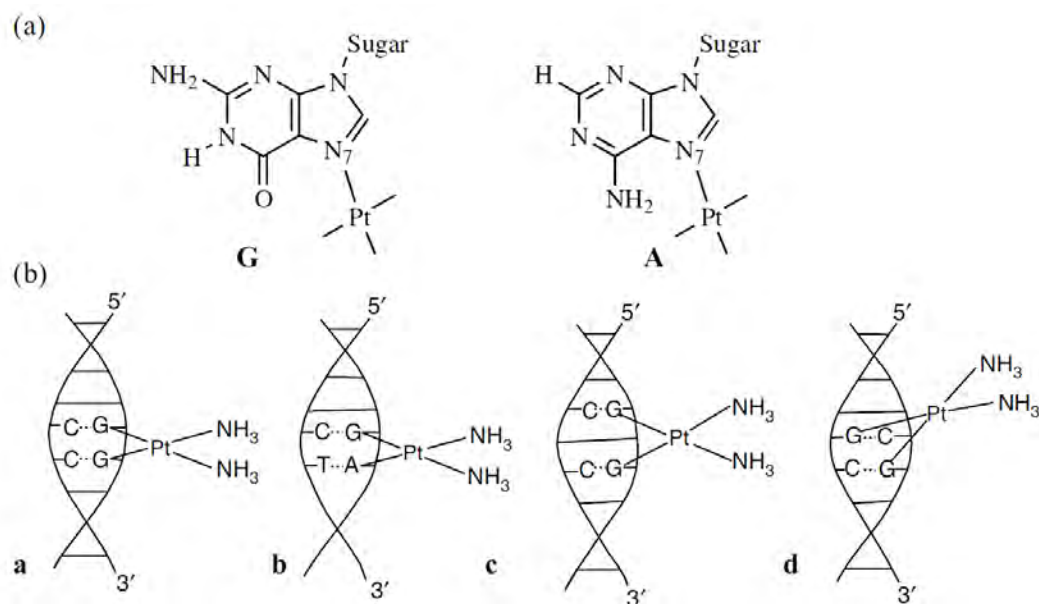


Figura 1.26: (a) Modos de unión del cisplatino con guanina (G) y adenina (A); (b) 1-2-intercadena GpG (estructura a), 1,2-intercadena ApG (estructura b), 1-3-intercadena GpNpG (estructura c) (N=cualquier base), y 1,2-intercadena GpG (estructura d).

comparable o mayor al cisplatino. Aún cuando existe información de la formación de unión entre las cadenas similar a los complejos con Pt, no existe información estructural detallada en la mayoría de los casos.

Los compuestos de Au(III) [Au(esal)Cl₂] (esal = *N*-etilsaliciladimidato) y su derivado *N*-metilado, muestra una gran citotoxicidad contra las líneas de células humanas A2780/S (sensibles también al cisplatino) y su citotoxicidad hacia la línea A2780/R (que es resistente al cisplatino) es mucho mayor que cisplatino [66]. El cuadro 1.3 contiene un resumen de estructura y citotoxicidades de otros complejos metálicos. Los primeros seis compuestos son octaédricos exa-coordinados y los últimos tres compuestos son tetrahédricos. Todos estos compuestos muestran una alta actividad anticancerígena *in-vitro* sugiriendo un mecanismo de acción similar al del cisplatino. Otros tipos de interacciones como enlaces de hidrógeno e interacciones coulombicas pueden estar involucradas dependiendo de la estructura y la orientación del

Estructura	Citotoxicidad	Ref.
$[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{Cl}_2](\text{forma-}\alpha)$	Valor de DL_{50} comparable con el cisplatino (línea celular MCF7)	[58, 59]
$\text{mer-}[\text{Ru}(\text{terpy})\text{Cl}_3]$	Valor de DL_{50} cercano al cisplatino (línea celular L1210)	[60]
$\text{mer, cis-}[\text{RhCl}_3(\text{Me}_2\text{SO})_2(\text{NH}_3)]$	Valores de inhibición menores que el cisplatino en líneas A2780	[61]
$[\text{Rh}(\text{tpy})_2(\text{Him})]\text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Valores de inhibición menores que el cisplatino en líneas HCV29T	[62]
$\text{Cu}(\text{NBAB})_2(\text{NO}_3)_2$	Menos de la mitad de dosis de inhibición que el gas mostaza	[63]
$\text{Cd}(\text{HL}^1)\text{Cl}_2$	Dosis de inhibición $\frac{1}{43}$ de la del cisplatino en líneas celulares Pam-ras	[64]
$\text{Zn}(\text{HL}^2)\text{Cl}_2$	Dosis de inhibición $\frac{1}{3}$ de la del cisplatino en líneas celulares Pam-ras	[64]
Cp_2MX_2	Actividad antitumoral observada en las líneas P388, L1210, etc.	[65]

Cuadro 1.3: Estructuras y citotoxicidades de diferentes complejos

complejo metálico.

1.2. Casiopeínas

La familia de las Casiopeínas[®] son unos complejos de cobre con fórmula general $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{ON})]\text{NO}$ y $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{OO})]\text{NO}$, figura (1.27) [67, 68].

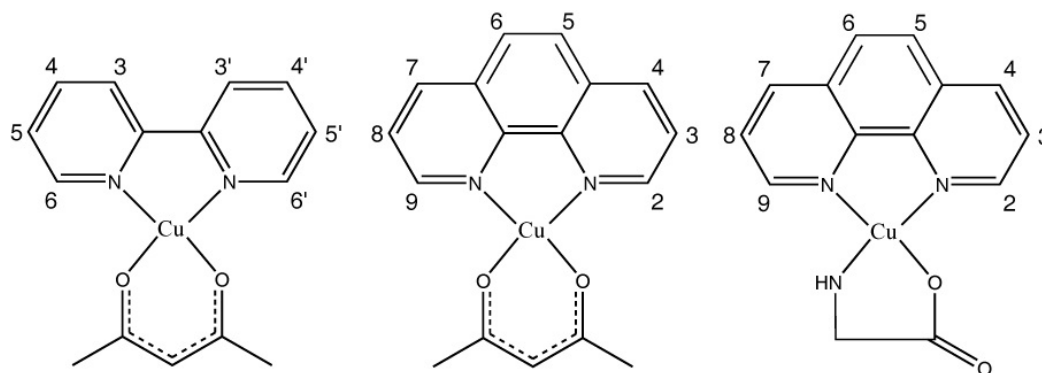


Figura 1.27: Estructura general de las casiopeínas.

Los compuestos han demostrado la inhibición de crecimiento celular *in vitro* e *in vivo* en líneas celulares humanas. Algunos compuestos de esta familia han mostrado hasta un 50 % de inhibición al crecimiento celular en células epiteliales del cervix humano (HeLa), en células del colon (CaLo) así como en células de leucemia murina (L1210) con dosis de 10 a 100 veces más bajas que utilizando cisplatino. Se ha encontrado la inducción de apoptosis en células de leucemia murina (L1210) y en carcinoma ovárico (CH1). Similar a la adriamicina, las Casiopeínas[®] II-gly (CasIIgly) y III-i-a (CasIII-ia) mostraron un potente efecto de inhibición en las funciones mitocondriales en experimentos con mitocondrias aisladas y con células completas del hepatoma AS-30D [67, 69].

En el sistema SMART de ensayos con *Drosophila*, Casiopeínas[®] I y II generaron mutaciones puntuales. Se encontró una correlación entre la respuesta y las dosis de los fármacos [69].

Se han realizado modelos relacionando la estructura con la actividad biológica (QSAR) para un mejor entendimiento del mecanismo de acción de los complejos de cobre. Bravo-Gómez y colaboradores (2009) realizaron el estudio de la influencia de los sustituyentes en el ligante aromático y diferentes

Bipiridinas				
No.	X	Ligante secundario	Familia	
1	H	Acac	Familia 1	
2	4,4'-diMe	Acac		
Fenantrolinas				
3	H	Acac	Familia 2	
4	4-Me	Acac		
5	5-Me	Acac		
6	4,7-diMe	Acac		
7	5,6-diMe	Acac		
8	3,4,7,8-tetraMe	Acac		
9	5-fenil	Acac		
10	4,7-difenil	Acac		
11	5-Cl	Acac		
12	5-NO ₂	Acac		
13	H	Gli		Familia 3
14	4-Me	Gli		
15	5-Me	Gli		
16	4,7-diMe	Gli		
17	5,6-diMe	Gli		
18	3,4,7,8-tetraMe	Gli		
19	4,7-difenil	Gli		
20	5-Cl	Gli		
21	5-NO ₂	Gli		

Cuadro 1.4: Substituyentes para los 21 complejos.

propiedades fisicoquímicas como el potencial de media onda ($E_{1/2}$) y su relación en la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) en diferentes líneas tumorales humanas. Incluyeron también el estudio del cambio de ligante acetilacetato por glicinato. Observaron que los complejos que presentan mayor actividad biológica son aquellos que son menos oxidantes. El cambio del ligante secundario tiene una menor influencia con respecto a los sustituyentes presentes en el ligante aromático [70]. Un estudio similar para estudiar cuantitativamente la relación estructura-actividad fue realizado por Cortés-Guzmán y Galindo-

Murillo (trabajo de tesis de Maestría) utilizando las propiedades obtenidas a partir de la densidad electrónica $\rho(r)$ como descriptores electrónicos de cada enlace de los compuestos de la tabla 1.4 a partir de la función de onda de cada molécula y comparándolos con los valores de concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) en la línea tumoral humana HeLa. Los enlaces que más tienen directa relación con la actividad biológica son los cuatro enlaces de coordinación que se encuentran entre ambos ligantes y el cobre seguidos por el ligante aromático con sus diferentes sustituyentes. El cambio del ligante secundario, acetilacetato por glicinato produce una mínima influencia sobre la actividad biológica.

Existen estudios de hematotoxicidad y citotoxicidad realizados en ratas en donde se observa una considerable disminución de la concentración de hemoglobina, disminución de glóbulos rojos y del volumen total celular en sangre, acompañado por leucocitosis a las 12 horas de la administración del compuesto 16. En este trabajo atribuyen la generación de radicales libres causando daño oxidativo a la membrana, así como la reducción del Cu(II) y la posible pérdida de ligantes del metal y disociación del complejo [69]. En un estudio similar *in-vitro* con el mismo complejo, utilizan las líneas celulares L1210 y CH1 para realizar el estudio de la inducción de apoptosis debida a este compuesto. Ambas líneas se han reportado como resistentes al tratamiento con el cis-platino (ver comentarios del cis-platino en la sección 1.1.6). Exposición a las células a diferentes concentraciones de la casiopeína 16 indica que el complejo mata a las células por apoptosis y necrosis. Se observó la fragmentación nuclear y la condensación de cromatina después de la exposición. El inhibidor de caspasas Z-Val-Ala-DL-Asp-Fluorometilcetona (Z-VAD-FMK) inhibe casi por completo la apoptosis inducida por cisplatino; sin embargo, la apoptosis inducida por la casiopeína solo se inhibe en un 50-70%. La fragmentación de ácidos nucleicos se observó en la línea L1210 pero no en la CH1 [67]. Serment-Guerrero estudio la genotoxicidad de las casiopeínas utilizando ácidos nucleicos. Los resultados indicaron que las casiopeínas producen fragmentación de ADN y oxidación de las bases nitrogenadas debidas posiblemente a la generación de especies reactivas de oxígeno seguidas del cambio de oxidación del cobre [71]. La observación de la reducción del cobre ha sido estudiada por Alemón-Medina y colaboradores (2008) encontrando que la casiopeína 16 no induce daño oxidativo en el estudio *in-vitro* utilizando la línea tumoral humana HeLa. Observaron que solamente el 0.9% de la población total celular muestra daño celular debido a estrés oxidativo. El compuesto

muestra toxicidad pues las células tratadas con $10 - 80\mu\text{g/mL}$ proliferaron solo al 30 % de lo normal, y al 15 % cuando fueron tratadas con casiopeína reducida. La citotoxicidad es disminuida en la presencia de dimetil-sulfóxido. Cuando se disminuye la cantidad de glutathion reducido (GHS) por millón de células despues del tratamiento con $80\mu\text{g/mL}$ de compuesto de cobre se observó la disminución del antioxidante. Estos resultados en conjunto sugieren que la citotoxicidad de la casiopeína pueden estar relacionados con daño oxidativo [72].

El grupo de investigación de Chikira realizó estudios de Resonancia Paramagnética Electrónica utilizando complejos terciarios de cobre similares a las casiopeínas ($[\text{Cu}(\text{Gly})_2]$, $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$, $[\text{Cu}(\text{Thr})_2]$ y $[\text{Cu}(\text{Lys})_2]$) y fibras de ADN. Observó diferentes modos de unión con respecto a las bases nitrogenadas del ADN corroborando una interacción directa de los complejos de cobre con las cadenas de ácidos nucleicos [73].

Evidencias experimentales de la actividad nucleasa se ha observado tambien por el grupo de Chikira. En otro estudio, sintetizó diferentes compuestos con cobre y realizó estudios de electroforesis utilizando el plásmido pBR322 en gel de agarosa en presencia de los diferentes compuestos de cobre y con H_2O_2 . Se observó la formación de diferentes fragmentos en los carriles en donde el plásmido esta en contacto con los compuestos de cobre como se muestra en la figura 1.28, principalmente con el compuesto $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$. Estudios similares se han realizado en esta década para tratar de entender el mecanismo de interacción entre los compuestos de coordinación de cobre y cadenas de ADN. [73, 75, 74, 76]



Figura 1.28: Unión del ADN pBR 322 por diferentes complejos de cobre en presencia de H_2O_2 con diferentes tiempos de incubación: (a) 15 minutos, (b) 30 minutos a $37\text{ }^\circ\text{C}$. En el carril 1, ADN sin tratar; carril 2 sin complejo; carril 3 sin H_2O_2 ; carril 4 con $CuCl_2$; carril 5 con $[Cu(phen)_2]$; carril 6 con el complejo 1; carril 7 con el complejo 5; carril 8 con el complejo 2; carril 9 con el complejo 3 y carril 10 con el complejo 4. Obtenido de [74]

1.3. Interacciones débiles

Las interacciones en las que está involucrado el ADN se pueden clasificar en cinco tipos:

- Una gran diferencia en **electronegatividad** entre dos átomos resulta en una separación permanente de carga, o dipolo en una molécula o un ión. Dos o más moléculas o iones con dipolos permanentes pueden unirse por medio de interacciones dipolo-dipolo. Los electrones de enlace en una molécula o ion se van a encontrar, en promedio, mas cerca al átomo electronegativo causando una carga parcial en cada átomo y generando fuerzas electrostáticas.
- Un **punto de hidrógeno** o **enlace de hidrógeno** es un ejemplo de un dipolo permanente. La gran diferencia de electronegatividades entre el hidrógeno y, por ejemplo, el nitrógeno o el oxígeno, sumando los pares de electrones sin compartir de cada uno resultan en moléculas con una gran fuerza electrostática.
- Las **fuerzas de dispersión de London** surgen por dipolos instantáneos en átomos vecinos. Como la carga negativa del electrón no es uniforme alrededor del átomo, siempre hay una desigualdad de carga presente. Esta carga va a inducir un dipolo en una molécula cercana, creando una atracción, entonces el electrón se mueve a otra posición de la nube electrónica y la atracción se rompe.
- Una interacción **catión- π** surge entre un sistema rico en electrones de tipo π (benceno, etileno) con un catión adyacente (Na^+ , Li^+ , etc).
- Una interacción **C-H $\cdots\pi$** es una interacción que ocurre entre un ácido suave y una base suave, principalmente originada por fuerzas de dispersión, transferencia de carga y fuerzas electrostáticas.

1.4. Estudios teóricos

Los modelos teóricos empleados en la química computacional para estudiar la estructura y reactividad de las moléculas, se distinguen por ser *modelos cuánticos*, basados en mecánica cuántica (QM) y *modelos clásicos* derivados de mecánica clásica (MM).

- En la *química cuántica*, toda la información que podemos estudiar de átomos y moléculas está contenida en la función de onda (Ψ). Se relaciona con la energía (E) a través de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:

$$\hat{H}\Psi_{(r)} = E\Psi_{(r)} \quad (1.1)$$

Donde el operador hamiltoniano (\hat{H}) incluye la energía cinética y potencial de núcleos y electrones. Para resolver esta ecuación, es necesario introducir diversas aproximaciones (Born-Oppenheimer, combinación lineal de orbitales atómicos, etc). No es necesaria ninguna parametrización “empírica” externa, por lo que también se conoce como métodos *ab initio*.

- Los *métodos semiempíricos*, en los que sí hay una parametrización empírica para la descripción de los electrones internos (*core*) mientras que los electrones externos se caracterizan mediante sus funciones de onda cuánticas.
- Los *métodos de mecánica molecular* consideran la molécula como un conjunto de esferas (átomos) conectados mediante resortes (enlaces), cuyo movimiento se puede describir por las leyes de la física clásica a través de funciones de energía potencial. La simplificación más importante de estas funciones de energía potencial es que sólo se consideran los núcleos de los átomos y los electrones no se consideran. El tratamiento de átomos y enlaces se definen en los campos de fuerza o *force field*, en donde se incluyen los parámetros y ecuaciones que los describen.

Actualmente, existen modelos mixtos (QM/MM) que tratan el sistema parcialmente con métodos cuánticos y con métodos clásicos.

Aunque los modelos cuánticos son más precisos, su elevado costo computacional los restringe a moléculas con un número de átomos del orden de decenas, resultando inviable el tratamiento cuántico total de macromoléculas. Sin embargo, es necesario el uso de los métodos cuánticos cuando se habla del estudio de reacciones que impliquen la ruptura y formación de enlaces. En el caso del estudio de macromoléculas, donde además de un gran número de átomos presentes en los sistemas, es necesario el modelado del solvente, la mecánica molecular presenta una eficiente manera de realizar investigación, a pesar de ser limitada o restringirse en gran parte a análisis conformacional.

1.4.1. Mecánica Molecular

Como ya se mencionó, la mecánica molecular considera a las moléculas como un conjunto de átomos conectados por medio de resortes. Todos los parámetros están presentes en el campo de fuerza que es fundamental para una correcta representación del sistema en estudio. El campo de fuerza define los parámetros usados en la descripción de los átomos y enlaces, así como el tratamiento matemático que los relacione. En primer lugar se asigna a cada átomo (esfera) un tipo (*atom type*) en función de su hibridación, carga, polarización y átomos a los que está unido. A cada uno de los tipos atómicos les corresponde un grupo de parámetros: constantes de fuerza, datos atómicos (radio atómico, carga, masa) y valores estructurales de equilibrio. Estos parámetros se obtienen a partir de valores experimentales o se derivan de cálculos *ab initio*. Finalmente, la suma de todos los términos resulta en la energía potencial del sistema en estudio. Es importante mencionar que existen diferentes términos que se consideran para generar la energía potencial y difiere dependiendo de la metodología que se utilice. De manera general, se incluyen los siguientes términos:

- *Interacciones enlazantes*: intervienen átomos unidos por enlaces químicos. Se trata de los términos de estiramiento de enlace, doblamiento de ángulos, ángulos dihedros y ángulos impropios (en sistemas planares de cuatro átomos, en los que uno de ellos en posición central está unido al resto). Se incluyen también los términos de interacciones cruzadas que

reflejan el acoplamiento entre las coordenadas internas, acoplamientos ángulo-enlace, ángulo-ángulo y enlace-enlace.

- *Interacciones no-enlazantes*: intervienen los átomos no unidos de manera directa por enlaces. Comprenden los términos electrostáticos y las interacciones de van der Waals. La interacción electrostática se calcula según la Ley de Coulomb, a partir de las cargas parciales asignadas a cada átomo, en las que se aproxima el efecto de la distribución electrónica. Existen diversos métodos de cálculo de cargas parciales: desde una aproximación topológica basada en los átomos y en cómo están unidos, hasta el método de RESP (*Restrained electroStatic Potential*) que ajusta a cada uno de los átomos la distribución del potencial electrostático molecular, calculado con métodos *ab initio* a un nivel de teoría de HF/6-31G*. Las interacciones de van der Waals vienen dadas por el potencial electrostático de Lennard-Jones 12-6 (ver la ecuación 1.2).

Existe una gran variedad de metodologías para realizar simulaciones empleando la mecánica molecular, así como una gran variedad de campos de fuerza. Es importante no confundir entre la metodología y el campo de fuerza, pues los *force fields*, siendo solo un conjunto de parámetros y descriptores, se pueden utilizar en diferentes metodologías. Los campos de fuerza se podrían dividir en aquellos que describen moléculas orgánicas pequeñas y medianas (MM2 [77], MM3 [78], MM4 [79], TRIPOS [80], MMFF94 [81], UFF [82] y GAFF [83]) y los utilizados para la simulación de macromoléculas (AMBER [84], CHARMM [85], GROMOS [86], OPLS [87]). En el presente trabajo, se utiliza la metodología para AMBER 10 y 11, así como los campos de fuerza GAFF [83] y FF99SB [88].

$$\begin{aligned}
 V(\mathbf{r}) = & \sum_{\text{enlaces}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 & (1.2) \\
 & + \sum_{\text{diedros}} \left(\frac{V_n}{2} \right) (1 + \cos[n\phi - \delta]) \\
 & + \sum_{\text{nonbij}} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} \right) - \left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \left(\frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right)
 \end{aligned}$$

La ecuación del método de AMBER original también tenía términos de interacción por puente de hidrógeno que se han eliminado en posteriores versiones

implementadas en las versiones 7 y 8 del programa AMBER. En dicho programa, se ha implementado a partir de la versión 7, el *General Amber Force Field* [83], diseñado para ser compatible con los campos de fuerza para moléculas orgánicas típicas en química médica. El GAFF incluye parámetros más descriptivos para interacciones por puentes de hidrógeno, así como descripciones detalladas para los elementos comunes en las moléculas con interés medicinal, como el carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, halógenos y una cantidad limitada de metales de transición y contraiones.

Las simulaciones que se presentan están basadas en el campo de fuerza FF98SB [88], optimizado para proteínas, así como para ácidos nucleicos.

Para disminuir el número de grados de libertad de los sistemas moleculares, se utilizan frecuentemente modelos *united atom*, en los que los hidrógenos no polares se omiten y los parámetros de interacciones no enlazantes de los átomos a los que está unido se consideran implícitamente en los átomos a los que está unido. En el caso de biomoléculas y ácidos nucleicos, esto representa una disminución considerable del tiempo de cómputo.

La Dinámica Molecular [89] (MD) permite estudiar el comportamiento del sistema en función del tiempo al simular la dinámica mediante la integración de las ecuaciones de Newton para cada átomo. Es un método determinista ya que el estado del sistema en un tiempo posterior se puede predecir invariablemente a partir de su estado actual. Al conjunto de estados accesibles a una molécula se le denomina espacio de fase (*phase space*). Se trata de un espacio $6N$ -dimensional, ya que el estado de un sistema de N átomos queda definido al especificar las $3N$ coordenadas atómicas y los $3N$ momentos.

Para una simulación de dinámica molecular clásica, se le asigna al sistema cierto tiempo t y las posiciones \mathbf{r}_A y velocidades $\partial r_A / \partial t = \dot{r}_A$ para los átomos $A = 1, 2, \dots, N$. La trayectoria, secuencia de estados resultantes de la dinámica molecular, se obtiene resolviendo la ecuación 1.4 de la segunda Ley de Newton:

$$\mathbf{F}_A = m_A \frac{d^2 \mathbf{r}_A}{dt^2} \quad (1.3)$$

$$= m_A \mathbf{a}_A \quad (1.4)$$

donde m_A es la masa de la partícula, \mathbf{r}_A es la coordenada y \mathbf{F}_A es la fuerza aplicada sobre la partícula en esta dirección. Las expresiones anterior-

res son ecuaciones diferenciales de segundo orden que se pueden escribir de manera equivalente como dos ecuaciones diferenciales de primer orden para la posición de la partícula \mathbf{r}_A y para la velocidad \mathbf{v}_A :

$$\mathbf{F}_A = m_A \frac{d\mathbf{v}_A}{dt} \quad (1.5)$$

$$\mathbf{v}_A = \frac{d\mathbf{r}_A}{dt} \quad (1.6)$$

La metodología empleada por la familia de programas AMBER para realizar la integración numérica de estas dos ecuaciones en un intervalo de tiempo Δt pequeño se basa considerando una expansión de Taylor para $\mathbf{v}(t)$:

$$\mathbf{v}_A \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) = \mathbf{v}_A(t) + \left(\frac{d\mathbf{v}_A}{dt} \right)_t \frac{\Delta t}{2} + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2\mathbf{v}_A}{dt^2} \right)_t \left(\frac{\Delta t}{2} \right)^2 + \dots \quad (1.7)$$

$$\mathbf{v}_A \left(t - \frac{\Delta t}{2} \right) = \mathbf{v}_A(t) - \left(\frac{d\mathbf{v}_A}{dt} \right)_t \frac{\Delta t}{2} + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2\mathbf{v}_A}{dt^2} \right)_t \left(\frac{\Delta t}{2} \right)^2 + \dots$$

Realizando la resta y acomodando los términos, se obtiene:

$$\mathbf{v}_A \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) = \mathbf{v}_A \left(t - \frac{\Delta t}{2} \right) + \mathbf{a}_A(t)\Delta t + \dots \quad (1.8)$$

La aceleración \mathbf{a} se obtiene del término de fuerza. Utilizando el mismo procedimiento para la expansión de Taylor para \mathbf{r}_A en el mismo punto de $t + \Delta t/2$, tenemos:

$$\mathbf{r}_A(t + \Delta t) = \mathbf{r}_A(t) + \mathbf{v}_A \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) \Delta t + \dots \quad (1.9)$$

Las ecuaciones 1.8 y 1.9 forman el *algoritmo de leapfrog*, el cual es una de las técnicas más exactas y estables para realizar Dinámica Molecular. El intervalo de tiempo para las simulaciones está en el orden de los femtosegundos (10^{-15}). En el caso del algoritmo *leapfrog*, las velocidades se calculan

por primera vez a un tiempo de $t + \Delta t/2$. Estas velocidades se utilizan para calcular las posiciones de las partículas a un tiempo $t + \Delta t$ y así sucesivamente. De esta manera, las velocidades se enciman sobre las posiciones y las posiciones se enciman sobre las velocidades. Una de sus desventajas es que las velocidades y posiciones no están sincronizadas, por lo que no es posible calcular la energía cinética (velocidades) al mismo tiempo que la energía potencial (coordenadas), aunque se mantiene la conservación de la energía incluso a intervalos de tiempo mayores.

Existen otros algoritmos de integración como el *Verlet velocity* [90], que obtiene todas las magnitudes sincronizadas aunque con mayor costo computacional. El *predictor-corrector* de Gear y métodos de Runge-Kutta [91], calculan las velocidades y coordenadas con mayor precisión pues utiliza una serie de Taylor a mayor orden, pero obviamente, requiere mayor poder de cómputo.

Molecular Mechanics-Poisson Boltzman Surface Area (MM-PBSA)

El método de MM-PBSA fue desarrollado por Srinivassan y Kollan en 1998 [92] y se utiliza para el cálculo de la energía libre de unión entre un ligante-proteína, una unión proteína-proteína o complejos con ácidos nucleicos. La unión del método MM-PBSA con dinámica molecular y métodos de solvatación implícitos se realizó por primera vez en el año 2000 y ha sido utilizado satisfactoriamente para una variedad de complejos de proteínas y ácidos nucleicos [93].

La energía libre de unión no se calcula directamente, sino siguiendo un camino termodinámico para incluir la aportación de la solvatación, donde R es el receptor, L el ligante y RL es el complejo ligante-receptor. Utilizando las trayectorias de la figura 1.29, la energía libre de enlace se puede expresar como:

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{bind}^0 + \Delta G_{RL}^{0 \rightarrow sol} - G_R^{0 \rightarrow sol} - \Delta G_L^{0 \rightarrow sol} \quad (1.10)$$

Donde ΔG_{bind}^0 describe la energía libre de unión *in vacuo* y $\Delta G^{0 \rightarrow sol}$ describe la energía libre de solvatación del receptor, el ligante y el complejo.

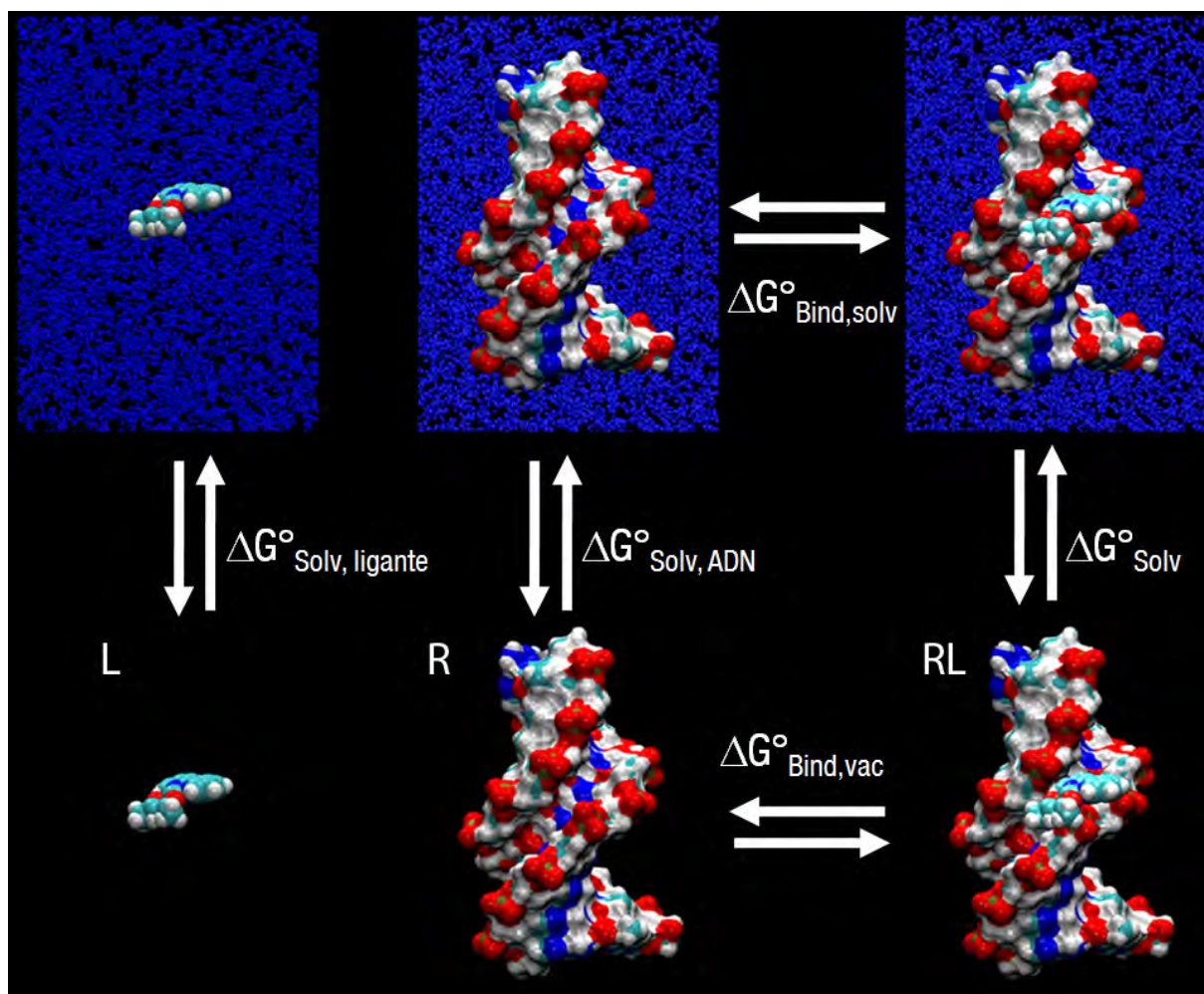


Figura 1.29: Diagrama de cálculo energético para el sistema cas01-ADN

1.4.2. Simulaciones de la interacción molécula-ADN

La metodología mas empleada para la simulación de cadenas de ácidos nucleicos siguen siendo los métodos de mecánica molecular, ya que permiten el estudio de sistemas con un gran número de átomos, logrando una simulación mas cercana a los sistemas vivos. Una de las primeras simulaciones en solución que se realizaron, mostraron que despues de varios nanosegundos, se reproducía adecuadamente la forma de B-ADN, en lugar de la forma intermedia de A-ADN [94, 95, 96]. Esto se extendió con la segunda generación del campo de fuerza de Cornell *et al.* [84] en simulaciones mayores a 5 ns y con contraiones distribuidos eficientemente, utilizando el método Particle Mesh Ewald (PME) [97]. Estas nuevas simulaciones sugirieron que el campo de fuerza reproducía el ADN tipo B de manera muy eficiente. El hecho de que la simulación se asemeje más a la forma canónica del B-ADN que los estudios de cristalografía de rayos-X no hace menos eficiente la simulación, mas bien se puede concluir que la estructura cristalina se ve influenciada por efectos de empaquetamiento. Es más apropiado comparar estructuras elucidadas por espectroscopía NMR en solución como por ejemplo, los trabajos realizados por el grupo de Lane [98]. Parámetros relacionados con la formación de la doble hélice, como el desenrollamiento del ADN, los ángulos χ y los dobleces de la doble hélice se refinaron en la última versión del campo de fuerza de Cornell [99].

1.4.3. Métodos cuánticos

La Teoría de Funcionales de la Densidad es en la actualidad una de las herramientas más utilizadas dentro de la Química Computacional. Existe una gran variedad de funcionales que presentan ventajas y desventajas, así como diferentes necesidades computacionales. Practicamente todos los funcionales están parametrizados y ajustados a detalle fino utilizando bases de datos experimentales. Estas bases de datos incluyen, por ejemplo, parámetros de:

- Energías de atomización
- Potenciales de ionización
- Afinidades electrónicas

- Energías de isomerización
- Termoquímica de hidrocarburos
- Substitución nucleofílica
- Enlaces débiles
- Apilamiento $\pi - \pi$
- Energías de enlaces de coordinación
- Frecuencias vibracionales
- Distancias de enlace, etc

Una familia de funcionales de reciente creación y que ha demostrado dar muy buenas aproximaciones son los creados por el grupo de investigación de Donald Truhlar [100]. Estos funcionales son de tipo meta-GGAs y meta-GGAs híbridos y han sido validados con datos experimentales dando resultados muy buenos en una amplia gama de problemas químicos. Se conocen como M05 (Minnesota 2005) y M06 (Minnesota 2006). El funcional M06-L es un funcional localizado con algoritmos muy optimizados para reducir el tiempo de cómputo en sistemas muy grandes. EM06 es un funcional híbrido con buenos resultados para química general. Ambos funcionales, M06 y M06-L también dan resultados adecuados para química con metales de transición. Los funcionales M05-2X y M06-2X tienen un mejor desempeño para termoquímica, barreras energéticas, estados de transición e interacciones no covalentes a comparación de M06-L y M06 pero no es el adecuado para metales de transición. El funcional M06-HF está diseñado para tener el intercambio electrónico que provee Hartree-Fock, el cual es importante para transferencia electrónica y espectroscopía, sin embargo, es el menos preciso a comparación con M06 y M06-2X para aplicación general y química general.

En la figura 1.30 se prueban 12 funcionales muy conocidos utilizando tres bases de datos: TC177, DBH76 y NCIE53. La primera consiste en datos experimentales termoquímicos para 177 compuestos, la segunda consiste en 76 barreras energéticas y la tercera está formada por 53 energías de interacción no covalentes. Los funcionales más capaces para termoquímica y barreras energéticas son el M06-2X, M05-2X y el BMK. Los mejores para interacciones no covalentes son el M05-2X y el M06. Un gran número de casos

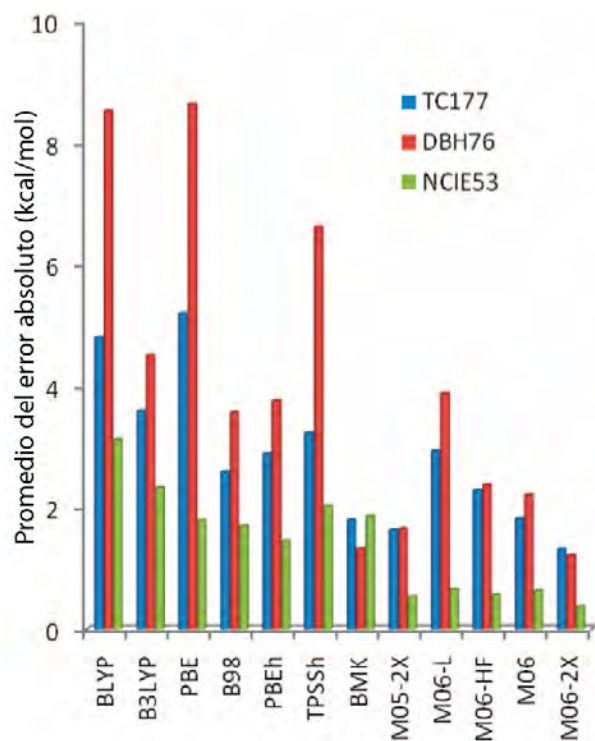


Figura 1.30: Promedio del error para diferentes funcionales en 3 bases de datos [101].

de estudio y ensayos con mayor detalle sobre las ventajas y desventajas de los funcionales de Truhlar se puede consultar en la referencia [100].

1.4.4. Átomos en Moléculas

La teoría de Átomos en moléculas (AEM) fue desarrollada por el profesor Richard Bader en la Universidad de McMaster, Canadá, desde la década de los 70 [102]. Ha sido utilizada ampliamente para encontrar la explicación de muchos problemas químicos. Esta teoría es una extensión de la química cuántica para un átomo en una molécula, donde la densidad electrónica ρ es el medio para describir las propiedades del átomo. Define a un átomo dentro de una molécula en el espacio real, lo que permite extraer información química a la densidad electrónica.

La densidad electrónica se obtiene a partir de la función de onda utilizando la ecuación de Schrödinger, típicamente conocida como $\hat{H}\Psi = E\Psi$ donde \hat{H} representa el operador Hamiltoniano, E la energía y Ψ la función de onda asociada. En un arreglo de núcleos atómicos fijos, la probabilidad de encontrar uno de N electrones en un volumen está dada por:

$$\Psi^*(\mathbf{Q})\Psi(\mathbf{Q})d\mathbf{q}_1d\mathbf{q}_2\cdots d\mathbf{q}_k\cdots d\mathbf{q}_N \quad (1.11)$$

donde \mathbf{q}_k son las cuatro coordenadas que describen al electrón k , las tres coordenadas espaciales, $\tau_k = (x_k, y_k, z_k)$ y la coordenada de spin, σ_k (que puede ser α o β), entonces $\mathbf{q}_k = (x_k, y_k, z_k, \sigma_k)$. Representamos el total de las $4N$ coordenadas con \mathbf{Q} , entonces $\mathbf{Q} = (\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \cdots, \mathbf{q}_N)$. Siguiendo con esta notación, el volumen se puede expresar como $d\tau_k = dx_k dy_k dz_k$. El significado físico de esta expresión de probabilidad es la posibilidad de encontrar una configuración en donde cada electrón se encuentra en una posición y spin determinado. Podemos simplificar esta idea sumando todas las coordenadas de spin e integrando en todos menos un electrón. No importa que electrón se deje fuera de la suma, pues todos los electrones son equivalentes. Por conveniencia, usamos el electrón 1 e integramos sobre todas las coordenadas espaciales del electrón 2, el electrón 3, hasta el electrón N . La probabilidad de encontrar al electrón 1 dentro del volumen $d\tau_1$, está dada por:

$$\sum_{\text{spins}} \left[\int d\tau_2 \int d\tau_3 \cdots \int d\tau_N \Psi^*(\mathbf{Q})\Psi(\mathbf{Q}) \right] d\tau_1 \quad (1.12)$$

donde \sum_{spins} es la suma de ambos spins de todos los electrones.

El total acumulado de la probabilidad de encontrar cualquiera de los N electrones en $d\tau_1$ se obtiene multiplicando la ecuación 1.12 por N . Esta cantidad corresponde al total de la probabilidad de encontrar carga electrónica en $d\tau_1$. El máximo valor que puede tener esta cantidad es N . Para obtener la *densidad* de probabilidad por unidad de volumen y con esto la densidad electrónica ρ :

$$\rho(\mathbf{r}_1) = N \sum_{\text{spins}} \left[\int d\tau_2 \int d\tau_3 \cdots \int d\tau_N \Psi^*(\mathbf{Q})\Psi(\mathbf{Q}) \right] \quad (1.13)$$

que se puede simplificar de la siguiente manera:

$$\rho(\mathbf{r})N \int d\tau' \Psi^*(\mathbf{Q})\Psi(\mathbf{Q}) \quad (1.14)$$

donde $\int d\tau'$ es la integración de todas las coordenadas de spin y las coordenadas espaciales de todos los electrones menos uno. La densidad electrónica presenta propiedades locales e integradas.

Capítulo 2

Planteamiento del problema y objetivos

2.1. Planteamiento del problema

Existen evidencias experimentales de la ruptura de ácidos nucleicos en presencia de Casiopeínas[®]. [74] Se plantea que la acción antitumoral de las casiopeínas se deba a su interacción con el ADN y es posible que la ruptura sea precedida por el intercalamiento del complejo de cobre con el ADN. ¿Es posible determinar las interacciones específicas de las casiopeínas con el ADN?

Para poder responder esta pregunta se realizó el estudio empleando diferentes técnicas de Química Computacional con las siguientes metas y objetivos.

2.2. Objetivos

1. Estudiar como interaccionan las casiopeínas solamente con las bases púricas y pirimídicas en fase gas a partir de datos cristalográficos
2. Encontrar en que combinación de pares de bases de ADN, las casiopeínas forman una geometría mas estable.

60 *CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS*

3. Estudiar los posibles sitios de interacción entre las casiopeínas y un fragmento de ADN utilizando una combinación de Dinámica Molecular y Química Cuántica.
4. Estudiar la naturaleza de las interacciones de las casiopeínas tanto con bases aisladas como con un fragmento de ADN.
5. Contribuir a la comprensión del mecanismo de acción de las casiopeínas.

2.3. Metas

1. Encontrar el método y la base más adecuada para la correcta simulación de los compuestos.
2. Calcular todos los posibles arreglos entre las casiopeínas y las bases de ADN aisladas.
3. Desarrollar un campo de fuerza capaz de describir lo mejor posible el compuesto de coordinación empleado.
4. Evaluar la afinidad de unión del compuesto con cobre con las cadenas de ADN por medio de MM-PBSA.

Capítulo 3

Estudios cuánticos de apilamiento

3.1. Metodología

La casiopeína $[\text{Cu}(4,4\text{-dimetilbipiridina})(\text{acetilacetato})]^{2+}$ se cristalizó con adenina en solución (figura 3.1). La geometría de apilamiento de ese cristal se utilizó para estudiar la energía con las casiopeínas y las 4 bases nitrogenadas.

Las geometrías de los complejos base-nitrogenada:casiopeína:base-nitrogenada se optimizaron con el método m05-2x con la base LANL2dz. [103] La familia de funcionales de Truhlar se ha probado con datos experimentales y ha demostrado el correcto funcionamiento para describir las interacciones de largo alcance. [104, 105] La densidad electrónica se analizó obteniendo la función de onda realizando un *single point* con el nivel de teoría m05-2x/6-311++G(2d,2p) partir de la geometría utilizada. Todos los cálculos se realizaron con el programa Gaussian 09. [106] Las funciones de onda resultantes se utilizaron para calcular las propiedades de la densidad electrónica utilizando el programa AIMALL. [107] Utilizando el programa Gaussview, manualmente se modificaron las moléculas de casiopeína y de adenina. En total se estudió el complejo original A01A (adenina-cas01-adenina), AXA (donde X se substituía por cualquiera de las 21 casiopeínas en estudio) y X01X (donde X podía ser adenina, guanina, citosina o timina).

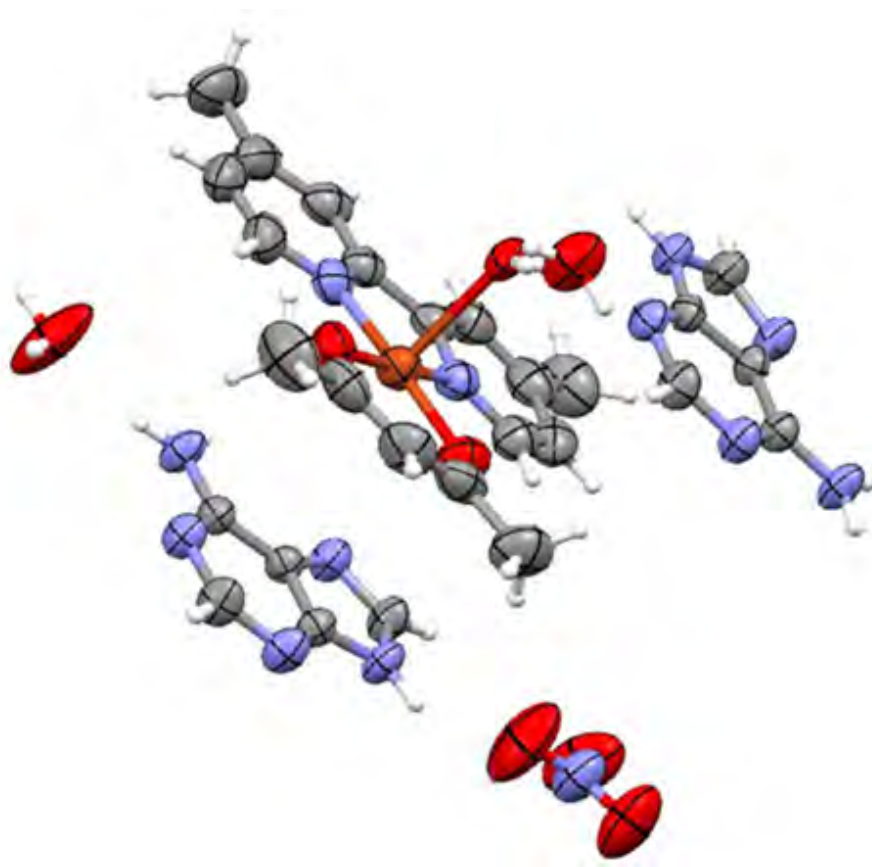


Figura 3.1: Diagrama ORTEP del contenido de la celda unitaria con la casiopeína 03, dos adeninas, dos aguas y un nitrito.

3.2. Resultados y discusión

La familia de 21 Casiopeínas son complejos de coordinación de tipo cuadrado plano, que presentan una distancia de enlace de aproximadamente 1.9515\AA entre el cobre y los ligantes. La distancia mas corta se presenta en el complejo cas01, con distancias Cu-O (1.908\AA) y Cu-N (1.998\AA) respectivamente. La figura 3.2 muestra la gráfica molecular de la cas01 y cas13 donde se observan los dos enlaces entre el Cu^{2+} y los oxígenos del acetilacetonato o los átomos de oxígeno y nitrógeno de la glicina. Los cuatro enlaces están caracterizados por sus puntos críticos de enlace (BCP) respectivos. Los BCP

alrededor del cobre presentan características de donador-aceptor encontradas frecuentemente en enlaces de coordinación metal-ligante: bajo valor de $\rho(r)$ y $\nabla^2\rho(r) > 0$.

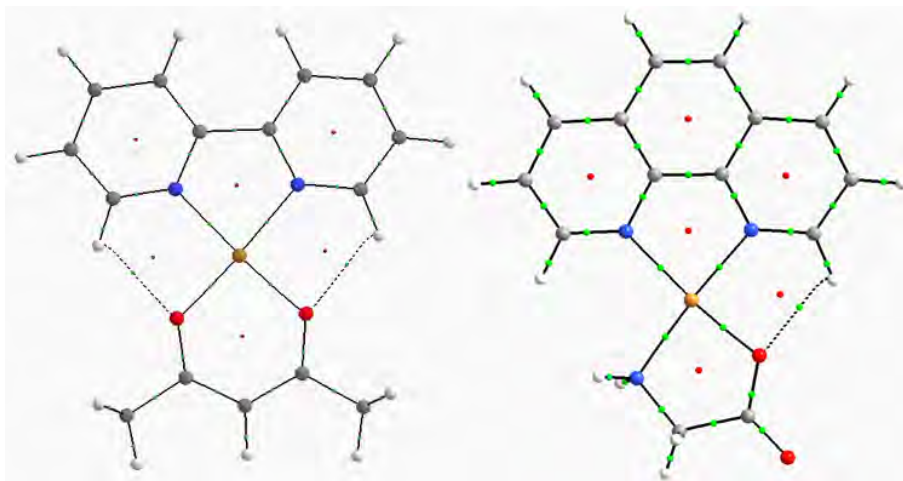


Figura 3.2: Gráfica molecular de la cas01 y la cas13

Las interacciones donador-aceptor también se pueden observar en el laplaciano de la densidad electrónica, $\nabla^2\rho(r)$, de las casiopéinas como se muestra en la figura 3.3. Se pueden observar cuatro concentraciones de carga de los heteroátomos de los ligantes orientadas hacia la disminución de carga ecuatorial del metal, además de las dos disminuciones de carga encontradas en la posición axial que permite la coordinación en forma de pirámide de base cuadrada u octahédrica.

El análisis de las poblaciones electrónicas, (N), en los complejos, se compararon con las moléculas aisladas de acuerdo a la expresión:

$$\Delta N = N(\text{Complejo}) - N(\text{Molécula}) \quad (3.1)$$

Es posible estudiar la donación de carga desde los ligantes hacia el centro metálico. La familia uno y dos presentan una transferencia de carga muy similar, pero el glicinato en la tercera familia dona 8.1% más que el acetilacetato. Además, la presencia del glicinato provoca un pequeño aumento en la donación del ligante aromático como se muestra en la figura 3.4.

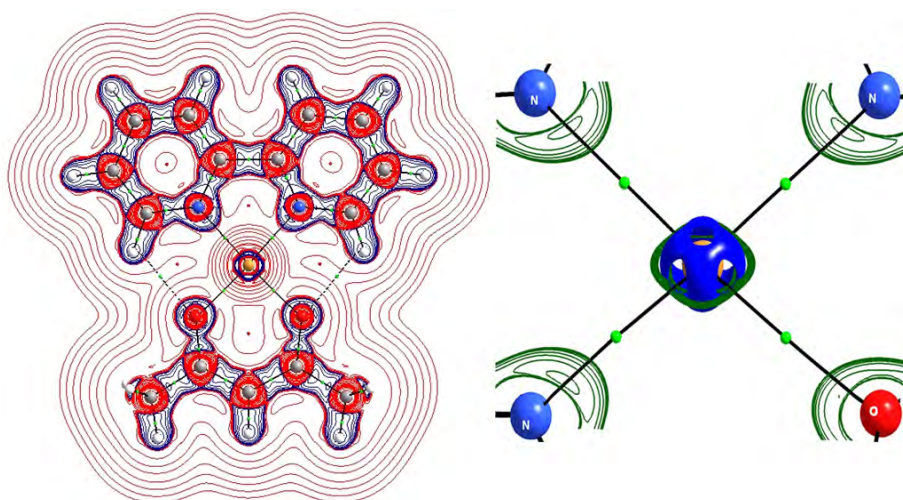


Figura 3.3: Mapa de contorno del $\nabla^2\rho(r)$ para la cas01 (izquierda). Isosuperficie del $\nabla^2\rho(r)$ del complejo cas13, que corresponde a la acumulación de densidad electrónica para los heteroátomos de los ligantes apuntando hacia la disminución de carga del metal (derecha)

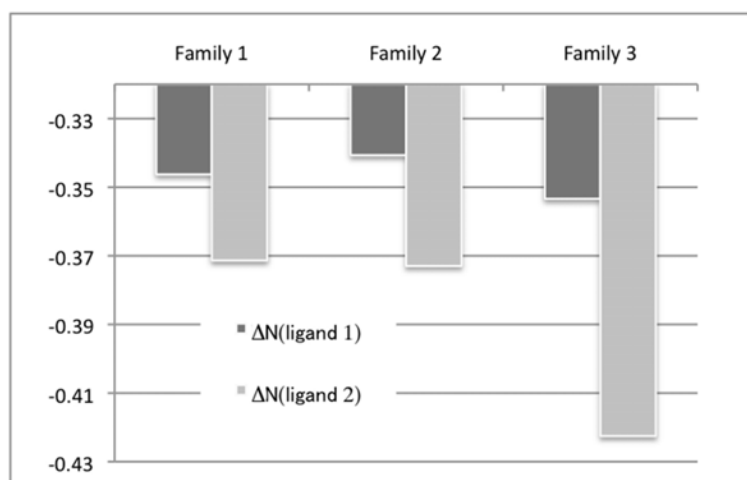


Figura 3.4: Valores promedio de la transferencia de carga de los ligantes al átomo de cobre en las 3 familias de casiopeínas

3.2.1. Complejo A01A

Cada celda unitaria de la estructura cristalina (número CCDC 737505) de la figura 3.1 presenta una adenina (I) frente al ligante aromático y otra adenina (II) junto al acetilacetonato de la cas01, como se muestra en la figura 3.5.

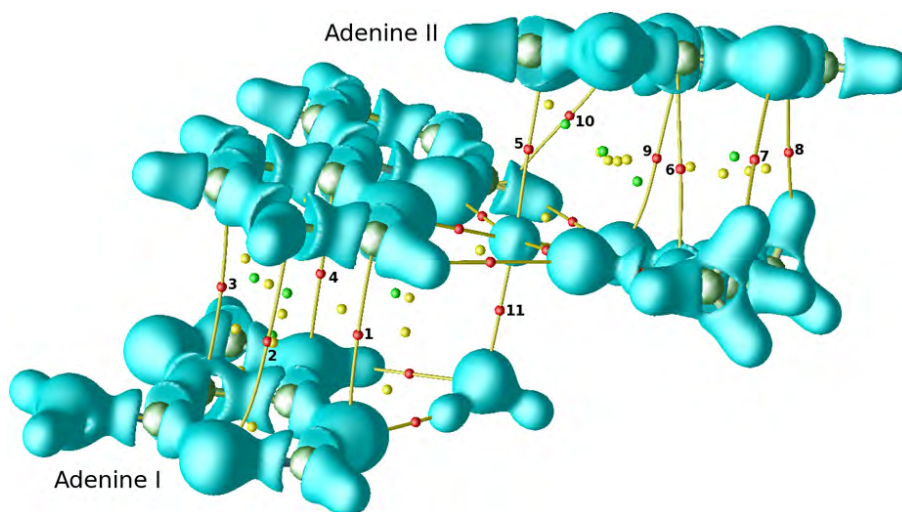


Figura 3.5: Gráfica molecular y superficie del laplaciano para el complejo A01A (m05-2x/6-311g(2d,2p)).

Después de la optimización, el centro metálico muestra una geometría octahédrica, formando enlaces hacia la bipyridina y al acetilacetonato en las posiciones ecuatoriales, y de manera axial, formando enlaces con un oxígeno de una molécula de agua y el N9 de la adenina II. Las distancias y las propiedades de los BCP de las interacciones entre la cas01 y ambas adeninas se muestra en la tabla 3.1.

Las distancias de estas interacciones caen dentro del rango 2.63 y 3.51 Å de acuerdo a lo reportado para distancias similares de apilamiento de tipo $\pi \cdots \pi$. [108] La superficie del laplaciano (figura 3.5) muestra que la interacción de apilamiento entre la adenina I y la bipyridina es de tipo donador-aceptor donde la concentración de carga de la adenina I apunta hacia la deficiencia del ligante aromático, mientras que la adenina II y el acetilacetonato presentan dos enlaces de tipo $N \cdots H-C$ y dos interacciones de tipo donador-

BCP	Átomo de casiopeína	Átomo de Adenina I	Átomo de Adenina II	distancia	$\rho(\mathbf{r})$	$\nabla^2\rho(\mathbf{r})$	$G(\mathbf{r})$	$V(\mathbf{r})$	$H(\mathbf{r})$	$G(\mathbf{r})/\rho(\mathbf{r})$	$H(\mathbf{r})/\rho(\mathbf{r})$
1	C	N		3.19	0.0075	0.0242	0.0050	-0.0039	0.0011	0.6607	0.1433
2	C	N		3.51	0.0048	0.0148	0.0030	-0.0022	0.0007	0.6233	0.1541
3	C	C		3.45	0.0060	0.0166	0.0033	-0.0025	0.0008	0.5591	0.1366
4	C	C		3.19	0.0076	0.0254	0.0052	-0.0041	0.0011	0.6861	0.1481
5	Cu		N	2.88	0.0136	0.0445	0.0105	-0.0100	0.0006	0.7773	0.0424
6	C		C	3.19	0.0069	0.0222	0.0045	-0.0034	0.0011	0.6466	0.4553
7	H		N	2.75	0.0066	0.0201	0.0043	-0.0035	0.0008	0.6431	0.1148
8	H		N	2.63	0.0084	0.0256	0.0055	-0.0045	0.0009	0.6513	0.1119
9	O		C	3.23	0.0067	0.0244	0.0050	-0.0038	0.0011	0.7449	0.1693
10	C17		H	2.93	0.0041	0.0142	0.0028	-0.0020	0.0008	0.6676	0.1801
11	Cu1	O(agua)		2.23	0.0465	0.1996	0.0563	-0.0626	0.0063	1.2110	0.1366

Cuadro 3.1: Distancias y propiedades de los puntos críticos de enlace en las interacciones no covalentes entre la cas01 y dos adeninas.

aceptor. La energía de formación del complejo de cas01 con dos adeninas y agua (A01A) al nivel de teoría m05-2x/6-311g(2d,2p) es de -27.97 kcal/mol². Los ligantes bipyridina y acetilacetato ganan 0.070 d y 0.067 e respectivamente del metal y las adeninas. La adenina I cede 0.076 e a la bipyridina mientras que la adenina II transfiere 0.037 e al acetilacetato. El átomo de cobre pierde 0.035 e mientras que la molécula de agua gana 0.018 e. El mecanismo de apilamiento entre la cas01 y dos adeninas y una molécula de agua se basa en la deficiencia de la densidad electrónica de la cas01 que es compensada por la transferencia electrónica de las adeninas. Adicionalmente, existen 3 configuraciones para la formación del complejo A01A (3.6), dependiendo de la orientación de las moléculas de adenina con el sitio de interacción con la cas01, N3 de la piridina o N7 del imidazol. Como se muestra en la figura 3.6, cuando la adenina II se coordina con el átomo de cobre en el N3, la base prefiere un arreglo perpendicular (A01A_2 y A01A_4) mientras que cuando se coordina con el N7, permite la orientación paralela (A01A y A01A_3). La adenina I permanece paralela sin importar el átomo que forme la unión.

3.2.2. Complejos AXA

A partir de la estructura original del crystal, manualmente se cambiaron las casiopeínas de la 1 a la 21 y se obtuvo una función de onda de acuerdo a la metodología descrita previamente en el capítulo 3.1. Todos los complejos AXA mostraron una tendencia a agruparse de acuerdo a las tres familias de casiopeínas, la energía de formación promedio para cada familia fue de -58.51, -58.67 y -61.97 kcal/mol⁻¹ respectivamente. Los compuestos con glicinato fueron los de menor energía de formación y los compuestos con acetilacetato, con un promedio de 3.34 kcal/mol⁻¹ presentaron la mayor energía de formación. La interacción observada en los compuestos AXA de la familia 1 y 2 es diferente a la observada en la familia 3, donde la adenina II presenta una geometría perpendicular. La estructura más estable para la segunda familia es el compuesto A12A, para la tercera familia es el compuesto A21A, en parte al grupo NO₂ presente en el ligante aromático, incrementando su deficiencia en electrones, misma que se compensa con las moléculas de adenina que forman el “sandwich”.

Para aislar y estudiar las contribuciones de la interacción de apilamiento entre los ligantes y la adenina I de la energía de estabilización entre los sistemas AXA, se optimizaron los compuestos AX (adenina I - casiopeína)

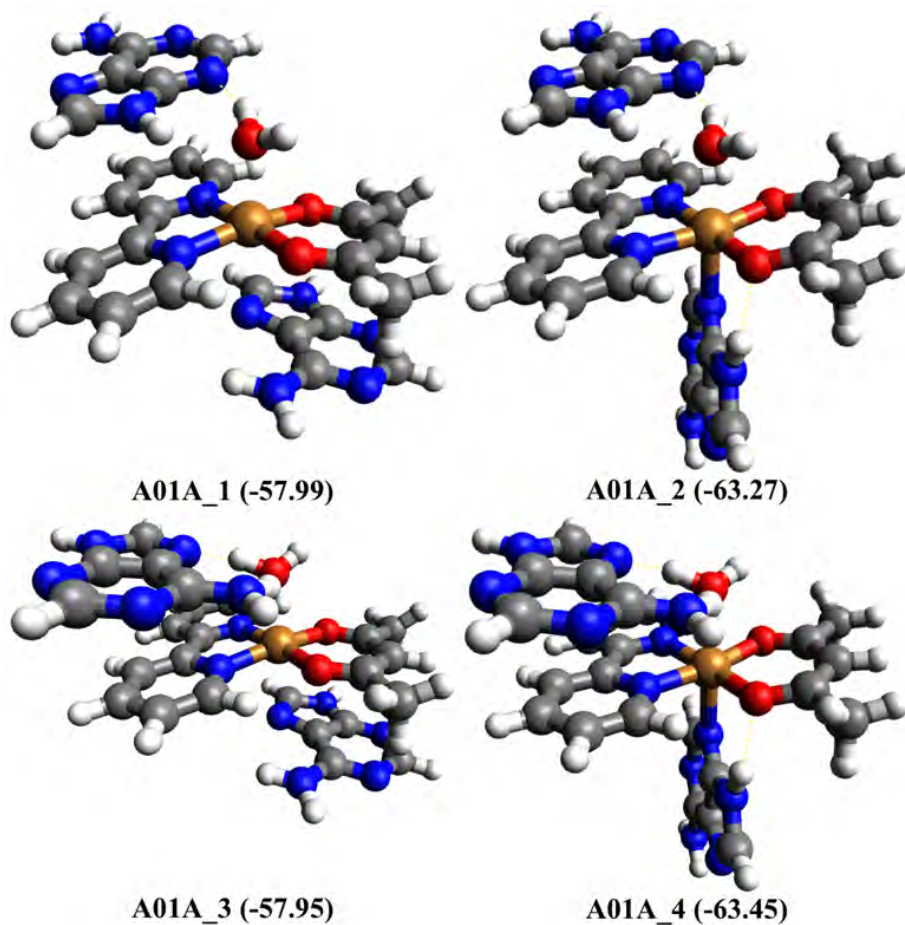


Figura 3.6: Distintas configuraciones del complejo A01A dependientes de la posición de las moléculas de adenina.

y se obtuvieron las poblaciones respectivas de las moléculas aisladas (ΔN). Con estos resultados, encontramos una correlación de $R^2 = 0.92$ entre la energía de estabilización de los compuestos AX y los electrones transferidos de la adenina al ligante aromático de las casiopeína, como se ve en la figura 3.7.

Se puede concluir que mientras mayor es la transferencia de densidad electrónica de la adenina I hacia el ligante aromático, la molécula se vuelve mas estable, de acuerdo a la ecuación:

Complejo	ΔE	ΔN (adenina)
A01	-58.63	-0.0938
A02	-58.38	-0.0932
A03	-58.58	-0.0949
A04	-58.79	-0.0952
A05	-57.88	-0.0939
A06	-59.21	-0.0937
A07	-58.25	-0.0941
A10	-57.43	-0.0879
A11	-58.62	-0.0972
A12	-60.19	-0.1012
A13	-61.99	-0.1062
A14	-60.60	-0.1051
A15	-61.20	-0.1032
A16	-60.09	-0.1030
A17	-61.38	-0.1053
A18	-61.11	-0.1025
A20	-62.18	-0.1089
A21	-63.60	-0.1116

Cuadro 3.2: Valores de energía (kcal/mol) y de población electrónica total para la adenina.

$$\Delta E_{\text{Estabilizacion}} = -254.83\Delta N_{\text{AdeninaI}} - 34.542 \quad (3.2)$$

3.2.3. Complejos X01X

Ambas moléculas de adenina ahora son intercambiadas por las tres bases nitrogenadas presentes en el ADN, timina, guanina y citosina, para formar los compuestos X01X. Existen diferentes arreglos para estos compuestos pero no todos muestran interacciones de apilamiento con la cas01; los compuestos mas estables se muestran en la figura 3.8. El valor promedio de estabilización de los complejos X01X es de $-50.05\text{kcal/mol}^{-1}$, donde el más estable es el complejo G01G_1 que tiene una guanina paralela a la biperidina con dos enlaces débiles hacia la molécula de agua y la segunda guanina está coordinada al átomo

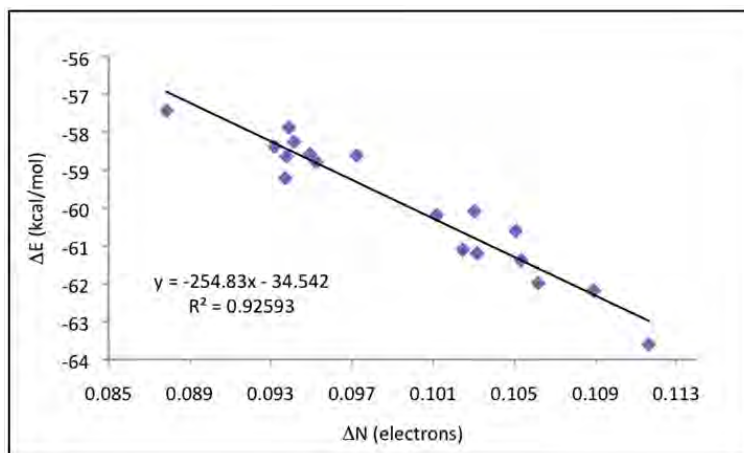


Figura 3.7: Correlación entre la energía de estabilización de los complejos AX y los electrones transferidos de la adenina I al ligante aromático en las casiopéínas (m05-2x/6-311g(2d,2p)).

de Cu por el N7. El compuesto G01G_2 es menos estable por 6.97kcal/mol^{-1} con una guanina paralela en la dirección opuesta con solo un enlace débil hacia la molécula de agua. La diferencia energética entre los compuestos con citosina se debe a la orientación perpendicular de la base y el átomo coordinado con el metal. El complejo mas estable de timina, T01T_1 tambien presenta una configuración paralela/perpendicular alrededor de la cas01 y es 8.23kcal/mol^{-1} menos estable que el complejo T01T_1. Al parecer, la afinidad de las casiopéínas con las bases del ADN dependen de la coordinación axial hacia el cobre además de la interacción de apilamiento.

Tambien se optimizaron y estudiaron las posibles combinaciones entre las cuatro bases y las casiopéínas. La energía de estabilización entre los complejos con configuraciones paralela/paralela y paralela/perpendicular se muestran en la table 3.3.

Ambas bases nitrogenadas en las estructuras T01C, A01T y A01C permanecen en la configuración paralela. En las estructuras C01G, A01G, G01G, T01G, C01A y T01A, la base que esta interactuando con la bipyridina permanece en la orientación paralela y la segunda base, en arreglo perpendicular. El complejo A01C es el mas estable en la orientación paralelo/paralelo y el complejo C01G es el mas estable en el arreglo paralelo/perpendicular. Los

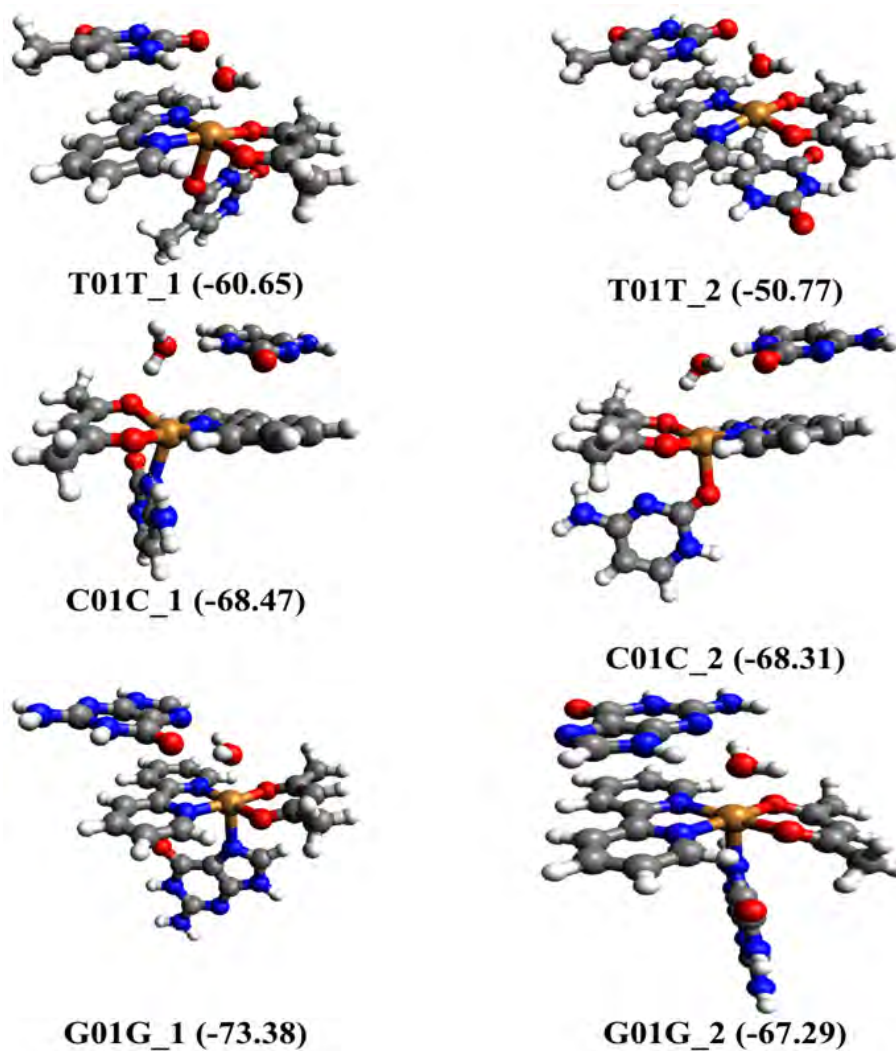


Figura 3.8: Las configuraciones mas estables pertenecen a los complejos T01T, C01C y G01G. (m05-2x/6-311g(2d,2p)).

Energías de formación (kcal/mol) y orientación de los complejos X01X		
Complejo	ΔE	Orientación
T01C	-65.79	paralelo/paralelo
A01T	-54.47	
A01C	-50.26	
C01G	-69.95	paralelo/perpendicular
A01G	-68.62	
G01G	-66.47	
T01G	-65.42	
C01A	-62.77	
T01A	-56.97	

Cuadro 3.3: Resumen de energías de formación y la orientación que adquieren los complejos con optimización de geometría.

compuestos A01G, G01G y T01G están muy cercanos en energía.

3.3. Conclusiones parciales

En el estudio de las propiedades electrónicas de las casiopeínas, se observó una donación de carga electrónica desde los ligantes hacia el centro metálico. Esta deficiencia de densidad electrónica de los ligantes de las casiopeínas se compensa por una transferencia de carga desde las adeninas cuando se forma el complejo de apilamiento tipo $\pi \cdots \pi$. Se encontró una correlación entre la estabilización energética de los compuestos y la cantidad de carga transferida entre la adenina y los ligantes aromáticos. El apilamiento depende de la coordinación axial de la base nitrogenada con el átomo de cobre. La afinidad es mayor en el orden: G>C>A>T.

Capítulo 4

Interacciones ADN-cas01

4.1. Metodología

La interacción de la casiopeína con el B-ADN se ha estudiado utilizando diferentes ensayos experimentales encontrando que el ADN se fragmenta [73], sin embargo, se desconoce el sitio de interacción del complejo de cobre. Para esto se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular utilizando una combinación de pares de bases apropiado. Se usaron cadenas de B-ADN de 10 pares de bases cada una (una vuelta completa) con las secuencias:

d(AAAAAAAAAA)₂
d(ATATATATAT)₂
d(GGGGGGGGGG)₂
d(GCGCGCGCGC)₂

Se realizaron simulaciones de intercalación parcial entre las bases nitrogenadas utilizando dos diferentes orientaciones de la casiopeína, designadas como posición uno (*pos1*) con la bipyridina intercalada, posición dos (*pos2*) con el acetilacetato intercalado, unión al surco mayor (*sm*) y unión al surco menor (*s*), ver figura 4.1. Los datos estructurales y energéticos obtenidos se utilizaron para investigar la unión de la casiopeína I mas favorecida con el ADN. El total de simulaciones a realizar con la metodología de Dinámica Molecular se resume en el cuadro 4.1.

Secuencia	Posiciones			
poly-d(AA) ₂	pos1	pos2	sm	s
poly-d(AT) ₂	pos1	pos2	sm	s
poly-d(GG) ₂	pos1	pos2	sm	s
poly-d(GC) ₂	pos1	pos2	sm	s

Cuadro 4.1: Resumen de simulaciones realizadas.

Los fragmentos iniciales del B-DNA se generaron utilizando el programa nab del paquete de AMBER10 [109] usando el campo de fuerza ff99SB [88]. El largo de la cadena asegura que el fragmento no interaccione con los puntos terminales (10 pares de bases). Las configuraciones iniciales de los complejos se construyeron utilizando el paquete DS Visualizer [110], confinando la casiopeína a los lugares de interacción seleccionados: intercalados, surco menor y surco mayor de cada una de las cadenas construidas, ver la figura 4.1. La carga total de los sistemas se neutralizó con 16 iones Na⁺ utilizando el modelo de Aqvist [111]. Los sistemas se solvataron con ~ 4500 moléculas TIP3P [112] de agua para un total de 12000 \sim 13000 átomos.

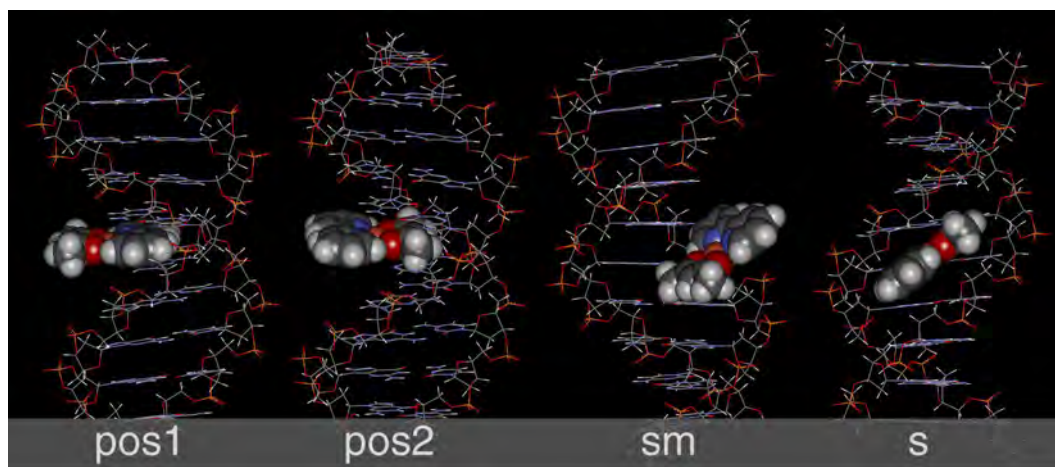


Figura 4.1: Posiciones iniciales: cas01 con la biperidina intercalada, cas01 con el acetilacetato intercalado, cas01 en el surco mayor y cas01 en el surco menor.

4.1.1. Parametrización de la casiopeína

La casiopeína utilizada para todas las simulaciones es el complejo bisquelato $[\text{Cu}(\text{bipiridina})(\text{acetilacetionato})]^+$, cuya estructura se presenta en la figura 4.2. La parametrización del complejo con cobre se realizó utilizando el campo de fuerza generalizado de AMBER (GAFF [83]) para los ligantes. Como método de asignación de cargas parciales, se utilizó el método semiempírico AM1-BCC. En la versión 10 de AMBER, las cargas AM1-BCC se determinan usando el módulo ANTECHAMBER en conexión con MOPAC. Existen variantes para el cálculo de las cargas parciales de pequeñas moléculas orgánicas, sin embargo, el método utilizado se comporta adecuadamente [113]. Para el cobre, se utilizaron los parámetros de $r_{vdW} = 1.0330\text{Å}$ y $\epsilon = 0.0427$ kcal/mol obtenidos de los trabajos de Babu y Lim [114] y revisado extensivamente por Hermann y Heumann [115] Kollman [116]. Las constantes para los términos enlazantes de los ligantes (bipiridina y acetilacetionato) se calcularon utilizando la herramienta *parmcal* incluida en las herramientas de AMBER [117]. Los valores de longitud de enlace, ángulos y ángulos dihedros se obtuvieron directamente de los estudios de cristalografía de Rayos-X (CCDC 737505). Para comprobar la veracidad de la geometría reproducida con los parámetros del campo de fuerza, se realizó una simulación de 3 nanosegundos de la casiopeína. Se tomaron los promedios de los valores de los parámetros estructurales y se compararon con la estructura obtenida por rayos X y la estructura obtenida por métodos *ab initio* a un nivel de teoría m05-2x/6-311++G(d,p), cuadro 4.2. Se puede observar que la estructura simulada con los parámetros generados están cercanos a la estructura experimental. El promedio de las diferencias entre la estructura calculada y la experimental es de 0.01Å en los enlaces del cobre con los ligantes y de 0.23° para los ángulos.

Para todos los sistemas, se utilizaron condiciones periódicas y las interacciones electrostáticas se calcularon con el método de Particle-Mesh Ewald (PME) [97] con un corte de interacción máxima de 12Å . Las simulaciones se realizaron con el ensamble NPT a 300K y 1 atm de presión utilizando el termostato de Nosé-Hoover. Los enlaces con hidrógeno se restringieron utilizando el algoritmo SHAKE [118] y un *time step* de 0.2 fs. Todas las simulaciones se corrieron utilizando un procesador gráfico marca nVidia GTX480 en el Instituto de Química de la UNAM. La optimización geométrica se realizó siguiendo un protocolo de dos pasos:

[Cu(bipiridina)(acac)] ²⁺			
	CAS01(MD)	CAS01(DFT)	CAS01(Rx)
Distancias (Å)			
Cu-N1	2.18	2.02	2.01
Cu-N	2.18	2.02	2.02
Cu-O1	2.08	1.90	1.91
Cu-O	2.10	1.90	1.93
Ángulo (°)			
N-Cu-N1	75.27	80.39	80.73
O-Cu-O1	96.54	94.27	94.38

Cuadro 4.2: Comparación de los parámetros utilizados en el campo de fuerza para el cobre.

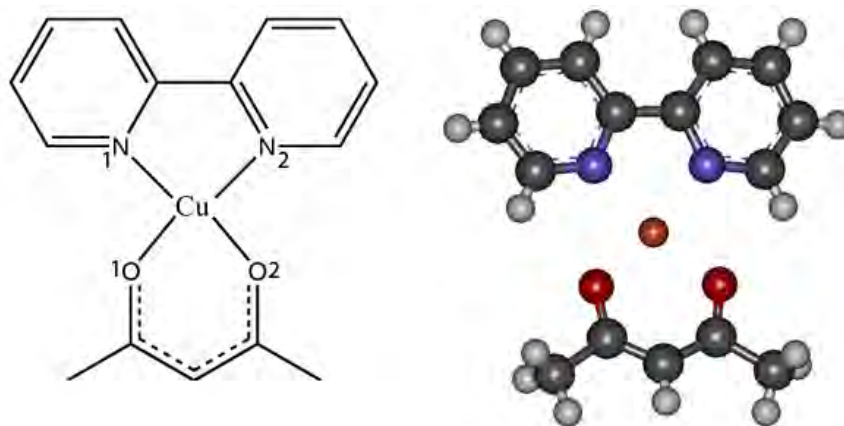


Figura 4.2: Diagrama de la cas01 (izquierda) y estructura de rayos-X (derecha).

- Minimización del sistema durante 10000 ciclos, utilizando 2000 ciclos con el algoritmo de minimización *steepest descent* mas 8000 utilizando el algoritmo de gradientes conjugados. Se utilizó una constante de restricción harmónica de $k = 150 \text{ kcal}/(\text{mol}\text{Å}^2)$ en el soluto.
- 20000 ciclos de gradientes conjugados sin ningún tipo de restricción.

Siguiendo la minimización, el sistema se calentó a 300K en un intervalo de 100ps con un ensamble NVT, utilizando restricción en el soluto con una constante de $k = 50 \text{ kcal}/(\text{mol}\text{Å}^2)$. Después se eliminaron las restricciones y se dejó el sistema estabilizar por 100ps. Antes de pasar a la simulación final de producción, el sistema se dejó equilibrar por un lapso de 200ps con un ensamble NPT. La simulación de producción consistió en 20ns para cada uno de los aductos de ADN/casiopeína, así como las cadenas de ADN sin complejo. Las simulaciones llegaron al equilibrio correctamente como se puede ver en la gráfica 4.3 de los aductos mas relevantes, así como el ADN libre. Datos de temperatura, densidad, presión y valores de RMSd de todas las simulaciones se pueden consultar en el apéndice B.

4.1.2. Propiedades calculadas

Una vez realizada la simulación de los aductos, se realizaron análisis geométricos y energéticos para obtener la estructura mas probable entre la casiopeína y el B-ADN

Análisis estructural

Los parámetros estructurales del B-ADN se calcularon con el programa CURVES+ [119]. Los parámetros analizados se describen a detalle en el apéndice A.1. Se analizó la deformación total de la cadena (*backbone*) del B-ADN partiendo de la estructura promedio de la simulación de 20ns. La estructura promedio para todos los cálculos se obtuvo con la aplicación *ptraj* de AmberTools 1.12. Para las simulaciones con la casiopeína intercalada en la posición 1 o posición 2, se analizaron los parámetros asociados a la posición de los pares de bases directamente involucrados en la intercalación. Para las simulaciones donde la casiopeína interacciona con el surco mayor o el surco menor, se consideraron los cambios geométricos de los surcos.

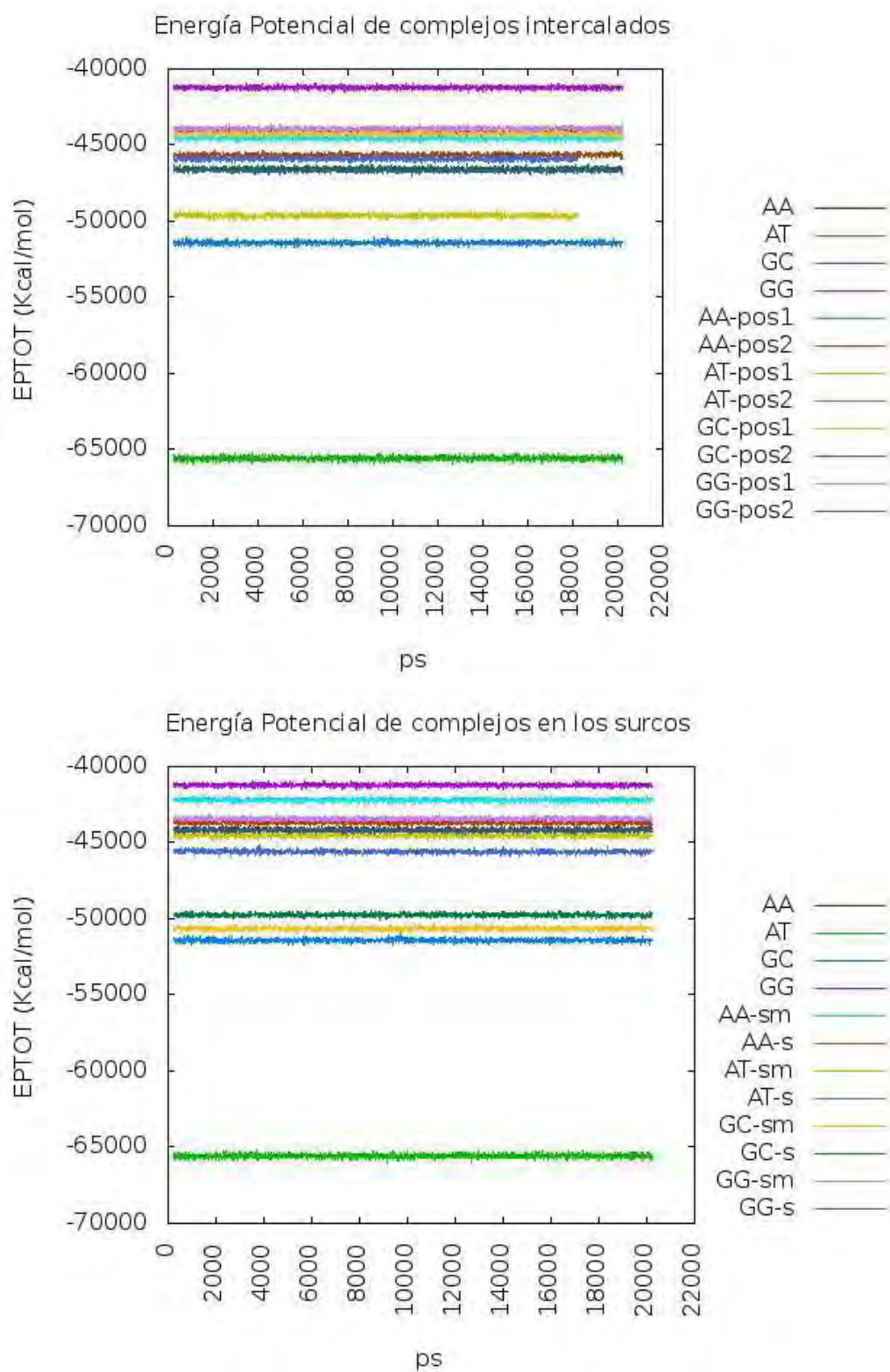


Figura 4.3: Evolución de energía potencial en el tiempo.

Análisis electrostático

Para obtener mas información de la manera de interacción de la casiopeina con las diferentes cadenas de B-ADN, se utilizaron las energías relativas de las interacciones no enlazantes electrostáticas y de van der Waals (ΔE_{el} y ΔE_{vdW}) utilizando los parámetros del campo de fuerza. La contribución de la energía de vdW se calcula por medio de:

$$\Delta\Delta E_{vdW} = \Delta E_{vdW}^{ADN/solv} + \Delta E_{vdW}^{lig/solv} - \Delta E_{vdW}^{ADN/lig} \quad (4.1)$$

donde el primer y segundo término en la parte derecha de la ecuación son los cambios en la energía de interacción de van der Waals entre el ADN y el solvente y entre el ligante y el solvente cuando se forma el aducto. El último término es la energía de interacción vdW entre el ligante y el ADN del aducto. A pesar de que la desviación estándar de la $\Delta\Delta E_{vdW}$ es alta (particularmente debido a grandes fluctuaciones de la energía de solvatación del ADN), se conoce que la tendencia obtenida con este valor puede describir cualitativamente las propiedades energéticas de los aductos que se están estudiando [120].

Análisis MM-PBSA

Para analizar la contribución energética del cambio conformacional debido a la unión de la casiopeína con el B-ADN, se realizaron estudios de la energía libre de la simulación de la cas01+ADN y de los componentes en por separado de acuerdo a la metodología descrita en en la sección 1.4.1. Por medio del módulo de MM-PBSA implementado en AMBERTools 1.4, se calculó el valor de ΔG del complejo utilizando los 200 últimos cuadros de todas las simulaciones de producción.

Análisis de fluctuaciones

Un parámetro mas que indica el grado de deformación de la cadena de ADN y del ligante es el promedio de movimientos durante la trayectoria de simulación. Esta cantidad movimientos o fluctuaciones se obtienen con la palabra clave: *atomicfluct* dentro del programa *ptraj*. Se calcularon las fluctuaciones por átomo y por molécula de la simulación completa (20ns).

4.1.3. Métodos cuánticos

Una vez finalizadas las simulaciones con dinámica molecular, se generaron estructuras promedio de las trayectorias utilizando la herramienta *ptraj*. Basándonos en las simulaciones con mayor estabilidad energética de acuerdo al ensayo de MM-PBSA, se realizaron cortes en el lugar donde la cas01 interactúa con el fragmento. Los cortes realizados fueron: GC-s, GC-pos1, GG-pos2, GG-pos1, AT-s, AT-pos1 y AA-s que corresponden a las estructuras más estables energéticamente de acuerdo al análisis MM-PBSA. A partir de estas estructuras se realizó el cálculo de un solo punto de energía al nivel m05-2x/6-31++G(d,p) para obtener la función de onda correspondiente, con esta se calculó la densidad electrónica; y su análisis se realizó con el paquete AIMALL descrito previamente en la sección 3.1.

El corte GC-s incluye la cas01 coordinada al grupo fosfato del ADN, el agua axial y las desoxirribosas unidas directamente al PO_4 de acuerdo con la figura 4.4. El corte AT-pos1 incluye la cas01 coordinada con una timina y el oxígeno de un fosfato. El corte es difícil de visualizar pues cuenta con una gran cantidad de átomos encimados, por lo que se resalta únicamente la cas01, la timina y el grupo fosfato, ver figura 4.18.

4.2. Resultados y discusión

La hipótesis de una intercalación sugiere que uno de los ligantes presentes en el complejo se intercala entre dos pares de bases y el ligante opuesto sale hacia el surco mayor de la doble cadena. Se realizaron un total de 8 simulaciones con la casiopeína intercalada en la pos1 o pos2, así como de la cadena de B-ADN sin ninguna molécula de casiopeína. Para comprobar que se llegó al equilibrio, se realizó un análisis de RMSd utilizando los átomos P, O3', O5', C3', C4', C5'. Este grupo de átomos pertenecen a los fosfatos y al azúcar, por lo que el análisis solo se realizó en la estructura del B-ADN y se comparó con la simulación de la cadena sin ligante. En las figuras 4.5 y 4.6 podemos ver la evolución temporal del valor de RMSd de las 4 cadenas utilizadas en la simulación en la pos1 y en la pos2.

Todas las simulaciones llegaron a la configuración geométrica más estable una vez transcurridos entre 3 y 4 nanosegundos de la corrida de producción.

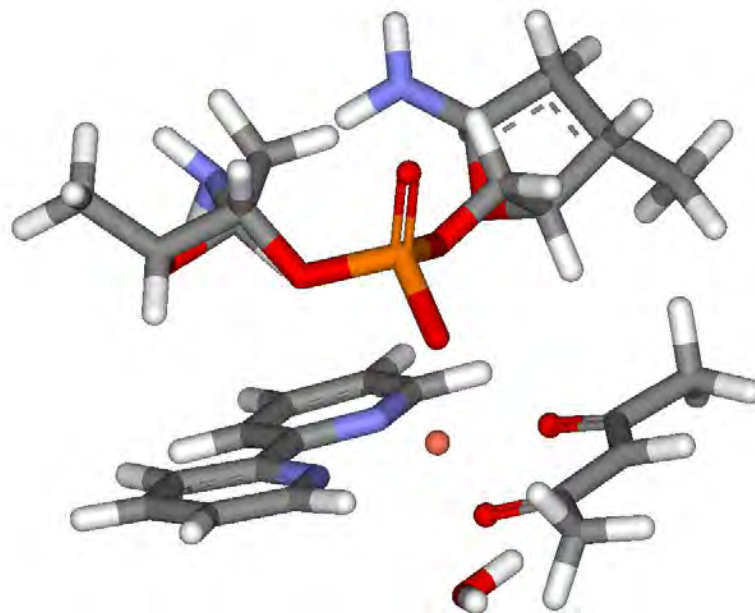


Figura 4.4: Corte 1. Se muestran dos desoxirribosas unidas por el grupo fosfato, la casio01 y una molécula de agua

Los complejos intercalados presentan una desviación promedio mayor (3.4 Å) con respecto a los complejos interaccionando en los surcos (1.2 Å). Un resumen de los promedios del índice RMSd se presenta en la figura 4.7. Los valores de los complejos en los surcos (*s* y *sm*) son menores a los complejos intercalados. La mayor deformación con respecto a la cadena de ADN sin complejo es la polyAA, en la pos1, seguida de polyGG y polyAT en la pos2; después polyAT y polyGG en la pos1. Estas cuatro simulaciones presentan una gran deformación en la cadena debido a la unión del cobre con átomos de oxígeno o nitrógeno de las adeninas y las citosinas presentes. Las simulaciones comienzan con la cas01 intercaladas y en las etapas de calentamiento y equilibrio, la cas01 encuentra una posición geoméricamente estable dentro del sitio de intercalación y permanece ahí por toda la simulación. En este caso, la posición es entre dos pares de bases o entre los enlaces de Watson-

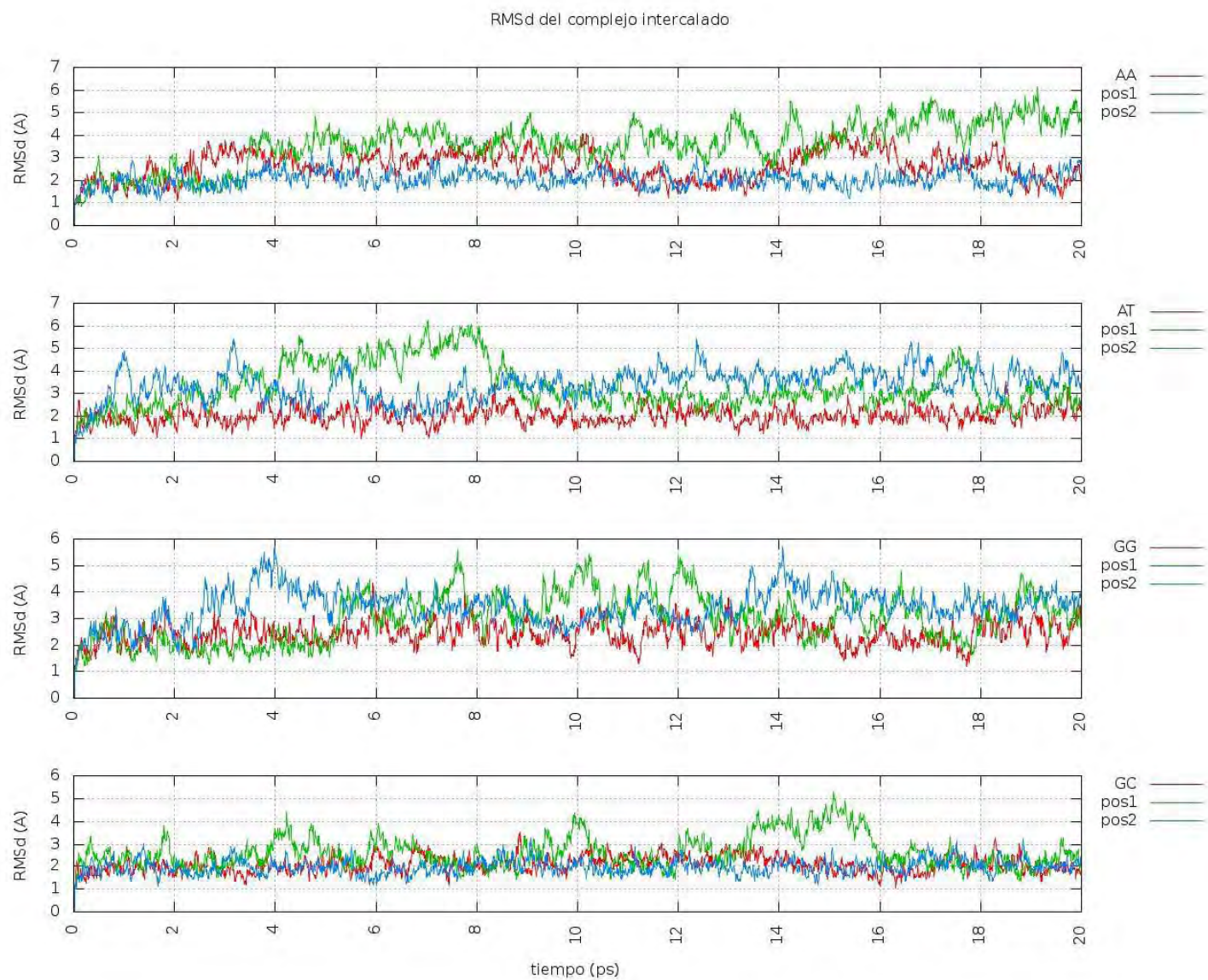


Figura 4.5: Valores de “Mass weighted RMSd” para las cadenas de ADN-B y los complejos intercalados diferentes posiciones.



Figura 4.6: Valores de “Mass weighted RMSd” para las cadenas de ADN-B y los complejos en los surcos.

Crick, causando una gran deformación en la cadena (ver figura 4.8). En el caso de la pos2, inicia con el ligante no aromático intercalado y al término de la simulación, la cas01 queda fuera de la cadena.

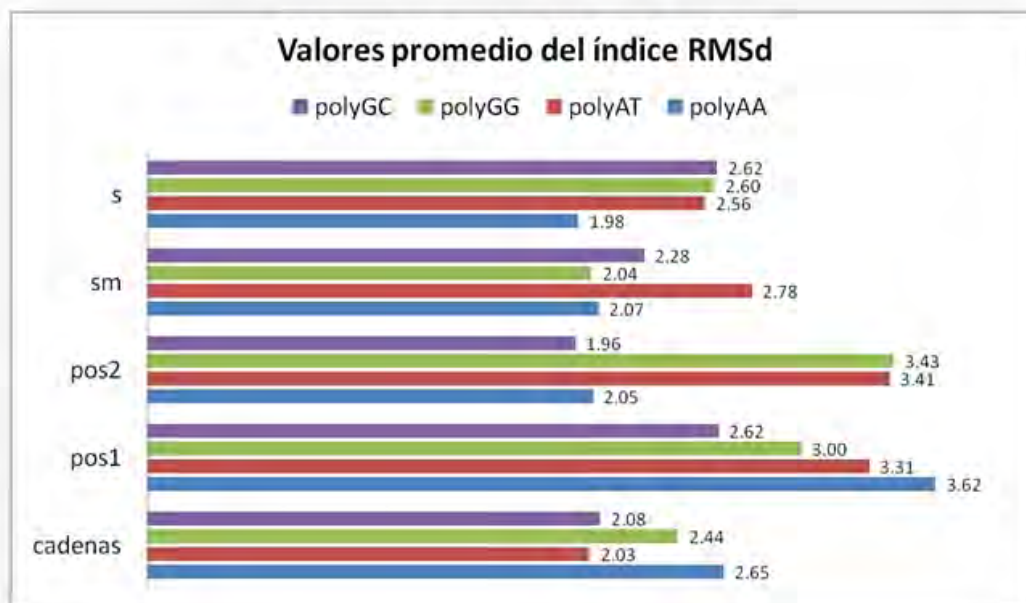


Figura 4.7: Promedio de valores RMSd en la simulación de 20ns (en Å).

El análisis de fluctuaciones por residuo se resumen en la Fig. 4.9. Cada una de las líneas representa una simulación. Valores altos corresponden a grandes fluctuaciones geométricas a lo largo de los 20 ns. El número de residuo corresponde al residuo identificado en el campo de fuerza. Para todas las simulaciones, los residuos 1 al 10 corresponden a la cadena 5'→3', los residuos del 11 al 20 corresponden a la cadena 3'→5' y los residuos 21, 22 y 23 corresponden a los ligantes de la casiopeína: acetilacetato, biperidina y cobre, respectivamente. Se pueden observar los valores elevados de los residuos iniciales y terminales de ambas cadenas de ADN, residuos 1, 10, 11 y 20, debido a que tienen mayor libertad de movimiento al estar al principio y al final de la cadena. Las simulaciones que mayor fluctuación geométrica tienen son: AA-pos1, AT-pos1, GG-pos2 y AA-sm. En el caso del complejo

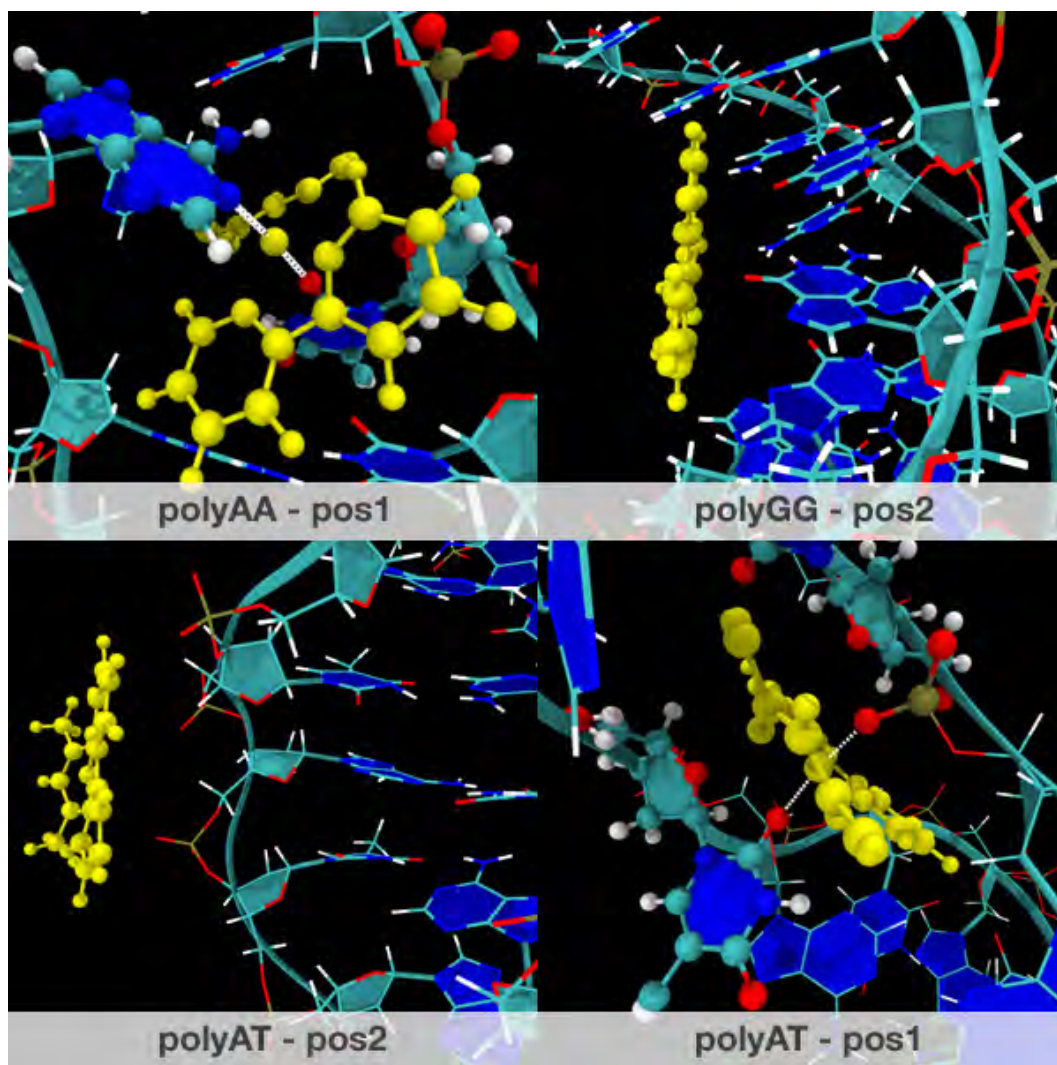


Figura 4.8: Geometría promedio para los valores mas altos de deformación.

AA-pos1, se observa una gran fluctuación en la base A5 debido al desplazamiento causado por la intercalación de la biperidina. Algo similar sucede en el complejo AT-pos1. En el caso del complejo GG-pos2, la fluctuación del nucleótido G5 es resultado del acetilacetato ocupando la posición del nucleótido. La cas01 tiene la mayor fluctuación en el complejo AA-sm debido a que se solvata al inicio de la simulación y no presenta interacción con la cadena, de manera similar ocurre con el complejo GC-pos2 donde la cas01 se separa de la cadena. En general, las interacciones en el surco menor presentan las fluctuaciones más pequeñas debido a una mayor estabilidad por la formación del enlace débil entre el cobre y el oxígeno de un grupo fosfato.

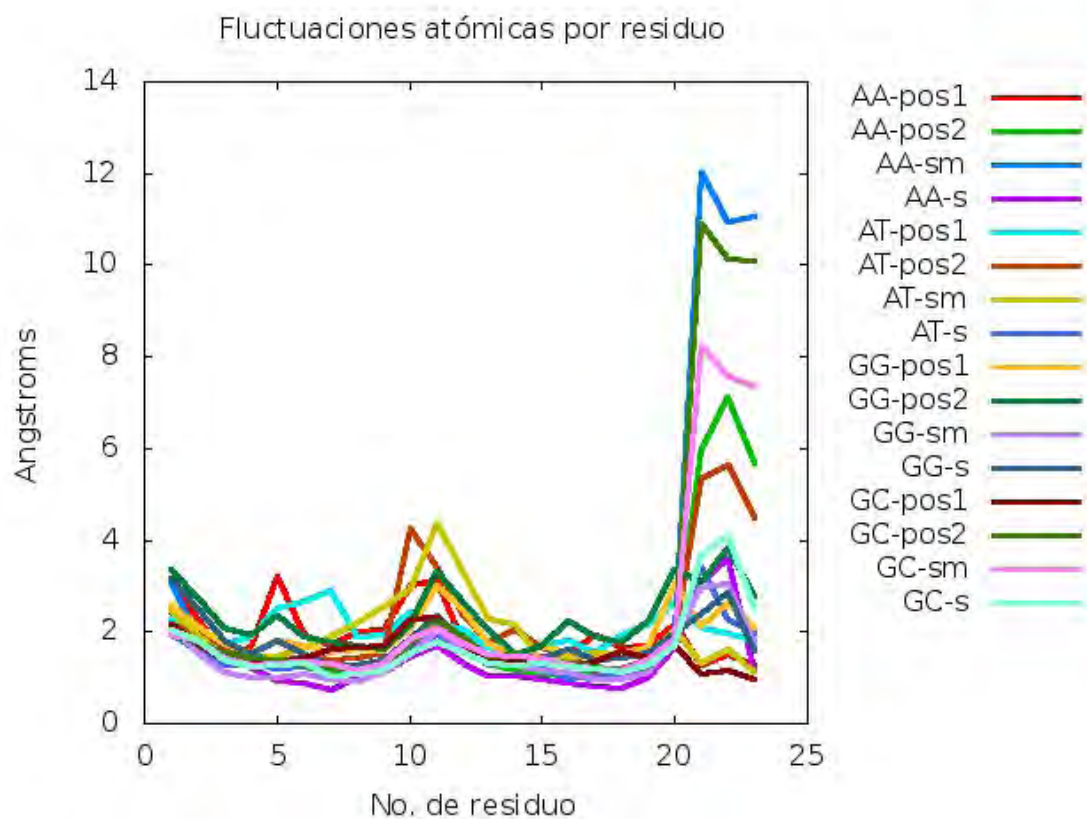


Figura 4.9: Promedio del valor de fluctuación residuo en el total de 20ns de simulación.

Los valores del análisis energético realizado con el método MM-PBSA se resume en la figura 4.10. Los complejos favorables energéticamente son GC-s (figura 4.11), GC-pos1 (figura 4.12), GG-pos1 (figura 4.13), AT-s (figura 4.14), AT-pos1 (figura 4.15) y AA-s (figura 4.16); aunque los mas estables son los complejos GC-s, GC-pos1, AA-s y AT-pos1. En el cuadro 4.3 podemos ver el resumen de resultados de todas las simulaciones realizadas con los valores de ΔG en kcal/mol, con el error promedio asociado y los átomos unidos al centro metálico despues de la corrida de producción. Los complejos mas estables son los que se encuentran en el surco menor y están unidos al oxígeno 1 del fosfato (O1P) y a una molécula de agua en la posición axial. Las simulaciones en el surco mayor terminan con dos moléculas de agua unidas al cobre, a excepción de poly(AT) en donde el cobre está unido al nitrógeno 7 de la adenina 15 (DA15:N7). Las simulaciones *pos2* son similares a *sm*; tres de las cuatro simulaciones terminan unidas a moléculas de agua en la posición axial, menos la poly(GG) en donde el cobre está unido con DG5:O6. En la *pos1*, la simulación poly(GG) finaliza con el cobre unido a DG5:O6 y a una molécula de agua. El resto de las simulaciones en la *pos1* crean una gran distorsión en la cadena pues el átomo de cobre se une con diferentes átomo de oxígeno y nitrógeno de las bases nitrogenadas. La simulación polyAA se une con un nitrógeno de la adenina DA6:N1 y con el oxígeno de la timina del mismo par, DT16:O2. En polyAT, el cobre está unido al oxígeno de la timina DT6:O2 y del otro lado con el oxígeno de un fosfato DT16:O2P, lo cual provoca que el esqueleto se deforme para acomodar este fosfato. La simulación poly(GC), es similar a polyAA, el cobre está unido a los átomos de oxígeno de dos citocinas de cadenas contrarias DC6:O2 y DC16:O2.

A partir del análisis energético, se seleccionaron las estructuras con ΔG negativo y de ellas se realizó un recorte alrededor de la cas01 para hacer el estudio cuántico. En cada caso, se obtuvo una gráfica molecular que permite identificar las interacciones específicas entre la cas01 y la cadena de ADN. Para la interacción mas estable ($\Delta G=-36.55$ kcal/mol) tambien se realizó una optimización completa del corte del surco menor. Se observó que la configuración del corte inicial permaneció en toda la optimización. La gráfica molecular de este corte se presenta en la figura 4.17.

Las líneas punteadas corresponden a interacciones débiles de largo alcance que existen entre la cas01 y la cadena de ADN, similar al enlace débil que existe entre el cobre y una molécula de agua axial. En la parte superior, el cobre forma un enlace débil con el oxígeno del fosfato. Este enlace se presenta

Secuencia	pos1	pos2	sm	s
poly(AA) ₂	DA6:N1-Cu-DT16:O2 19.3931(5.6917)	WAT-Cu-WAT 8.3235(6.0709)	WAT-Cu-WAT 11.0467(10.5372)	DA7:O1P-Cu-WAT -19.2626(8.8567)
poly(AT) ₂	DT16:O2P-Cu-DT6:O2 -28.156(5.168)	WAT-Cu-WAT (41.551(16.4826)	DA15:N7-Cu-WAT 6.8777(4.204)	DT16:O1P-Cu-WAT -23.8232(7.1101)
poly(GG) ₂	DG5:O6-Cu-WAT -11.9245(5.6217)	DG5:O6-Cu-WAT -7.7774(3.7591)	WAT-Cu-WAT 39.2921(11.9909)	DC17:O2-Cu-WAT -0.3622(1.9407)
poly(GC) ₂	DC6:O2-Cu-DC16:O2 -28.9169(4.7544)	WAT-Cu-WAT -0.3894(10.0153)	WAT-Cu-WAT 32.4457(11.3188)	DC8:O1P-Cu-WAT -36.5459(3.5998)

Cuadro 4.3: Resumen de interacciones finales de la cas01 y valores de ΔG y desviación estándar en kcal/mol.

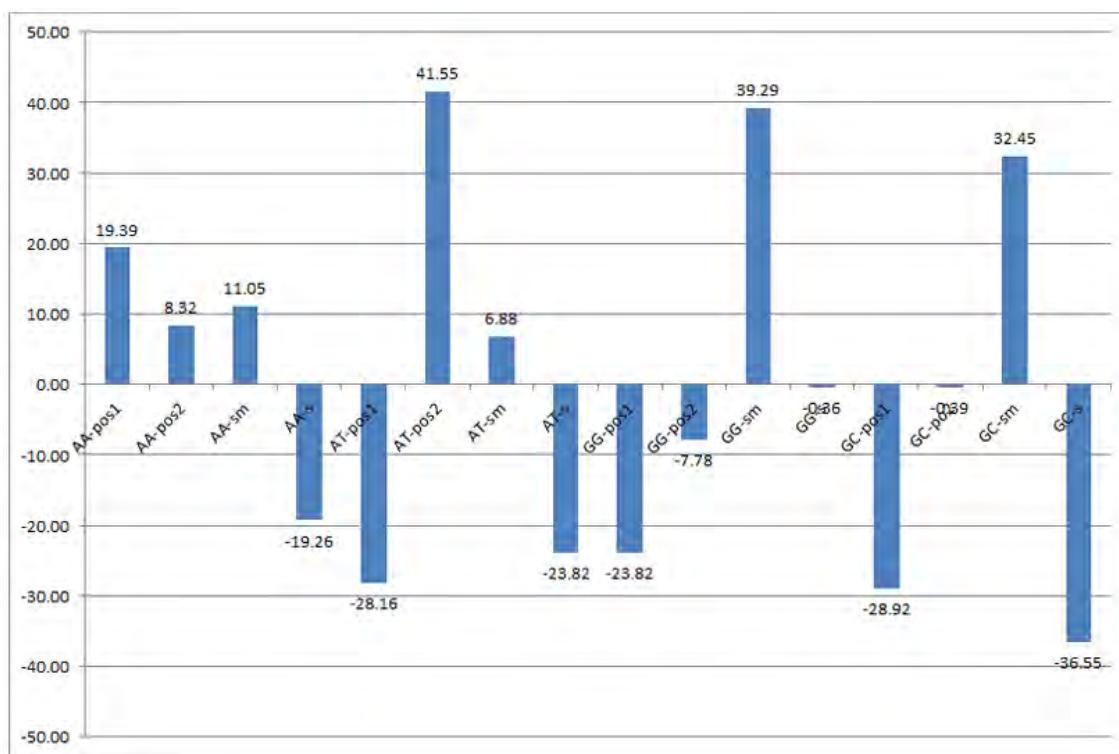


Figura 4.10: Valores de ΔG para los diferentes complejos (en kcal/mol).

en la mayoría de las simulaciones, anclando el complejo al surco menor de la cadena de ADN. El acetilacetato únicamente forma una interacción débil con los hidrógenos del C5 y C3 de la desoxirribosa. En cambio, la biperidina presenta múltiples interacciones con el azúcar. Ambos nitrógenos de la biperidina (N1 y N2) interactúan con el oxígeno del fosfato que forma el enlace éster con el C3 del azúcar. Esta interacción es del tipo donador-aceptor donde el oxígeno tiene sus pares de electrones orientados hacia los nitrógenos de la biperidina deficientes en electrones (figura 4.19).

Los hidrógenos axiales de los carbonos C1 y C4 apuntan directamente al centro de los anillos aromáticos de la biperidina, formando interacciones del tipo C-H \cdots π con una distancia de 2.9 y 2.8 Å respectivamente. Esta distancia es comparable con las distancias de los cristales de netropsina y antramycin, ambos medicamentos anticancerígenos que interactúan con el surco menor

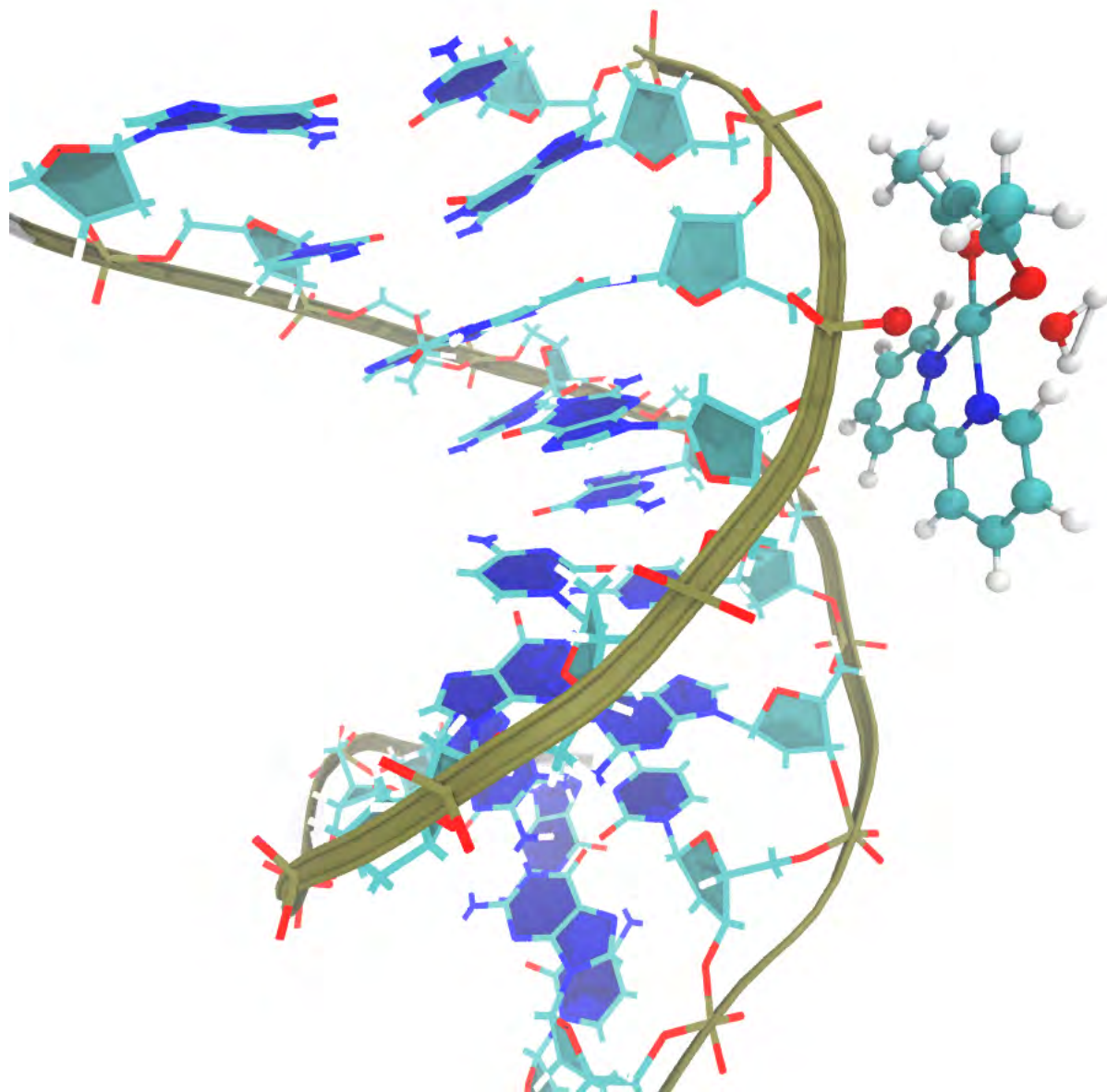


Figura 4.11: Estructura promedio de GC-s. $\Delta G = -36.5459$ kcal/mol, DC8:O1P-Cu-WAT

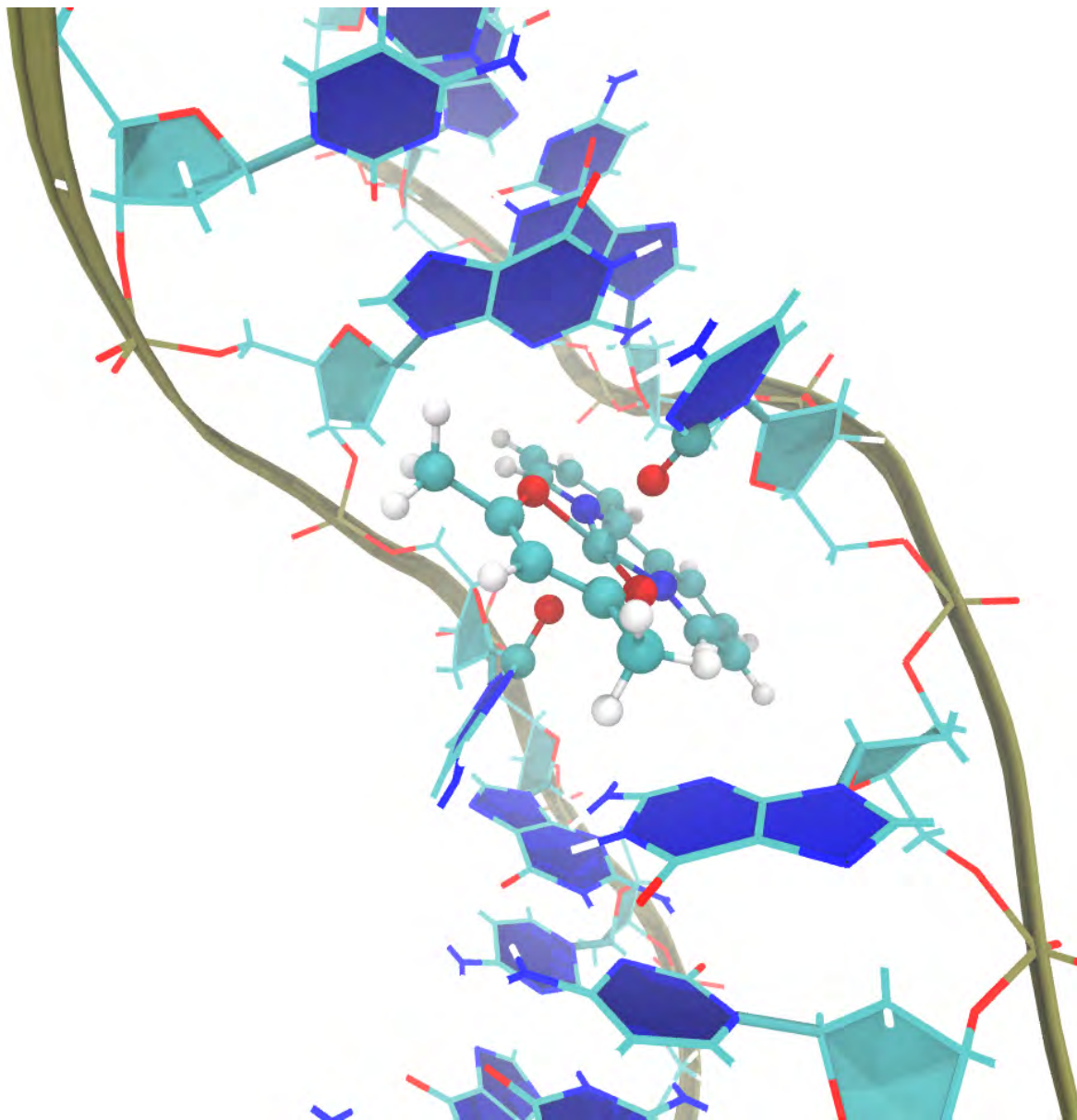


Figura 4.12: Estructura promedio de GC-pos1. $\Delta G = -28.9169$ kcal/mol, DC6:O2-Cu-DC16:O2

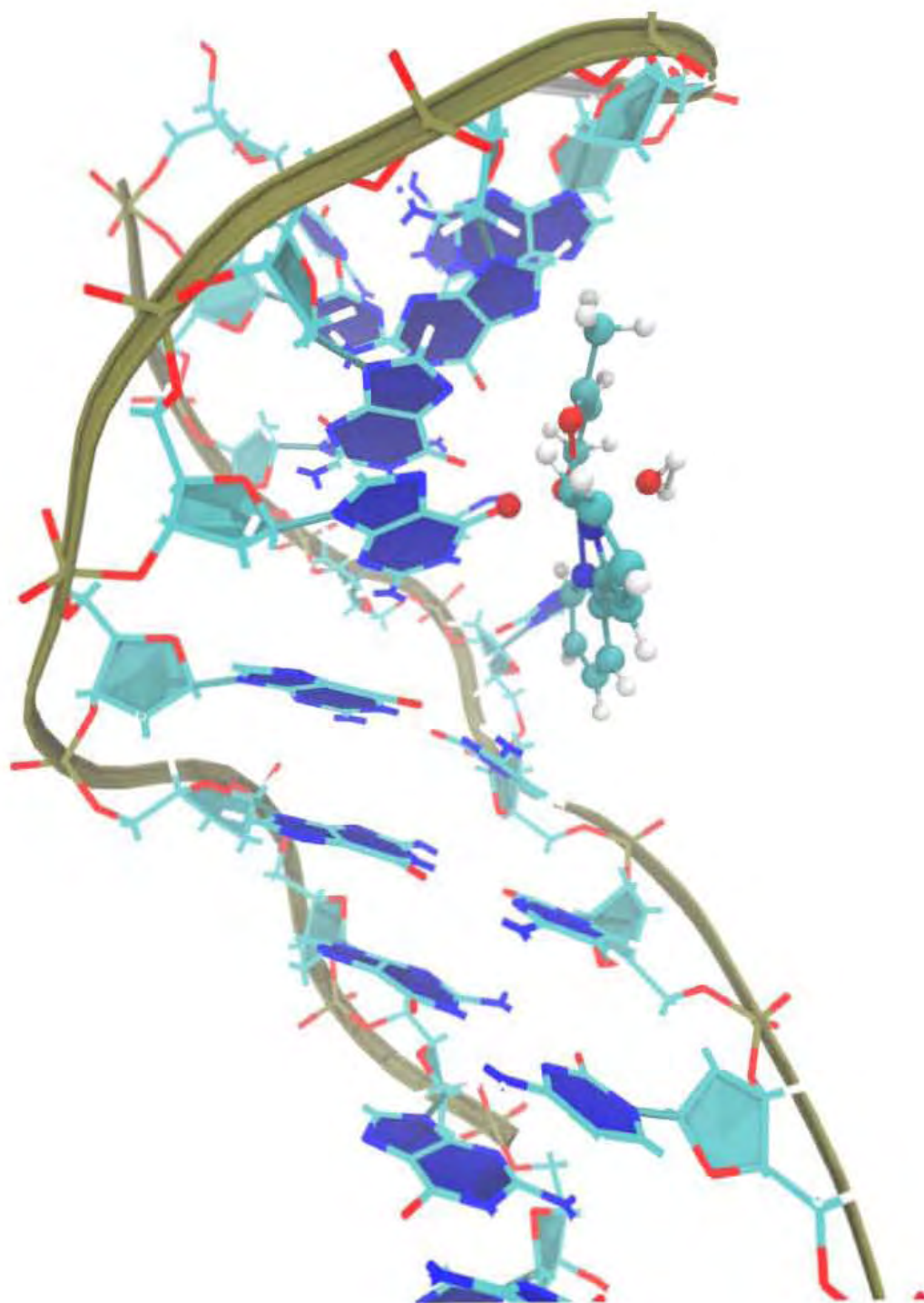


Figura 4.13: Estructura promedio de GG-pos1. $\Delta G = -11.9245$ kcal/mol, DG5:O6-Cu-WAT

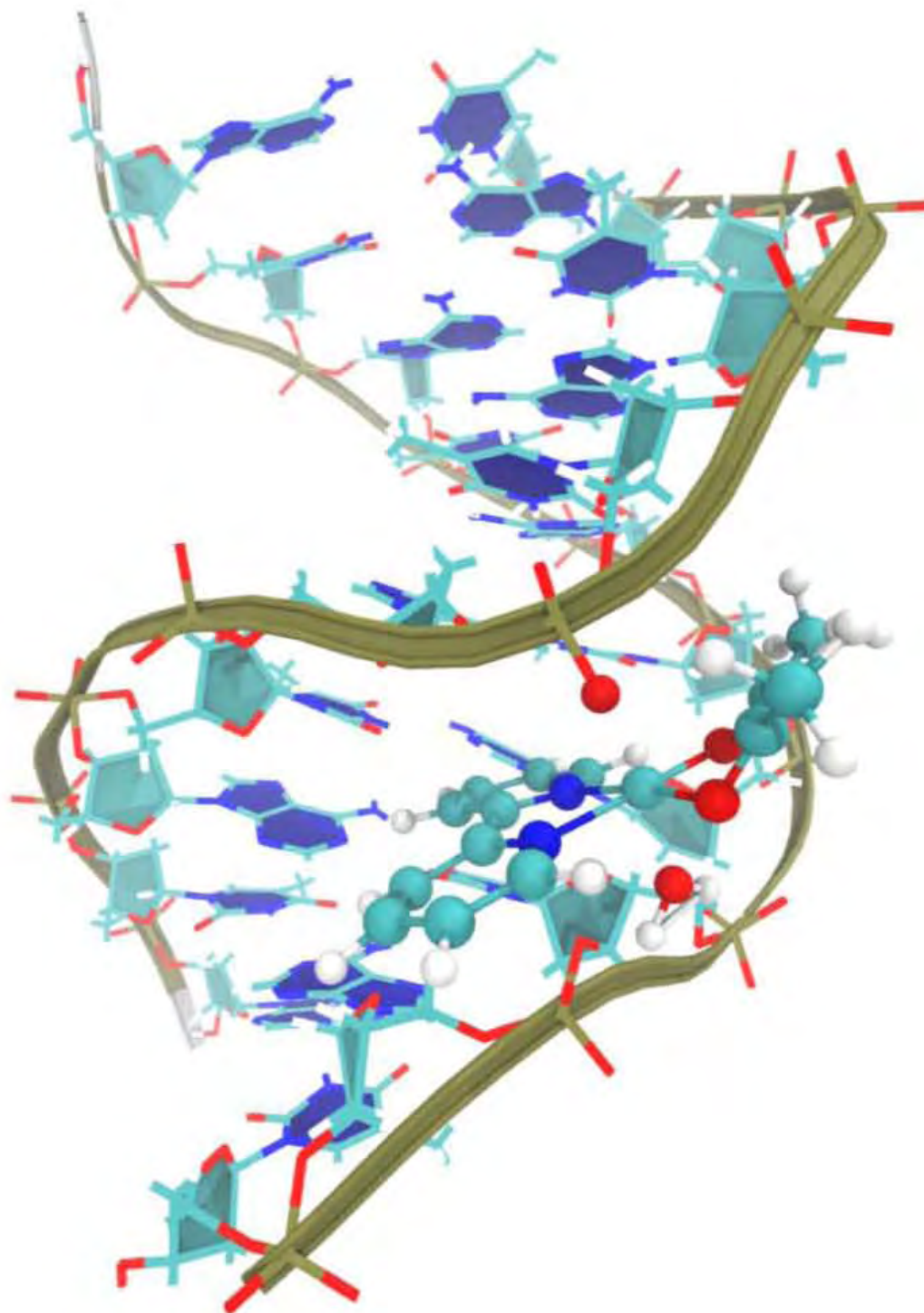


Figura 4.14: Estructura promedio de AT-s. $\Delta G=-23.8232$ kcal/mol, DT16:O1P-Cu-WAT

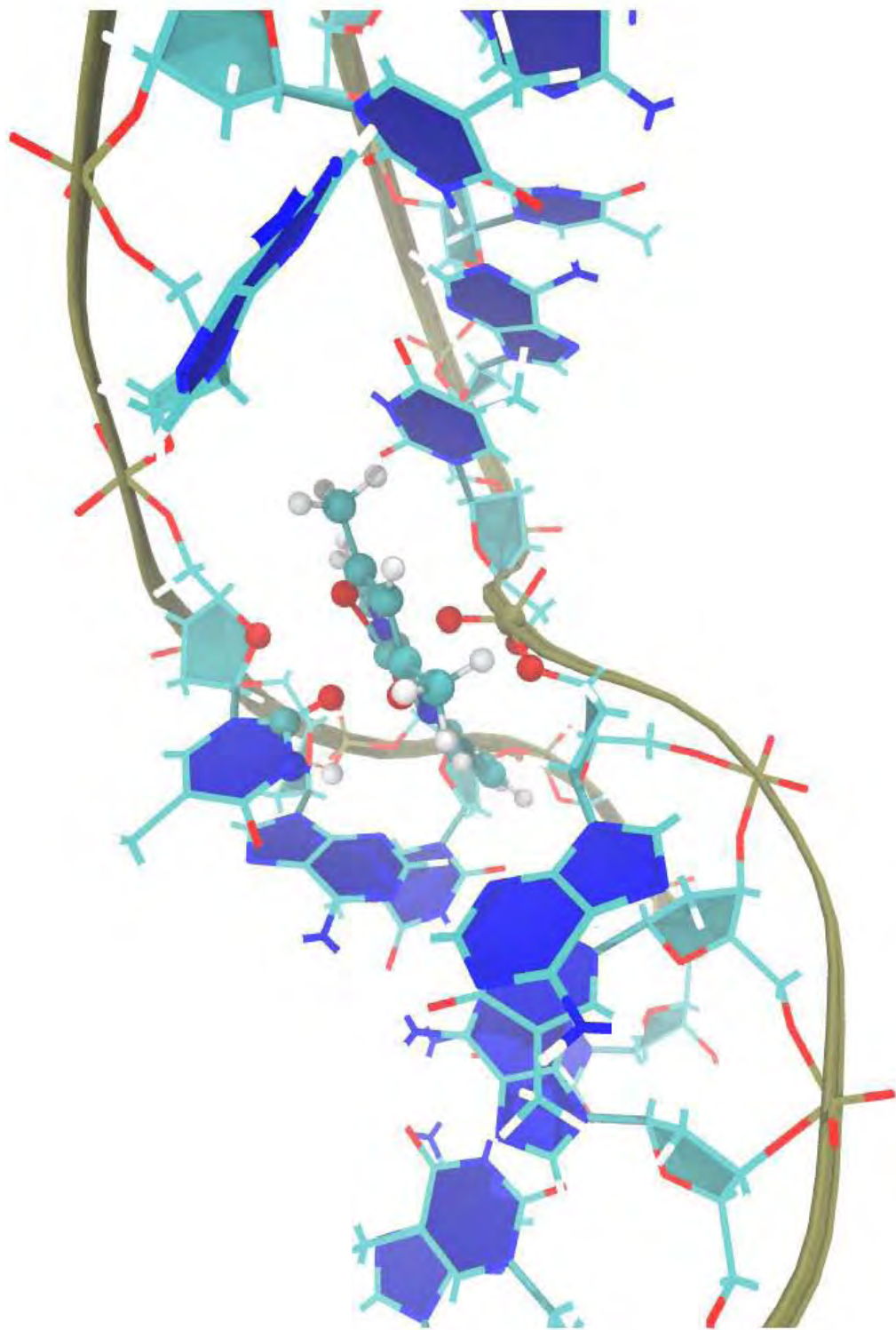


Figura 4.15: Estructura promedio de AT-pos1. $\Delta G = -28.156$ kcal/mol, DT16:O2P-Cu-DT6:O2

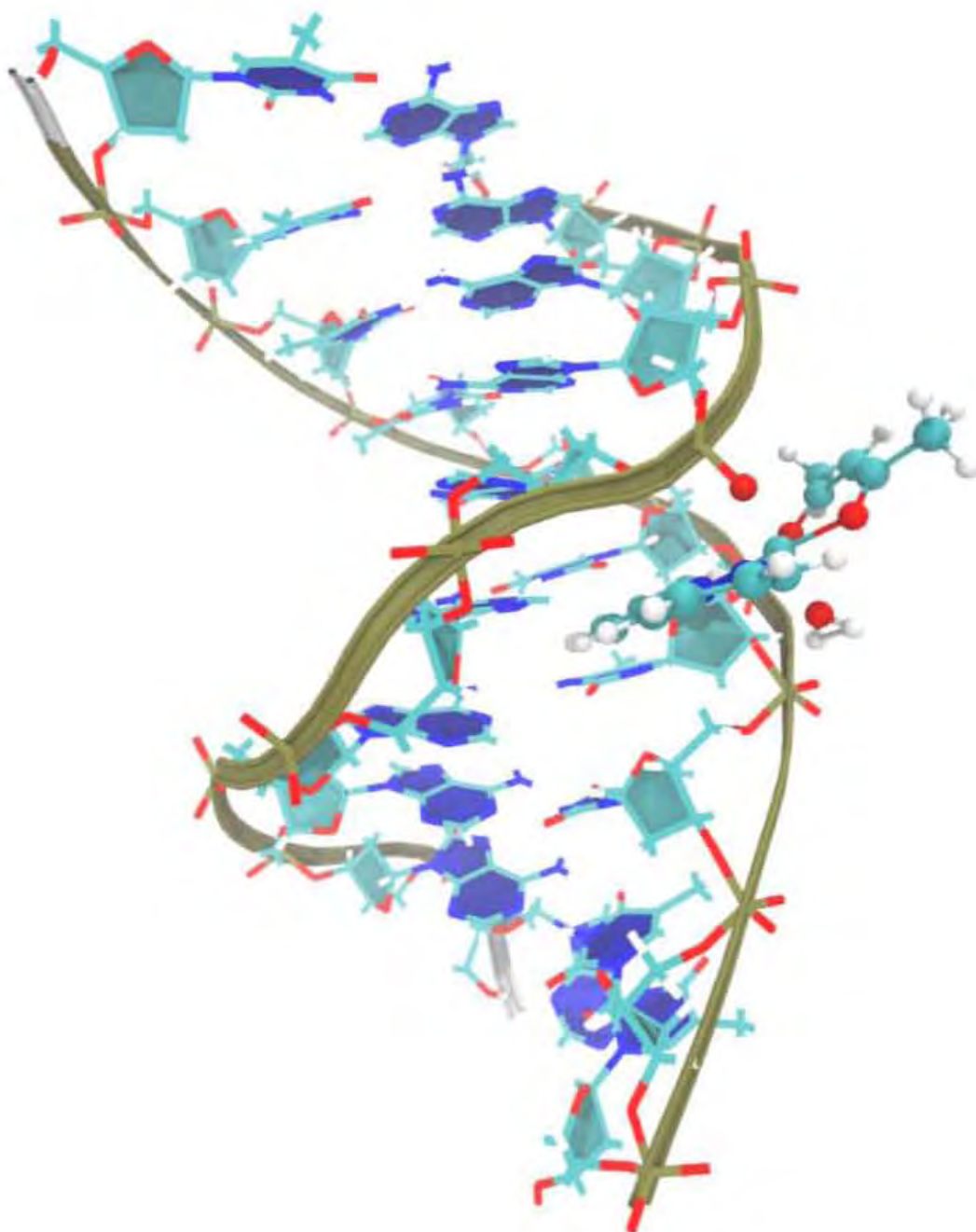


Figura 4.16: Estructura promedio de AA-s. $\Delta G=-19.2626$ kcal/mol, DA7:O1P-Cu-WAT

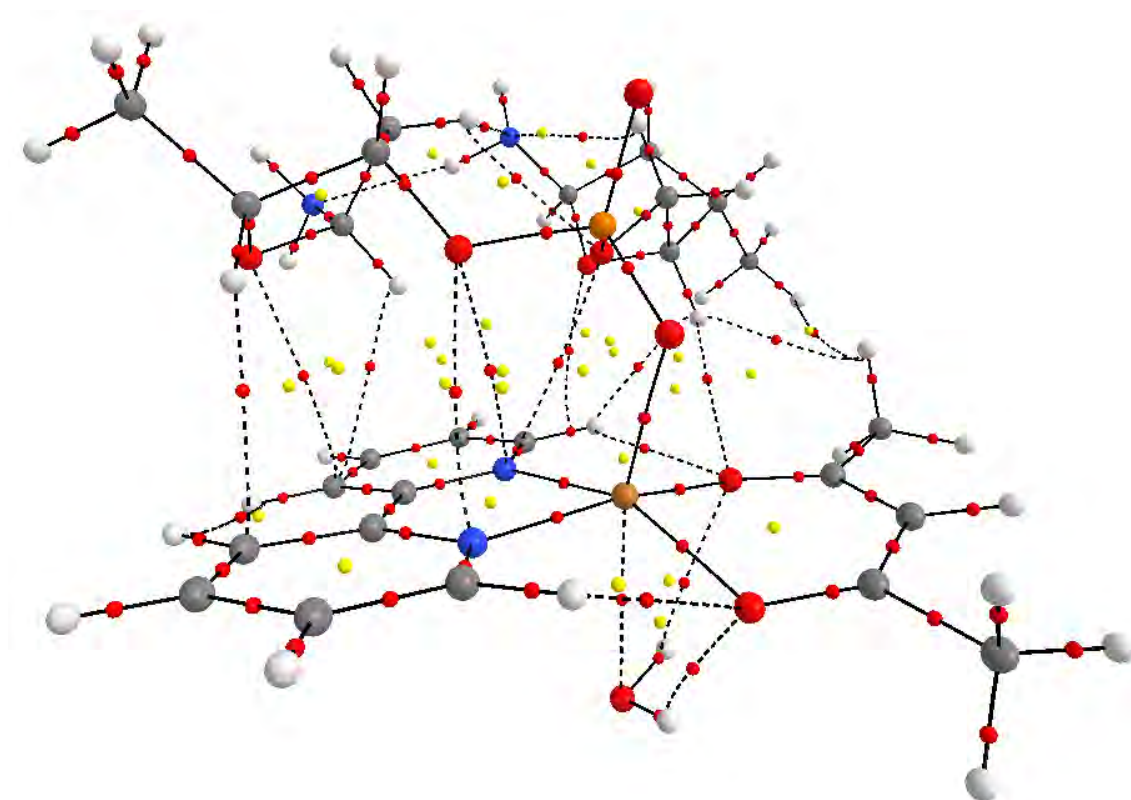


Figura 4.17: Gráfica molecular del corte en el surco menor. Los puntos rojos corresponden a los puntos críticos de enlace y los amarillos corresponden a los puntos críticos de anillo.

del ADN y vemos distancias de interacción C-H... π en un rango de 2.6 a 2.9 Å. La molécula de agua axial del cobre forma puentes de hidrógeno con ambos oxígenos del acetilacetato. Los valores de densidad de los puntos críticos de enlace reflejan el grado de unión entre lo cas01 y el ADN. En la figura 4.20 se muestran los valores de densidad ($\#e^-/\text{bohr}^3$). Podemos notar una mayor densidad electrónica entre los 2 enlaces axiales alrededor del cobre. La mayor interacción es con el oxígeno del fosfato, seguida por la unión débil con el oxígeno de la molécula de agua axial. Los hidrógenos de esta molécula de agua forman enlaces débiles con los oxígenos del acetilacetato. La siguiente interacción más importante es la del N2 de la bipyridina con el O2 del grupo fosfato. Las interacciones de la parte aromática de la bipyridina

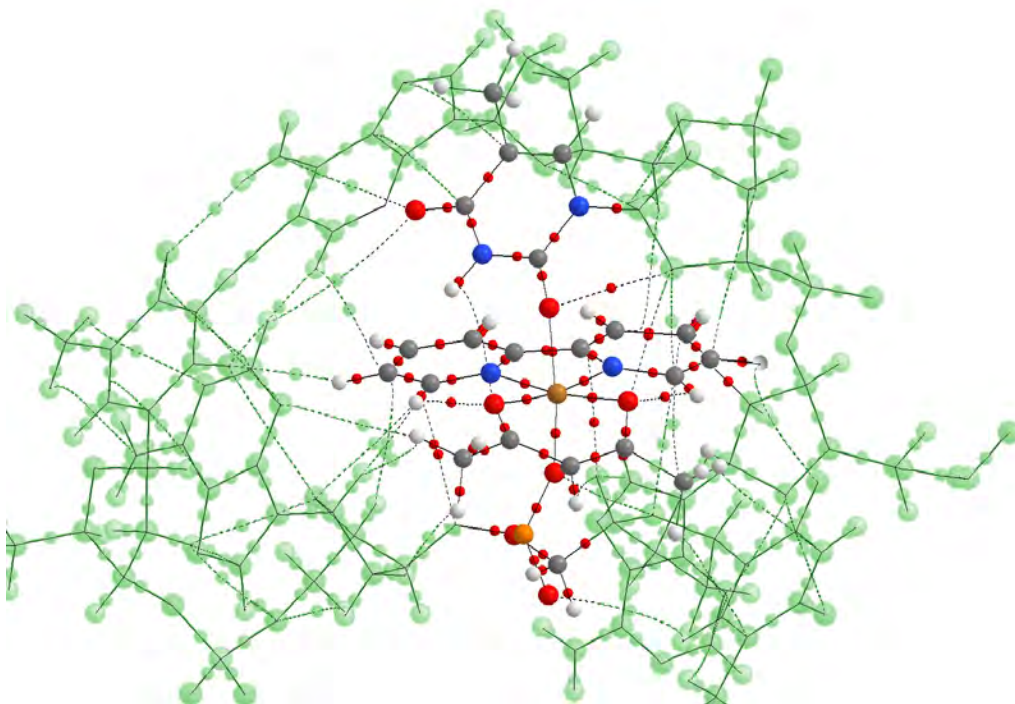


Figura 4.18: Gráfica molecular del corte AT-pos1. La cas01 está unida por medio del cobre al O2 de la timina 6 y con el O2 del oxígeno de fosfato. Podemos notar la gran deformación que provoca la presencia del compuesto dentro de la cadena de ADN.

con los hidrógenos del azúcar va de 0.005892 hasta 0.006961, mientras que los valores de densidad en la interacción del ligante no aromático son de 0.004480 y 0.004683.

Adicionalmente a la gráfica molecular, se obtuvieron los valores de la población electrónica para cada molécula para monitorear la redistribución de la densidad electrónica ρ al formarse la interacción de cas01 con el ADN. El resumen de los valores se puede ver en la figura 4.21.

Como primer paso, se considera una población electrónica de los ligantes de la cas01 por separado: bipyridina ($\rho = 82e^-$, cobre II ($N = 27e^-$) y acetil-acetonato ($N = 54e^-$). La formación de la cas01 obliga a una redistribución en la densidad electrónica donde los incrementos o decrementos se calcularon

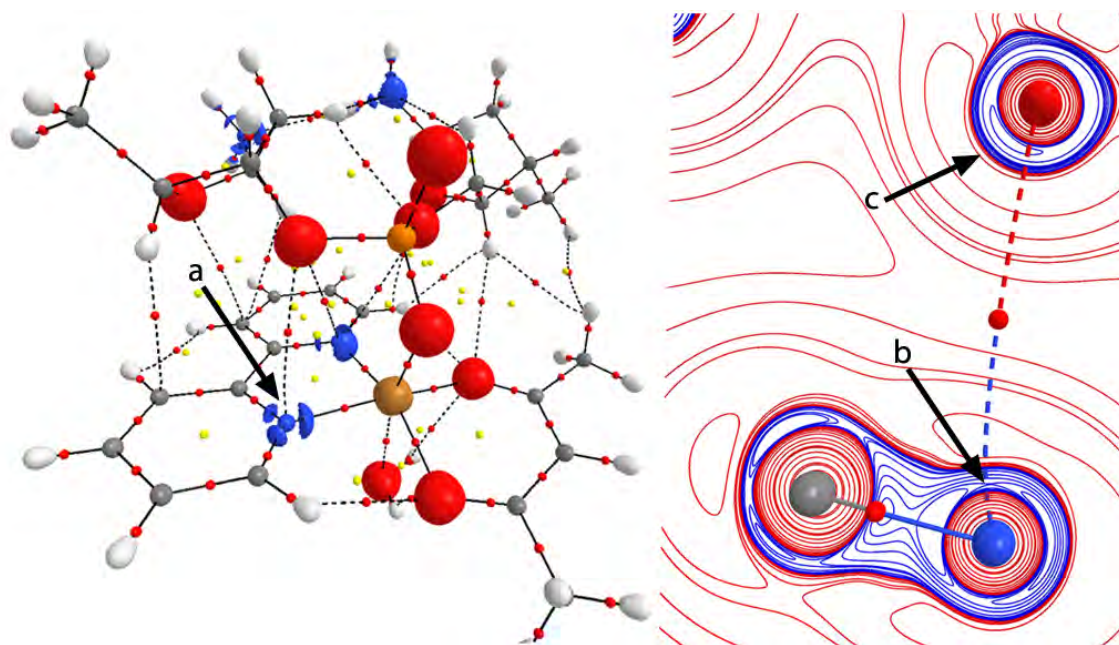


Figura 4.19: Gráfica molecular del corte AA-s traslapada con una isosuperficie del laplaciano de la densidad del corte. Se puede observar en a) y b) la deficiencia de densidad electrónica de los nitrógenos en el ligante aromático y en c) la acumulación de densidad electrónica del oxígeno del fosfato apuntando hacia la deslocalización del nitrógeno.

utilizando la expresión:

$$\Delta N = N_{\text{Complejo}} - N_{\text{Ligante}}$$

Un valor negativo corresponde a un decremento en la densidad electrónica, mientras que un valor positivo corresponde a un aumento de la densidad. La formación de la cas01 incrementa la densidad electrónica del cobre, misma densidad que obtiene de la disminución proporcional de ambos ligantes. En la formación del complejo con el agua axial, el metal y el agua pierden densidad, redistribuyendola al acetilacetionato y a la bipyridina. El grupo fosfato y el metal ceden densidad electrónica, redistribuyéndose a ambos ligantes y a la molécula de agua presente.

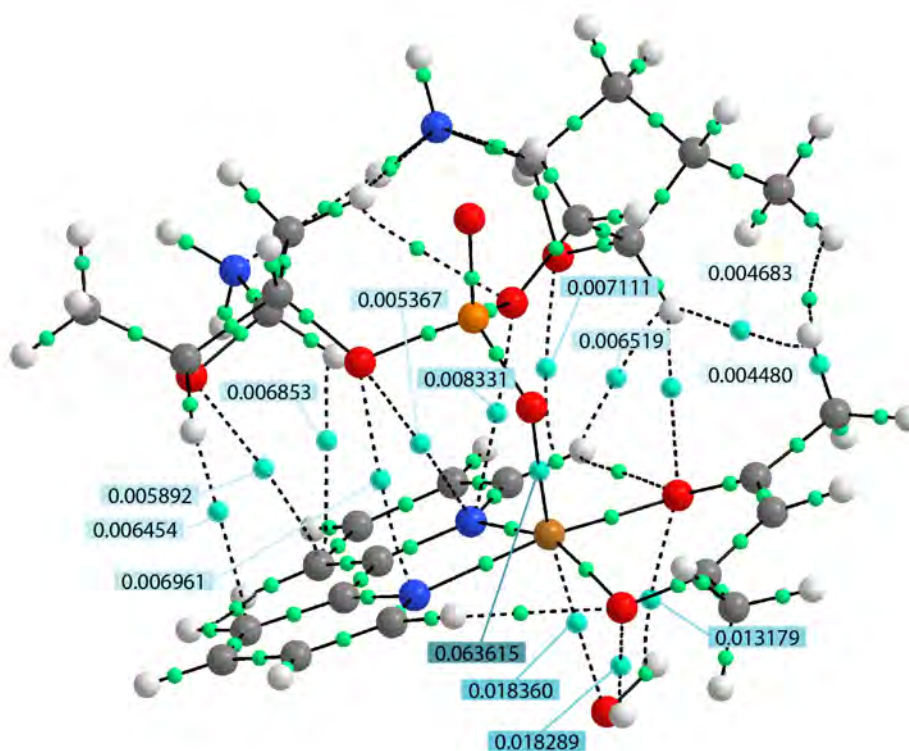


Figura 4.20: Valores de ρ en los puntos críticos de enlace entre la cas01 y los azúcares del esqueleto del ADN (corte1).

Otras dos propiedades atómicas que pueden ser calculadas son la localización y la deslocalización electrónica que se relacionan con la población electrónica del átomo por la ecuación:

$$N(A) = \lambda(A) + \Delta(A) \quad (4.2)$$

La deslocalización, $\lambda(A)$, es la medida del número de electrones que se encuentran localizados en la región atómica A mientras que $\Delta(A)$ describe al

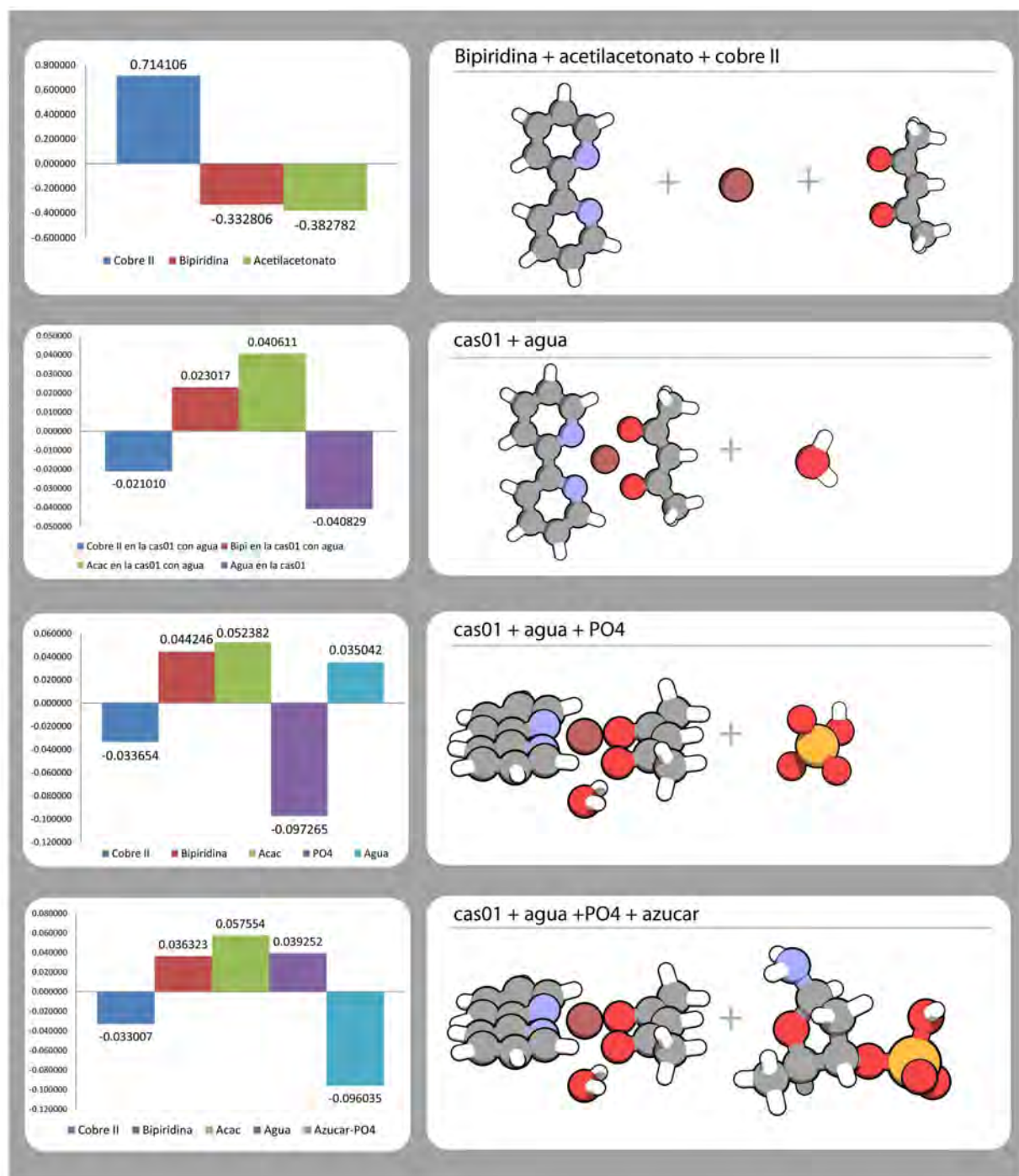


Figura 4.21: Distribución de la densidad electrónica ρ en la formación de la cas01 y la interacción con las diferentes partes de la interacción con el ADN.

número de electrones del átomo que se deslocalizan en el resto de la molécula (sección 1.4.4). En el caso del corte del surco menor (figura 4.17) se tiene una localización de electrones de $26.5332 e^-$ para el cobre. Para poder entender el significado de este valor se presenta a continuación la correlación entre la localización electrónica del cobre y su potencial de media onda.

Se utilizaron datos experimentales electroquímicos de las 21 casiopeínas (Tabla 1.4) y se compararon con la localización electrónica del cobre en cada una de ellas.

Nombre	$E_{1/2}^*$	Clave
$[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{glicinato})(\text{H}_2\text{O})]^+$	-0.271	H
$[\text{Cu}(4\text{-metil-1,10-fen})(\text{glicinato})(\text{H}_2\text{O})]^+$	-0.281	4m
$[\text{Cu}(5\text{-metil-1,10-fen})(\text{glicinato})(\text{H}_2\text{O})]^+$	-0.273	5m
$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fen})(\text{glicinato})(\text{H}_2\text{O})]^+$	-0.310	47dm
$[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-1,10-fen})(\text{glicinato})(\text{H}_2\text{O})]^+$	-0.292	56dm
$[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-1,10-fen})(\text{glicinato})(\text{H}_2\text{O})]^+$	-0.302	Tm
$[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{glicinato})(\text{H}_2\text{O})]^+$	-0.318	Hb
$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipy})(\text{glicinato})(\text{H}_2\text{O})]^+$	-0.338	dm Hb

Cuadro 4.4: Complejos utilizados en el ensayo de potencial de media onda. * $V/(\text{Fc}/\text{Fc}^+)$

Los valores de potencial de media onda se obtuvieron del trabajo publicado por Bravo-Gómez y colaboradores (cuadro 4.4, [70]). La correlación entre el potencial de media onda y la localización (λ , fig. 4.22) y la deslocalización electrónica del cobre (Δ , fig. 4.23) presentan valores de $R^2 = 0.9$ y $R^2 = 0.92$ respectivamente.

Los compuestos en donde hay una menor localización electrónica del cobre son los que tienen una mayor cantidad de sustituyentes en el ligante aromático y son los que cuentan con un valor más negativo en su potencial de media onda. Complementariamente, los compuestos en donde el cobre presenta mayor deslocalización son los compuestos con un gran número de sustituyentes en su ligante aromático.

El potencial de media onda se puede considerar como el trabajo para reducir a una molécula. A valores más negativos es más difícil introducir un nuevo electrón al sistema. Mientras más localizado esté el cobre, se podría

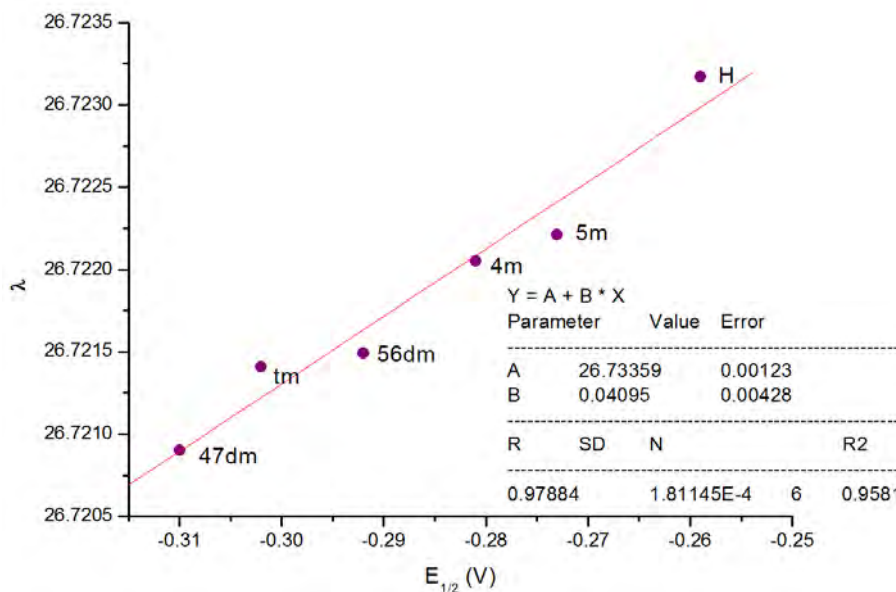


Figura 4.22: Relación del valor de λ del centro metálico con el valor de potencial de media onda.

pensar que sería más difícil reducir al complejo, pero, la correlación que se presenta, muestra el comportamiento opuesto. Sin embargo, se puede proponer que la reducción de la casiopeína inicia por el ligante aromático y si existe un mayor número de electrones deslocalizados entre el cobre y el ligante aromático resultaría más difícil la reducción, lo que estaría de acuerdo con las tendencias observadas para la deslocalización y la localización presentados en las figuras mencionadas.

En el caso del corte del surco menor, el cobre presenta una menor localización electrónica que todas las casiopeínas aisladas, lo que implicaría un valor de potencial de media onda aún más negativo, por lo tanto, un menor poder oxidativo de especies alrededor del ADN. Se ha reportado que la presencia de las casiopeínas en el ADN puede resultar en una disminución de la producción de especies reactivas o radicales libres de oxígeno [74]. Esta actividad no debe surgir de la interacción directa con el ADN sino de el efecto de las casiopeinas en algun otro proceso celular.

Por otro lado, los ésteres de fosfato PO_4 que constituyen los puntos de

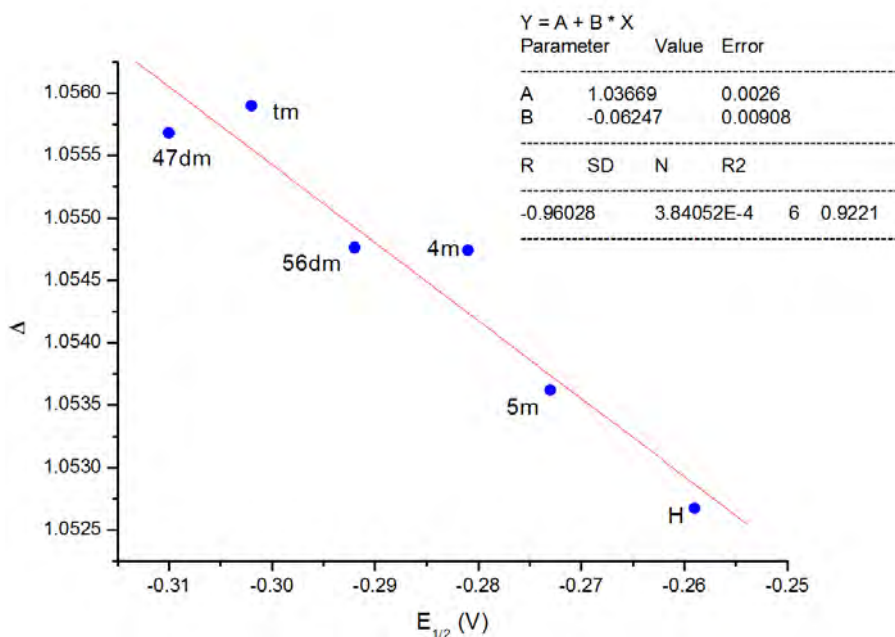


Figura 4.23: Relación del valor de Δ del centro metálico con el valor de potencial de media onda.

unión entre los nucleósidos del ADN, presentan una considerable resistencia a la hidrólisis catalítica, lo que los hace ideales para la formación del esqueleto de los ácidos nucleicos (ver capítulo 1.1.1). Algunas metaloenzimas hidrolizan grupos fosfato porque contienen en su sitio activo diferentes metales de transición que catalizan la ruptura O-P. El grupo de investigación de Brown ha reportado que el cobre coordinado a ligandos aromáticos tienen la capacidad de actuar como catalizador en las reacciones de hidrólisis de fosfatos en las moléculas 2-[2'-fenantronil]fenil-fosfato, 2-[2'-fenantronil]fenil-metil-fosfato y 2-[2'-fenantronil]fenil-dimetil-fosfato (ver figura 4.24, [121]).

Los resultados de esta tesis muestran que la formación del complejo casiopeína-fosfato puede ser el paso inicial de la hidrólisis de una cadena de ADN y explicar los resultados publicados por Chikira [74]. De esta manera, la presencia del átomo de cobre de las casiopeínas puede actuar como catalizador para realizar esta hidrólisis. Esto se hace evidente en el cambio de las propiedades atómicas del átomo de fósforo antes y después de que el grupo

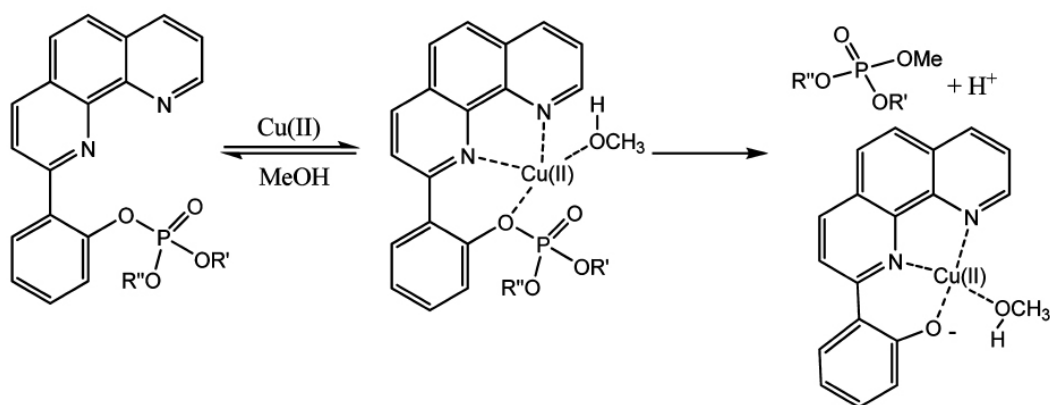


Figura 4.24: Ejemplo tipo de los estudios realizados por Stan Brown y colaboradores para el estudio de la hidrólisis de fosfato en presencia de cobre(II).

fosfato se une al átomo de cobre la casiopéina. La población electrónica del átomo de fósforo en el grupo fosfato unido al cobre es de $N = 11.3265e^-$, mientras que el fósforo libre tiene una población de $N = 11.3624e^-$, la diferencia de $0.0359e^-$ hace que el grupo fosfato sea más fácil atacarlo por un grupo donador ocasionando la ruptura del enlace y la unión entre nucleótidos.

Este trabajo propone el mecanismo por el cual las casiopéinas tienen función de nucleasa, siendo este la unión del centro metálico al grupo fosfato del surco menor. Esto ayuda a hidrolizar los fosfatos del ADN provocando la ruptura de la unión entre los nucleótidos.

4.3. Conclusiones parciales

Con el fin entender las interacciones específicas entre las casiopéinas y el ADN, se realizó un estudio de dinámica molecular seguido de un análisis cuántico. Para esto se tuvo que parametrizar el complejo de cobre cas01 y se eligieron cuatro posibles situaciones de partida para la simulaciones clásicas. Como modelo de ADN se eligieron cuatro fragmentos con diferentes secuencias sencillas. Después de 20 nano segundos de producción se encontró que los complejos en el surco menor no presentan un cambio importante respecto a

la geometría inicial, quedando unido el átomo de cobre al oxígeno de fosfato más cercano en la posición axial, con una molécula de agua en la posición opuesta. Por otro lado se observó que los arreglos finales del resto de las posiciones son muy diferentes a las de partida, donde la mayoría presenta a la casiopeina solvatada con dos moléculas de agua en ambas posiciones axiales. Existen algunos casos donde la estructura final presenta interacciones con las bases de la cadena, como son: polyAA-pos1, polyGC-pos1, polyAT-pos1, polyGG-pos2 y polyAT-sm . Se observó que la cadena completa de ADN impide la formación de intercalamientos o apilamientos completos de la casiopeina entre las bases nitrogenadas por el exceso de deformación necesaria para que la casiopeina encuentre espacio entre las bases.

El calculo de las diferencias de energía libre permitió establecer un orden de estabilidad de los complejos ADN-cas01. Las posiciones mas estables energeticamente son las del surco menor en donde existe una interacción directa entre un oxígeno del grupo fosfato y el cobre. Se estudiaron, cuanticamente, las interacciones especificas entre la casiopeina y el surco menor, encontrando que ademas de la interacción oxígeno-cobre se encontró interacciones C-H $\cdots\pi$ entre la bipyridina y los hidrógenos axiales de la desoxirribosa. Es posible que estas interacciones junto con el enlace coordinado del grupo fosfato al cobre determinen el reconocimiento de la casiopeina y el DNA.

Basados en experimentos reportados de hidrólisis de fosfato catalizados por complejos de cobre, es posible proponer que el resultado de la interacción casiopeina-ADN sea el aumento de la electrofilia del grupo fosfato, lo que facilitaría su hidrólisis y por tanto la ruptura de la cadena de ADN.

Estudios electroquímicos y cálculos de la deslocalización electrónica muestran que es posible relacionar la interacción directa entre el potencial de media onda de las casiopeinas con la deslocalización electrónica del centro metálico. A mayor deslocalización menor potencial de media onda. Pero a partir de estos resultados no es posible encontrar una relación entre la formación de radicales libres observados en la actividad de la casiopeina y su interacción con el ADN.

Capítulo 5

Conclusiones

Las casiopeínas son complejos de cobre (II) con actividad antitumoral que se atribuye a la producción de radicales libres o a la ruptura de cadenas de ADN. Los cálculos cuánticos, a nivel M05-2x/6-311++G(2d,2p), muestran que al formarse el complejo metálico se observa una donación de densidad electrónica de los ligantes hacia al metal, provocando ligantes deficientes de electrones. Esta deficiencia puede ser compensada por moléculas donadoras como son las bases nitrogenadas de ADN. Este fenómeno se observa en la formación del cristal A01A, cuya densidad electrónica fue estudiada a detalle. Fue posible también encontrar una relación lineal entre el número de electrones donados por las adeninas y la energía de interacción entre la casiopeína y las adeninas, a mayor transferencia electrónica, mayor estabilidad del aducto. Se encontró que el apilamiento depende de la coordinación axial de la base nitrogenada con el átomo de cobre y que existe un orden en afinidad entre la casiopeína y las bases nitrogenadas: G>C>A>T. Se pensó que el apilamiento observado en el cristal podría ser un buen modelo del apilamiento de la casiopeína en el ADN.

Para conocer las interacciones específicas entre las casiopeínas y el ADN se procedió a realizar un serie de simulaciones clásicas. Para esto, se parametrizó una casiopeína en el campo de fuerza de tipo AMBER y se construyeron cuatro cadenas modelo de ADN . A partir de cuatro puntos de partida para cada cadena, se corrieron 20 ns de simulacion y se calcularon las diferencias de energía libre para los 16 arreglos obtenidos. Se encontró que las configuraciones más favorecidas son aquellas en el que las casiopeínas están en el surco

menor interaccionando con un oxígeno de fosfato. A partir de estos resultados se descartó al aducto A01A como modelo de la interacción casiopeína-ADN.

Por medio de cálculos cuánticos se estudio la densidad electrónica de la casiopeína interaccionando con el surco menor a partir de un corte que solo contenía a la casiopeína y una desoxirribosa fosfato. Además de la interacción axial del cobre con el oxígeno del fosfato se encontraron dos interacciones C-H $\cdots\pi$ entre los hidrógenos axiales de la desoxirribosa y los anillos de la bipyridina, y dos interacciones entre el par libre de electrones de un oxígeno de la desoxirribosa con los nitrógenos deficientes de electrones de la bipyridina. Todas estas interacciones constituyen el reconocimiento molecular entre el ADN y la casiopeína.

A partir de estos resultados se pudo proponer que la ruptura de la cadena de ADN observada experimentalmente se debe a que la casiopeína aumenta la electrofilia del grupo fosfato con el que interactúa, catalizando su hidrólisis y provocando la ruptura de la cadena.

La actividad nucleasa de las casiopeínas se resume en los siguientes puntos donde las casiopeínas:

1. Interaccionan más favorablemente con el surco menor del ADN.
2. Se unen axialmente al grupo fosfato y forman interacciones C-H $\cdots\pi$ con la desoxirribosa.
3. Aumentan la electrofilia del fósforo catalizando su hidrólisis.
4. Provocan la ruptura del ADN y la muerte celular.

Apéndice A

Parámetros helicoidales

El número total de deformación reportado para cada una de las simulaciones está formado por la suma del valor de las deformaciones: BP-axis, Xdisp, Ydisp, Inclín, Tip y Ax-bend. Cada uno de estos valores se suma para cada una de las pares de bases y se saca el promedio. La suma de todos los promedios da el valor de deformación total. En la figura A.1 se pueden ver a que se refieren los valores de desplazamiento que se utilizan para obtener el valor total. Todos los valores están dados en Å y se miden a partir del centro de la cadena.

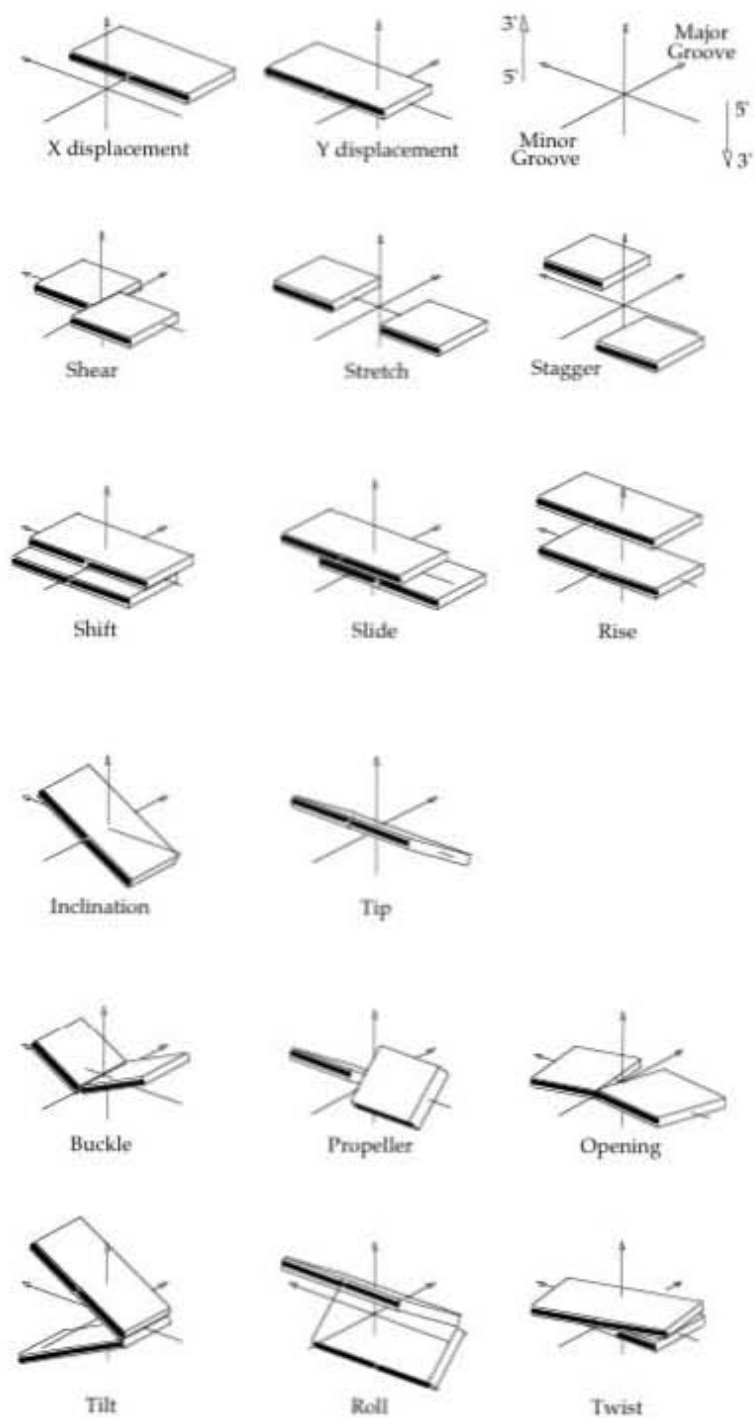


Figura A.1: Diagrama de parámetros helicoidales utilizados en el análisis de deformación de cadenas de ADN.

Apéndice B

Datos de simulaciones

Valores de temperatura, densidad, presión y RMSd (root mean square deviation) contra tiempo (20ns) de todas las simulaciones.

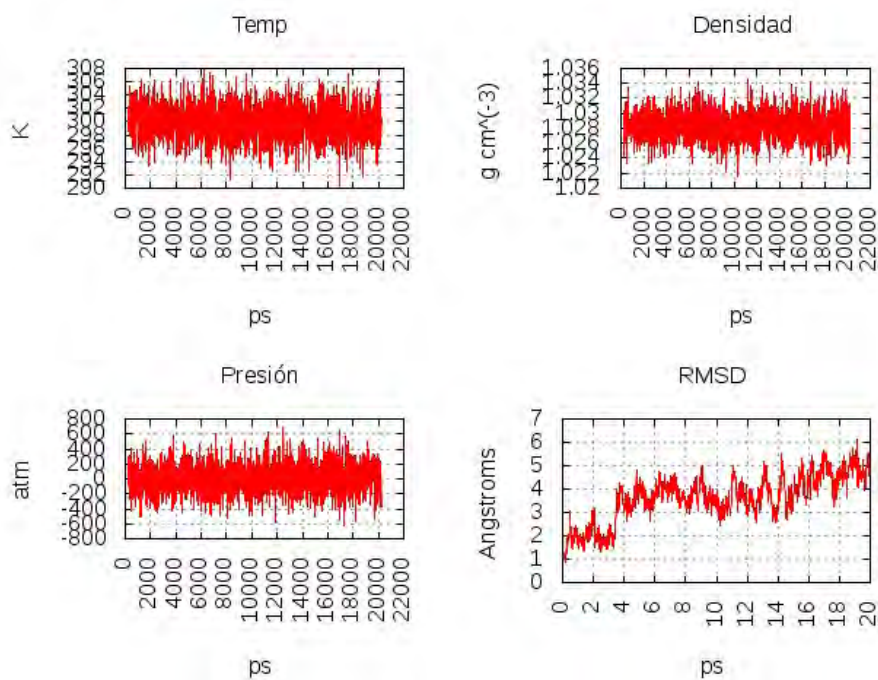
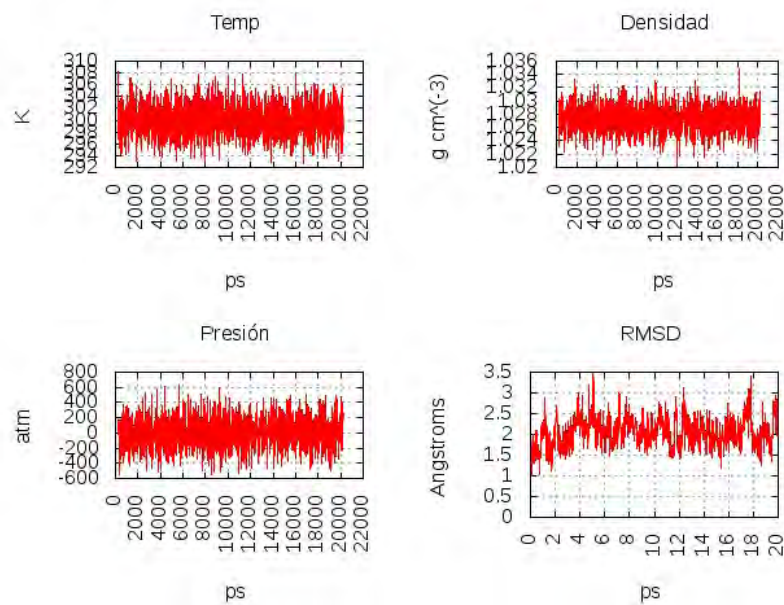
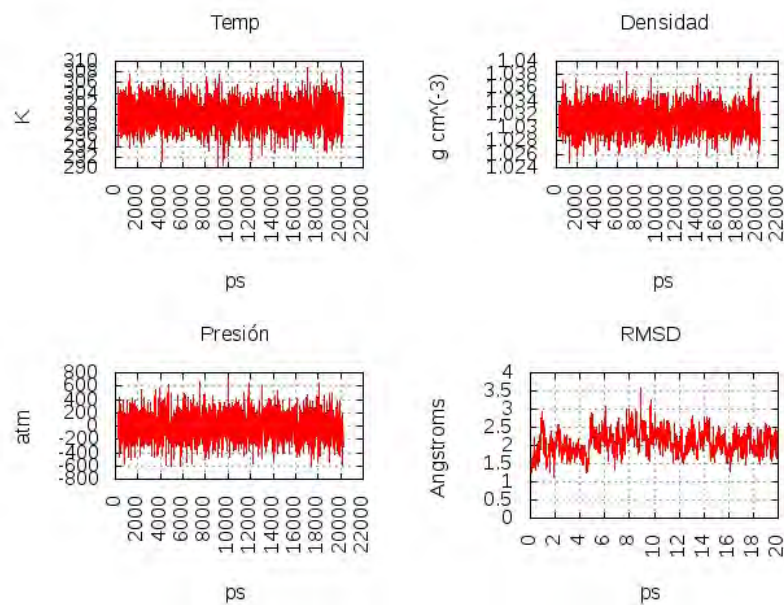
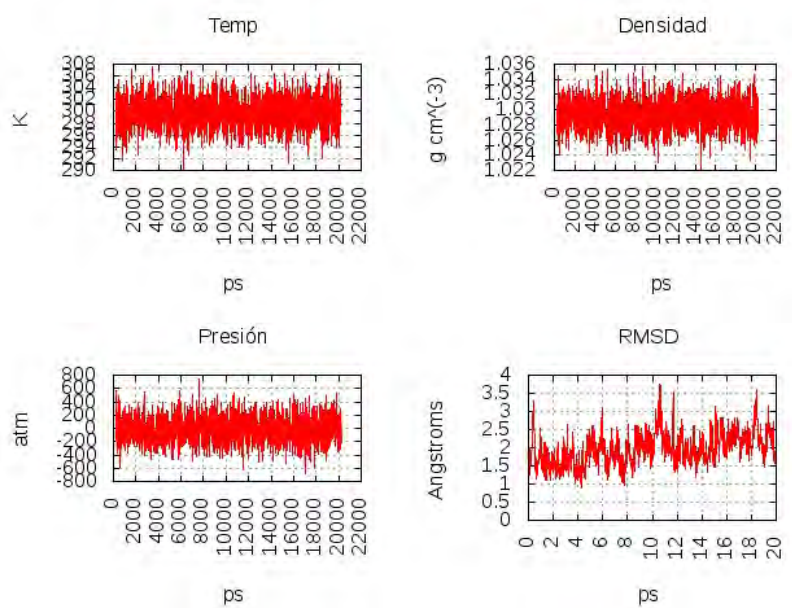
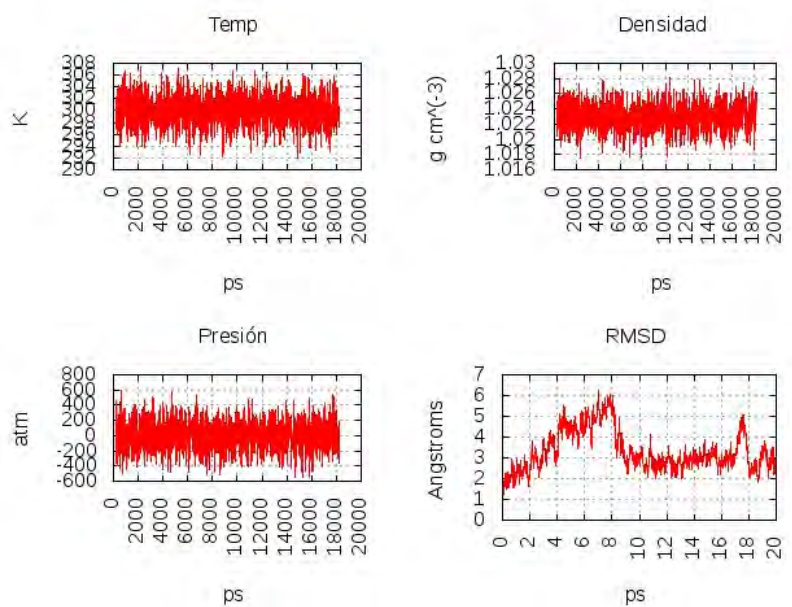
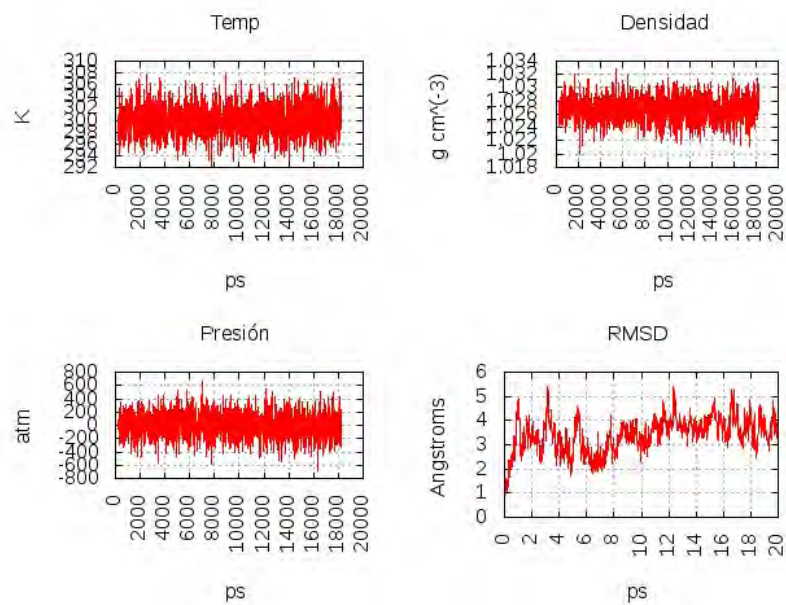
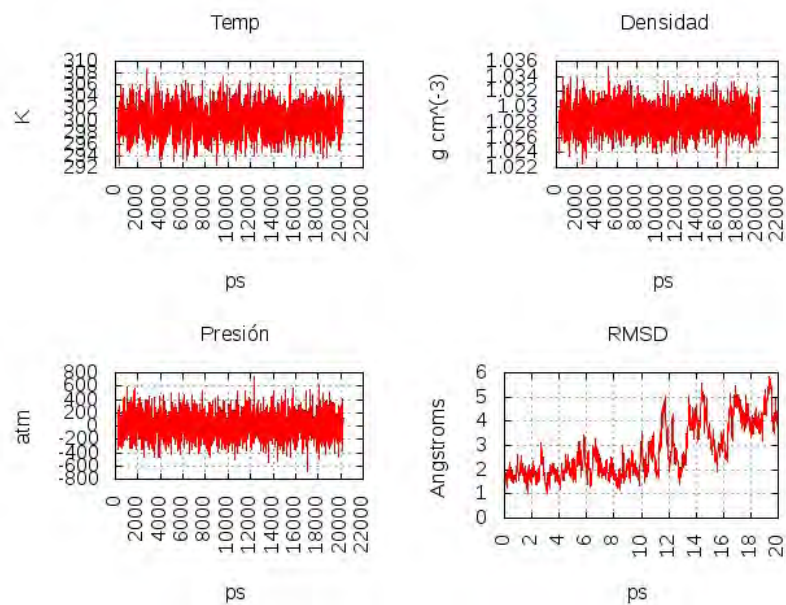
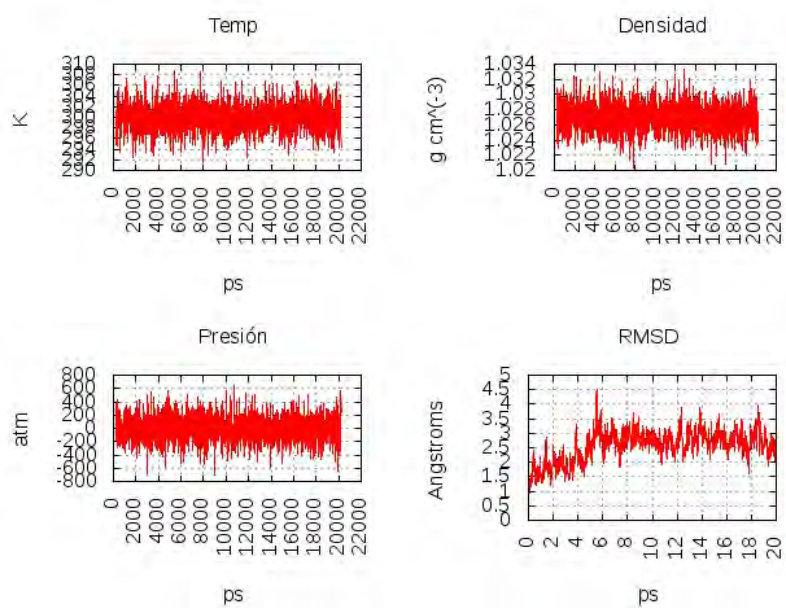
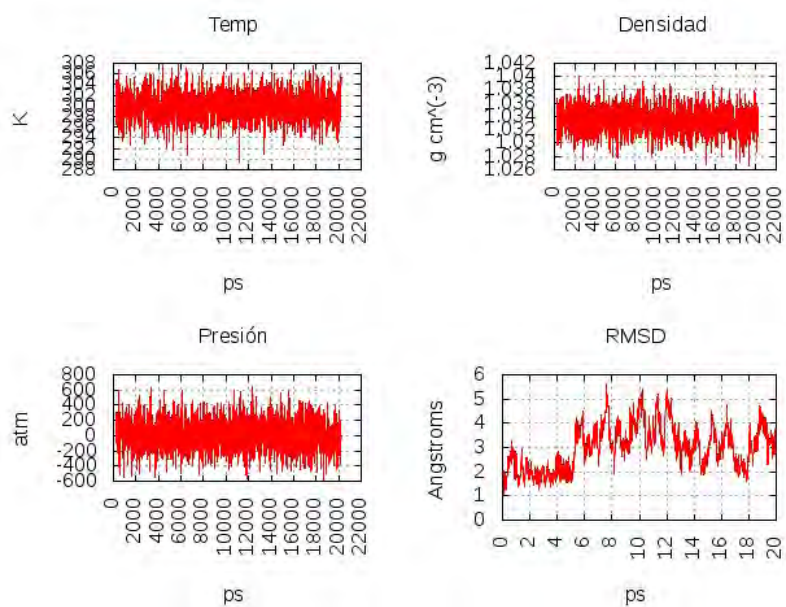


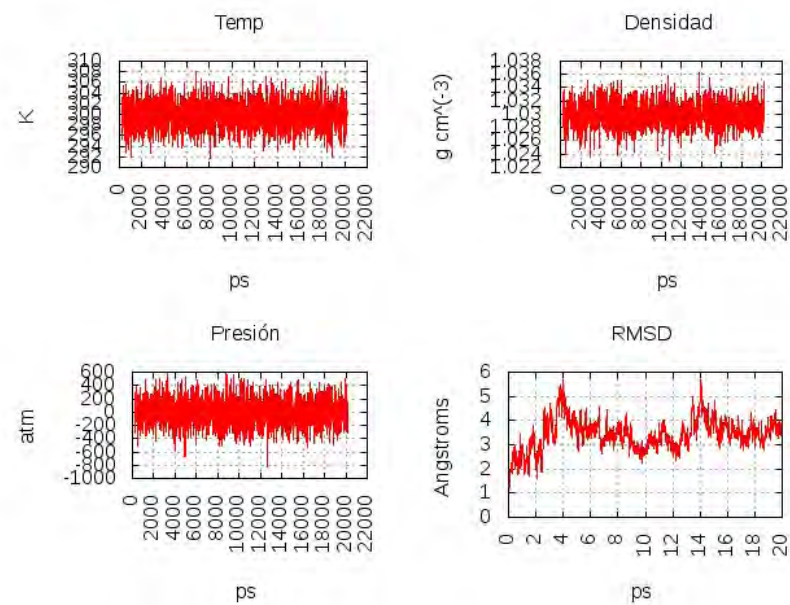
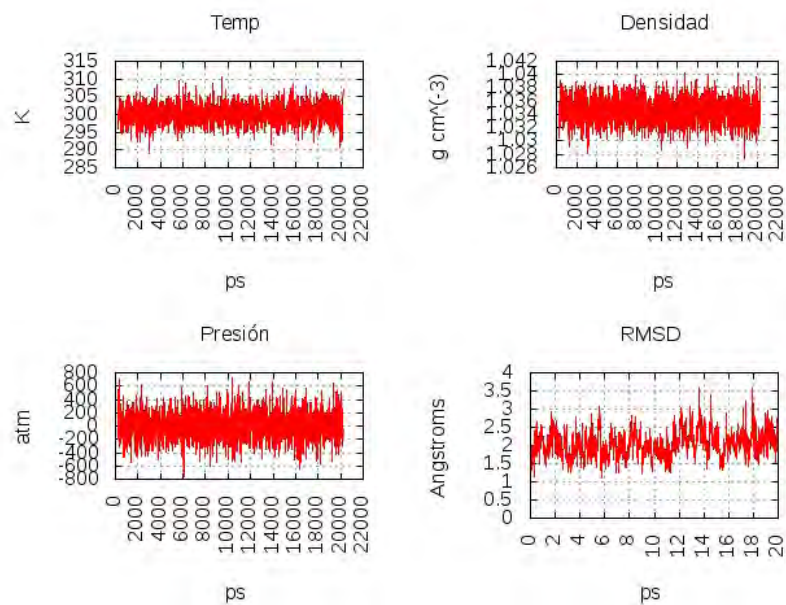
Figura B.1: poly(AA)₂-pos1

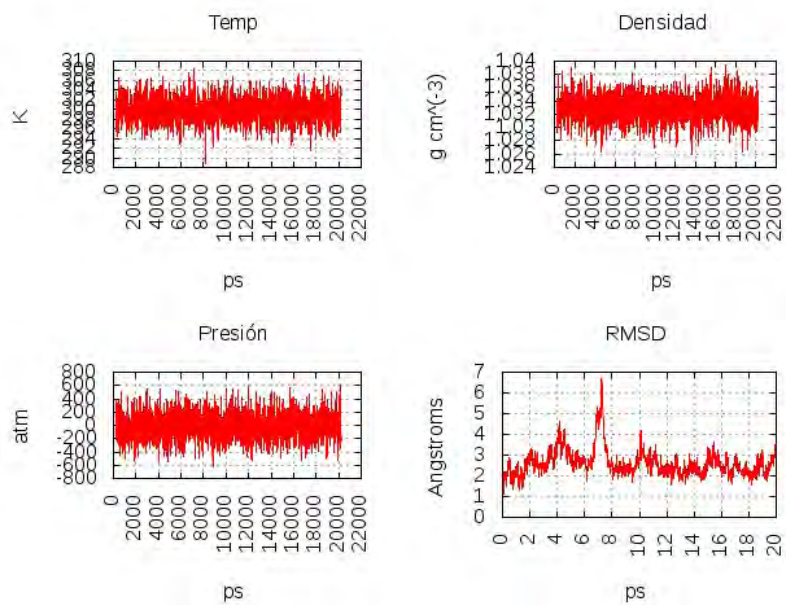
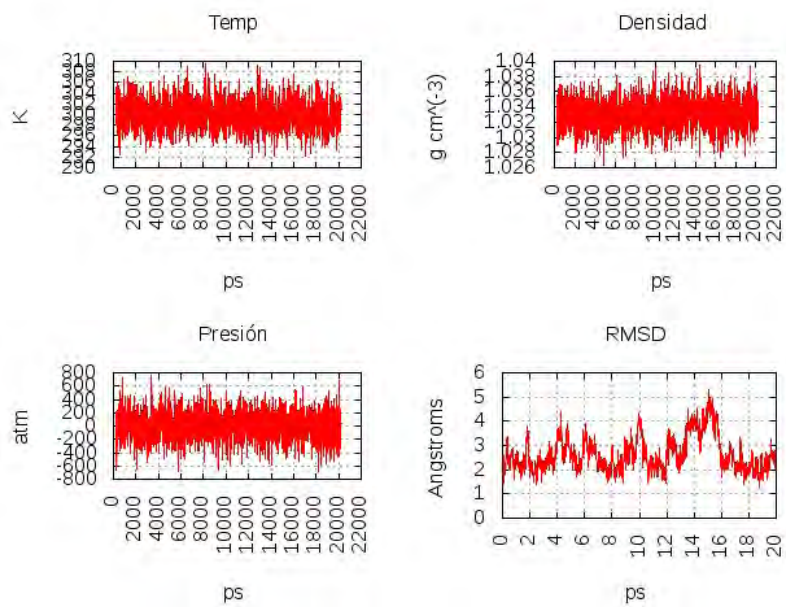
Figura B.2: poly(AA)₂-pos2Figura B.3: poly(AA)₂-sm

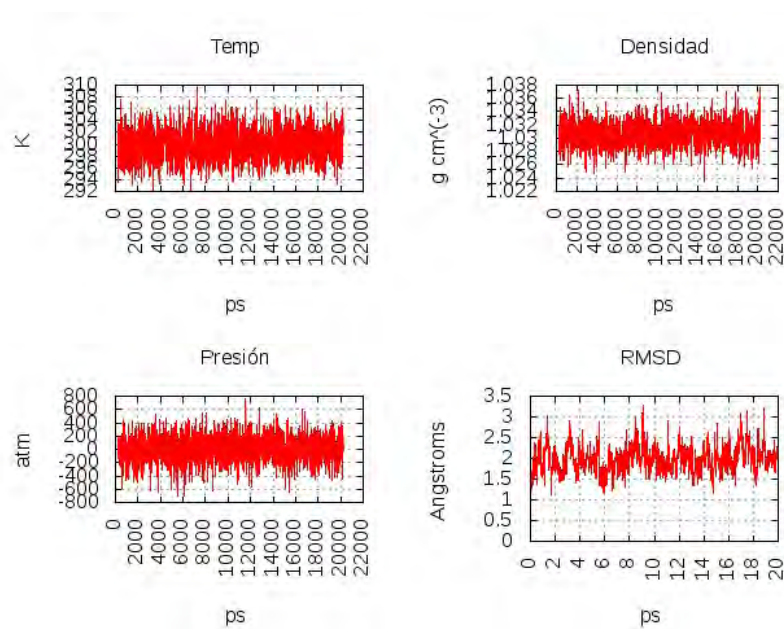
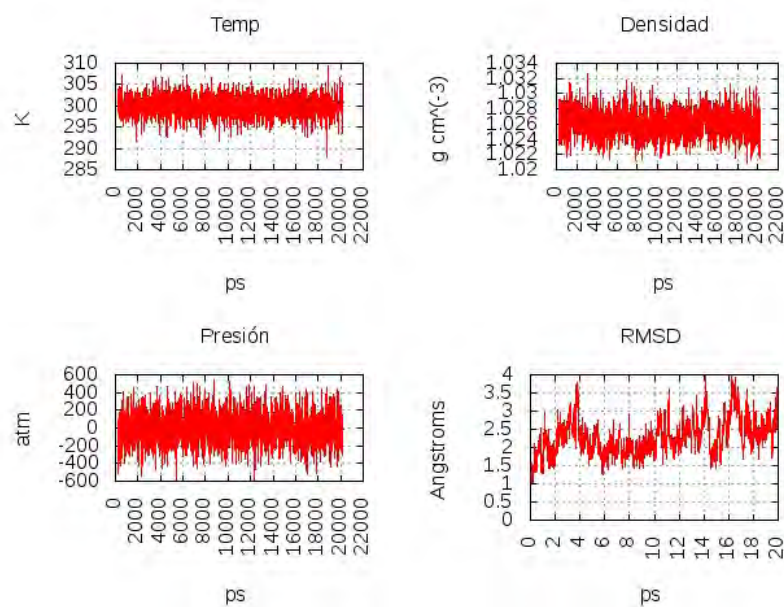
Figura B.4: poly(AA)₂-sFigura B.5: poly(AT)₂-pos1

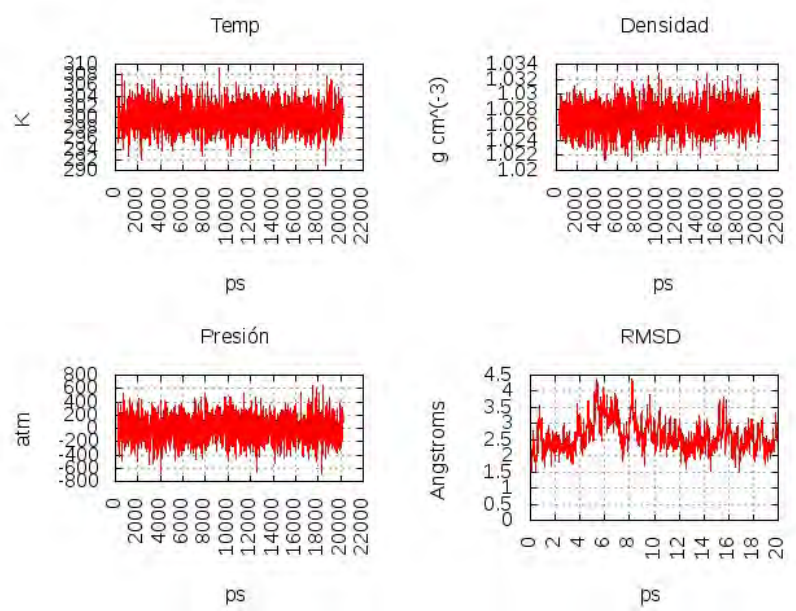
Figura B.6: poly(AT)₂-pos2Figura B.7: poly(AT)₂-sm

Figura B.8: poly(AT)₂-sFigura B.9: poly(GG)₂-pos1

Figura B.10: poly(GG)₂-pos2Figura B.11: poly(GG)₂-sm

Figura B.12: poly(GG)_{2-s}Figura B.13: poly(GC)_{2-pos1}

Figura B.14: poly(GC)₂-pos2Figura B.15: poly(GC)₂-sm

Figura B.16: poly(GC)₂-s

Bibliografía

- [1] M. J. Waring. DNA modification and cancer. *Annual review of biochemistry*, 50:159–92, January 1981.
- [2] H. Pitot. *Fundamentals of Oncology*. Informa Healthcare, 4th edition, 2002.
- [3] J. Rigandy and S. P. Klesney, editors. *International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature of Organic Chemistry*. Pergamon Press, Oxford, 1979.
- [4] R. Taylor and O. Kennard. The molecular structures of nucleosides and nucleotides: Part 1. The influence of protonation on the geometries of nucleic acid constituents. *Journal of Molecular Structure*, 178:1–28, 1982.
- [5] R. Langridge, H. R. Wilson, and C. W. Hooper. The molecular configuration of deoxyribonucleic acid:: I. X-ray diffraction study of a crystalline form of the lithium salt. *Journal of Molecular Biology*, 2(1):19–37, 1960.
- [6] R. Langridge, D. A. Marvin, W. E. Seeds, H. R. Wilson, C. W. Hooper, M. H. Wilkins, and L. D. Hamilton. The Molecular Configuration of Deoxyribonucleic Acid II . Molecular Models and their Fourier Transforms. *Journal of Molecular Biology*, 2(1):38–62, 1960.
- [7] W. Fuller, W. H. F. Wilkins, H. R. Wilson, and L. D. Hamilton. The Molecular Configuration of Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Molecular Biology*, 12(1):60–80, 1965.

- [8] S. Arnott, S. D. Dover, and A. J. Wonacott. Least-squares refinement of the crystal and molecular structures of DNA and RNA from X-ray data and standard bond lengths and angles. *Acta Crystallographica*, B25:2192–2206, 1967.
- [9] S. Arnott and D. W. Hukins. Optimized parameters for A and B DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 47(6):1504–1510, 1972.
- [10] M. Leng. *Structure, Dynamics, Interactions and Evolution of Biological Macromolecules*. Dordrecht, Reidel, 1983.
- [11] R. E. Franklin and R. G. Gosling. The structure of sodium thymonucleate fibres. I. The influence of water content. *Acta Crystallographica*, 6:673–677, 1953.
- [12] R. V. Gessner, C. A. Frederick, G. J. Quigley, A. Rich, and A. H.-J. Wang. The molecular structure of the left-handed Z-DNA double helix at 1.0-Å atomic resolution. Geometry, conformation, and ionic interactions of d(CGCGCG). *Journal of Biological Chemistry*, 264(14):7921–7935, 1989.
- [13] A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. A. Van Der Marel, and A. Rich. Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature*, 282(5740):680–686, December 1979.
- [14] L. S. Lerman. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology*, 3(1):18–30, February 1961.
- [15] N. J. Pritchard, A. Blake, and A. R. Peacocke. Modified Intercalation Model for the Interaction of Amino Acridines and DNA. *Nature*, 212(5068):1360–1361, December 1966.
- [16] S. Neidle, A. Achari, G. L. Taylor, H. M. Berman, H. L. Carrell, J. P. Glusker, and W. C. Stallings. Structure of a dinucleoside phosphate-drug complex as model for nucleic acid-drug interaction. 269(5626):304–307, September 1977.
- [17] A. Andreoni, L. A. Sacchi, and O. Svelto. Structure studies on biological molecules via laser-induced fluorescence: Acridine-DNA complexes.

- In C. D. Moor, editor, *Chemical and Biochemical Applications of Lasers*, page 7. Academic Press, 1979.
- [18] M. J. Waring. Complex formation with DNA and inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase by ethidium bromide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 87:358–361, 1964.
- [19] J. Atwell, W. Leupin, J. Twigden, and W. Denny. Triacridine derivative: first DNA tris-intercalating ligand. *Journal of the American Chemical Society*, 105(9):2913–2914, May 1983.
- [20] C. Bailly and J. B. Chaires. Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues. *Bioconjugate chemistry*, 9(5):513–38, January 1998.
- [21] M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, and R. E. Dickerson. The Molecular Origin of DNA-Drug Specificity in Netropsin and Distamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(5):1376–1380, 1985.
- [22] D. Goodsell, M. L. Kopka, and R. E. Dickerson. Refinement of Netropsin Bound to DNA: Bias and Feedback in Electron Density Map Interpretation. *Biochemistry*, 34(15):4983–4993, 1995.
- [23] M. Coll, C. A. Frederick, A. H.-J. Wang, and A. Rich. A Bifurcated Hydrogen-Bonded Conformation in the d(A{middle dot} T) Base Pairs of the DNA Dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and Its Complex with Distamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23):8385–8389, December 1987.
- [24] M. Coll, J. Aymami, G. A. Van Der Marel, J. H. Van Boom, A. Rich, and A. H.-J. Wang. Molecular structure of the netropsin-d(CGCGATATCGCG) complex: DNA conformation in an alternating AT segment. *Biochemistry*, 28(1):310–320, 1989.
- [25] M. Sriram, G. A. Van Der Marel, H. L. P. F. Roelen, J. H. van Boom, and A. H.-J. Wang. Structural consequences of a carcinogenic alkylation lesion on DNA: Effect of O6-ethylguanine [e6G] on the molecular structure of d(CGCG[e6G]AATTCGCG)-netropsin complex. *Biochemistry*, 31(47):11823–11834, 1992.

- [26] B. Wellenzohn, R. H. Winger, A. Hallbrucker, E. Mayer, and K. R. Liedl. Simulation of EcoRI Dodecamer Netropsin Complex Confirms Class I Complexation Mode. *Journal of the American Chemical Society*, 122(16):3927–3931, April 2000.
- [27] J. G. Pelton and D. E. Wemmer. Structural modeling of the distamycin A-d(CGCGAATTCGCG)₂ complex using 2D NMR and molecular mechanics. *Biochemistry*, 27(21):8088–8096, 1988.
- [28] J. G. Pelton and D. E. Wemmer. Structural Characterization of a 2:1 Distamycin A-d(CGCAAATTGGC) Complex by Two-Dimensional NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(15):5723–5727, 1989.
- [29] X. Chen, B. Ramakrishnan, and M. Sundaralingam. Crystal structures of the side-by-side binding of distamycin to AT-containing DNA octamers d(ICITACIC) and d(ICATATIC). *Journal of Molecular Biology*, 267(5):1157–70, April 1997.
- [30] P. B. Dervan. Design of sequence-specific DNA-binding molecules. *Science*, 232(4749):464–471, April 1986.
- [31] R. S. Youngquist and P. B. Dervan. Sequence-Specific Recognition of B-DNA by Oligo(N-methylpyrrolecarboxamide)s. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(9):2565–2569, May 1985.
- [32] B. H. Geierstanger, J. P. Jacobsen, M. Mrksich, P. B. Dervan, and D. E. Wemmer. Structural and Dynamic Characterization of the Heterodimeric and Homodimeric Complexes of Distamycin and 1-Methylimidazole-2-carboxamide-netropsin Bound to the Minor Groove of DNA. *Biochemistry*, 33(10):3055–3062, March 1994.
- [33] S. Streltsov, A. Sukhanova, A. Mikheikin, S. Grokhovsky, A. Zhuze, I. Kudelina, K. Mochalov, V. Oleinikov, J. Jardillier, and I. Nabiev. Structural Basis of Topotecan–DNA Recognition Probed by Flow Linear Dichroism, Circular Dichroism, and Raman Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(39):9643–9652, October 2001.
- [34] D. J. Patel, A. Pardi, and K. Itakura. DNA conformation, dynamics, and interactions in solution. *Science*, 216(4546):581–590, May 1982.

- [35] D. J. Patel. Mutual Interaction between Adjacent dG{middle dot} dC Actinomycin Binding Sites and dA{middle dot} dT Netropsin Binding Sites on the Self-Complementary d(C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G) Duplex in Solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12):7281–7284, December 1981.
- [36] C. Bourdouxhe-Housiaux, P. Colson, C. Houssier, M. J. Waring, and C. Bailly. Interaction of a DNA-threading netropsin-amsacrine complex with DNA and chromatin. *Biochemistry*, 35(14):4251–64, April 1996.
- [37] C. G. Chidester, W. C. Krueger, S. A. Mizensak, D. J. Duchamp, and D. G. Martin. The structure of CC-1065, a potent antitumor agent and its binding to DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 103(25):7629–7635, December 1981.
- [38] C. H. Lin and D. J. Patel. Solution Structure of the Covalent Duocarmycin A-DNA Duplex Complex. *Journal of Molecular Biology*, 248(1):162–179, 1995.
- [39] F. C. Seaman and L. Hurley. Interstrand cross-linking by bizelesin produces a Watson-Crick to Hoogsteen base-pairing transition region in d(CGTAATTACG)₂. *Biochemistry*, 32(47):12577–12585, November 1993.
- [40] H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, and Y. Okami. New antibiotics, bleomycin A and B. *Journal of Antibiotics*, 19(5):200–209, September 1966.
- [41] J. Stubbe, J. W. Kozarich, W. Wu, and D. E. Vanderwall. Bleomycins: A Structural Model for Specificity, Binding, and Double Strand Cleavage. *Accounts of Chemical Research*, 29(7):322–330, January 1996.
- [42] S. M. Hecht. RNA Degradation by Bleomycin, a Naturally Occurring Bioconjugate. *Bioconjugate Chemistry*, 5(6):513–526, November 1994.
- [43] D. H. Petering, R. Byrnes, and W. Antholine. The role of redox-active metals in the mechanism of action of bleomycin. *Chemico-Biological Interactions*, 73(2-3):133–182, 1990.

- [44] K. C. Nicolaou. Chemistry and Biology of Natural and Designed Eneidyne. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13):5881–5888, July 1993.
- [45] A. L. Smith and K. C. Nicolaou. The enediyne antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39(11):2103–17, May 1996.
- [46] R. A. Kumar, N. Ikemoto, and D. J. Patel. Solution structure of the esperamicin A1-DNA complex. *Journal of Molecular Biology*, 265(2):173–86, January 1997.
- [47] B. Rosenberg, L. Van Camp, and T. Krigas. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, 205(4972):698–699, February 1965.
- [48] E. Frieden and J. Alles. Subtle interactions of cupric ions with nucleic acid components. *Journal of Biological Chemistry*, 230:797–804, 1958.
- [49] G. L. Eichhorn and Y. A. Shin. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *Journal of the American Chemical Society*, 90(26):7323–7328, December 1968.
- [50] G. S. Manning. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 11(02):179–246, May 1978.
- [51] H Strehlow. *Rapid Reactions in Solution*. VCH, Weinheim, 1992.
- [52] K. W. Kohn, J. A. Hartley, and W. B. Mattes. Mechanisms of DNA sequence selective alkylation of guanine-N7 positions by nitrogen mustards. *Nucleic Acids Research*, 15(24):10531–10549, December 1987.
- [53] V. Monjardet-Bas, M. A. Elizondo-Riojas, J. C. Chottard, and J. Kozelka. A Combined Effect of Molecular Electrostatic Potential and N7 Accessibility Explains Sequence-Dependent Binding of $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ to DNA Duplexes We are indebted to Johnson-Matthey, Inc. for a generous loan of cisplatin. Computer time from the IDR. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(16):2998, August 2002.

- [54] E. Sherman and S. J. Lippard. Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA. *Chemical Reviews*, 87(5):1153–1181, October 1987.
- [55] T. Hambley. What Can Be Learnt from Computer-Generated Models of Interactions Between DNA and Pt(II) Based Anti-Cancer Drugs? *Comments on Inorganic Chemistry*, 14(1):1–26, 1992.
- [56] S. Sherman, D. Gibson, A. H.-J. Wang, and S. J. Lippard. X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt(NH₃)₂(d(pGpG))]. *Science*, 230(4724):412–417, October 1985.
- [57] S. Sherman, D. Gibson, A. H.-J. Wang, and S. J. Lippard. Crystal and molecular structure of cis-, the principal adduct formed by cis-diamminedichloroplatinum (II) with DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 110(22):7368–7381, October 1988.
- [58] A. Hotze, E. van Der Geer, S. A. Caspers, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot, and J. Reedijk. Coordination of 9-ethylguanine to the mixed-ligand compound alpha-[Ru(azpy)(bpy)Cl₂] (azpy = 2-phenylazopyridine and bpy = 2,2'-bipyridine). An unprecedented ligand positional shift, correlated to the cytotoxicity of this type of [RuL₂Cl₂] (with L = azpy. *Inorganic chemistry*, 43(16):4935–43, August 2004.
- [59] A. H. Velders, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot, D. de Vos, and J. Reedijk. Strong Differences in the in Vitro Cytotoxicity of Three Isomeric Dichlorobis(2-phenylazopyridine)ruthenium(II) Complexes. *Inorganic Chemistry*, 39(14):2966–2967, July 2000.
- [60] P. Vanvliet, S. Toekimin, J. G. Haasnoot, J. Reedijk, O. Novakoa, O. Vrana, and V. Brabec. -[Ru(terpy)Cl] (terpy = 2,2':6',2'-terpyridine) shows biological activity, forms interstrand cross-links in DNA and binds two guanine derivatives in a configuration. *Inorganica Chimica Acta*, 231(1-2):57–64, March 1995.
- [61] H. L. Chan, H. Q. Liu, B. C. Tzeng, Y. S. You, S. M. Peng, M. Yang, and C. M. Che. Syntheses of Ruthenium(II) Quinonediimine Complexes of Cyclam and Characterization of Their DNA-Binding Activities and Cytotoxicity. *Inorganic Chemistry*, 41(12):3161–3171, June 2002.

- [62] F. Pruchnik. Rhodium(III) complexes with polypyridyls and pyrazole and their antitumor activity. *Inorganica Chimica Acta*, 334:59–66, May 2002.
- [63] Li. Changzheng, Wu. Jigui, W. Liufang, R. Min, J. Naiyong, and G. Jie. Synthesis, characterization and antitumor activity of copper(II) complex with nicotinamido-4-bis(2-chloroethyl)aminobenzaldimine. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 73(4):195–202, April 1999.
- [64] E. Chruscinska. L-Mimosine, an amino acid with maltol-type binding properties toward copper(II), oxovanadium(IV) and other metal ions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 75(3):225–232, June 1999.
- [65] J. H. Murray and M. M. Harding. Organometallic Anticancer Agents: The Effect of the Central Metal and Halide Ligands on the Interaction of Metallocene Dihalides Cp₂MX₂ with Nucleic Acid Constituents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37(13):1936–1941, June 1994.
- [66] P. Calamai, S. Carotti, A. Guerri, L. Mazzei, T. Messori, E. Mini, P. Orioli, and G. P. Speroni. Cytotoxic effects of gold(III) complexes on established human tumor cell lines sensitive and resistant to cisplatin. *Anti-Cancer Drug Design*, 13:67–80, 1998.
- [67] A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, L. Ruiz-Ramirez, G. E. N. Kass, L. R. Kelland, R. M. Orr, and M. Dobrota. Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, Casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology in Vitro*, 14(1):5–1, 2000.
- [68] L. Hernández-Esquivel, A. Marín-Hernández, N. Pavón, K. Carvajal, and R. Moreno-Sánchez. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212(1):79–88, April 2006.
- [69] A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, L. Ruiz-Ramirez, J. A. Howarth, and M. Dobrota. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. *Toxicology*, 194(1-2):103–113, December 2003.

- [70] M. E. Bravo-Gómez, J. C. García-Ramos, I. Gracia-Mora, and L. Ruíz-Azuara. Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acetylacetonato})]\text{NO}_3$ and $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{glycinato})]\text{NO}_3$ complexes, (Casiopeínas). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(2):299–309, February 2009.
- [71] J. Serment-Guerrero, P. Cano-Sanchez, E. Reyes-Perez, F. Velazquez-Garcia, M. E. Bravo-Gómez, and L. Ruíz-Azuara. Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopieinas®. *Toxicology in Vitro*, May 2011.
- [72] R. Alemón-Medina, J. L. Muñoz Sánchez, L. Ruíz-Azuara, and I. Gracia-Mora. Casiopeína IIgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicology in Vitro*, 22(3):710–5, April 2008.
- [73] M. Chikira. DNA-fiber EPR spectroscopy as a tool to study DNA-metal complex interactions: DNA binding of hydrated Cu(II) ions and Cu(II) complexes of amino acids and peptides. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(5-6):1016–24, 2008.
- [74] T. Hirohama, Y. Kuranuki, E. Ebina, T. Sugizaki, H. Arii, M. Chikira, P. Tamil Selvi, and M. Palaniandavar. Copper(II) complexes of 1,10-phenanthroline-derived ligands: studies on DNA binding properties and nuclease activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(5):1205–19, May 2005.
- [75] N. Dixit, R. K. Koiri, B. K. Maurya, S. K. Trigun, C. Höbartner, and L. Mishra. One pot synthesis of Cu(II) 2,2'-bipyridyl complexes of 5-hydroxy-hydurilic acid and alloxanic acid: synthesis, crystal structure, chemical nuclease activity and cytotoxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(2):256–67, February 2011.
- [76] R. Nagane, T. Koshigoe, and M. Chikira. Interaction of Cu(II)-Arg-Gly-His-Xaa metallopeptides with DNA: effect of C-terminal residues, Leu and Glu. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 93(3-4):204–212, January 2003.
- [77] N. L. Allinger. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *Journal of the American Chemical Society*, 99(25):8127–8134, December 1977.

- [78] N. L. Allinger, Y. H. Yuh, and J.-H. Lii. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1. *Journal of the American Chemical Society*, 111(23):8551–8566, November 1989.
- [79] N. L. Allinger, K. Chen, and J.-H. Lii. An improved force field (MM4) for saturated hydrocarbons. *Journal of Computational Chemistry*, 17(5-6):642–668, April 1996.
- [80] M. Clark, R. D. Cramer, and N. Van Opdenbosch. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. *Journal of Computational Chemistry*, 10(8):982–1012, December 1989.
- [81] T. A. Halgren. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, 17(5-6):490–519, April 1996.
- [82] A. K. Rappe, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard, and W. M. Skiff. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 114(25):10024–10035, December 1992.
- [83] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case. Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry*, 25(9):1157–74, July 2004.
- [84] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, and P. A. Kollman. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 117(19):5179–5197, May 1995.
- [85] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 4(2):187–217, January 1983.
- [86] J. Hermans, H. J. C. Berendsen, W. F. Van Gunsteren, and J. P. M. Postma. A consistent empirical potential for water-protein interactions. *Biopolymers*, 23(8):1513–1518, August 1984.

- [87] W. Damm, A. Frontera, J. Tirado-Rives, and W. L. Jorgensen. OPLS all-atom force field for carbohydrates. *Journal of Computational Chemistry*, 18(16):1955–1970, December 1997.
- [88] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, and C. Simmerling. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins.*, 65(3):712–25, November 2006.
- [89] A. R. Leach. Molecular Dynamics Simulation Methods. In *Molecular Modelling. Principles and Applications.*, chapter 6, pages 303–409. Prentice Hall, Great Britain, 2001.
- [90] W. C. Swope. A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *Journal of Chemical Physics*, 76(1):637, 1982.
- [91] C. W. Gear. *Numerical Initial Value Problems in Ordinary Differential Equations.* Prentice Hall, 1971.
- [92] J. Srinivasan, T. E. III Cheatham, P. Cieplak, P. A. Kollman, and D. A. Case. Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate–DNA Helices. *Journal of the American Chemical Society*, 120(37):9401–9409, September 1998.
- [93] J. Boren, A. R. Montoya, P. de Atauri, B. Comin-Anduix, A. Cortes, J. J. Centelles, W. M. Frederiks, C. J. F. Van Noorden, and M. Cascante. Metabolic Control Analysis Aimed at the Ribose Synthesis Pathways of Tumor Cells: A New Strategy for Antitumor Drug Development. *Molecular Biology Reports*, 29(1):7–12–12, 2002.
- [94] S. Weerasinghe, P. E. Smith, V. Mohan, Y.-K. Cheng, and B. M. Pettitt. Nanosecond Dynamics and Structure of a Model DNA Triple Helix in Saltwater Solution. *Journal of the American Chemical Society*, 117(8):2147–2158, March 1995.
- [95] D. A. Zichi. Molecular Dynamics of RNA with the OPLS Force Field. Aqueous Simulation of a Hairpin Containing a Tetranucleotide Loop. *Journal of the American Chemical Society*, 117(11):2957–2969, March 1995.

- [96] T. E. III Cheatham, J. L. Miller, T. Fox, T. A. Darden, and P. A. Kollman. Molecular Dynamics Simulations on Solvated Biomolecular Systems: The Particle Mesh Ewald Method Leads to Stable Trajectories of DNA, RNA, and Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 117(14):4193–4194, April 1995.
- [97] T. A. Darden, D. York, and L. Pedersen. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics*, 98(12):10089, 1993.
- [98] A. N. Lane, T. C. Jenkins, T. Brown, and S. Neidle. Interaction of berenil with the EcoRI dodecamer d(CGCGAATTCGCG)₂ in solution studied by NMR. *Biochemistry*, 30(5):1372–1385, February 1991.
- [99] T. E. III Cheatham, P. Cieplak, and P. A. Kollman. A modified version of the Cornell et al. force field with improved sugar pucker phases and helical repeat. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 16(4):845–62, February 1999.
- [100] Y. Zhao and D. G. Truhlar. Density functionals with broad applicability in chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 41(2):157–67, February 2008.
- [101] Y. Zhao and D. G. Truhlar. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function. *Theoretical Chemistry Accounts*, 120(1-3):215–241, July 2007.
- [102] R. F. W. Bader. *Atoms In Molecules: A Quantum Theory (International Series Of Monographs On Chemistry)*. Oxford University Press, USA, 1st edition, 1994.
- [103] Y. Zhao and D. G. Truhlar. Density Functionals for Noncovalent Interaction Energies of Biological Importance. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 3(1):289–300, January 2007.
- [104] B. M. Wong. Noncovalent interactions in supramolecular complexes: a study on corannulene and the double concave buckycatcher. *Journal of Computational Chemistry*, 30(1):51–6, January 2009.

- [105] E. G. Hohenstein, S. T. Chill, and C. D. Sherrill. Assessment of the Performance of the M05–2X and M06–2X Exchange–Correlation Functionals for Noncovalent Interactions in Biomolecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(12):1996–2000, December 2008.
- [106] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Menucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople. Gaussian 09, Revision A.1. *Gaussian Inc.*, 2009.
- [107] T. A. Keith. AIMAll (Versión 08.05.04), 2008.
- [108] L. Estévez, N. Otero, and R. Mosquera. Computational study on the stacking interaction in catechol complexes. *Journal of Physical Chemistry A*, 113(41):11051–8, October 2009.
- [109] T. Macke and D. A. Case. Modeling unusual nucleic acid structures. In N. B. Leontes and J. Jr. SantaLucia, editors, *Molecular Modeling of Nucleic Acids*, pages 379–393. Washington, DC, 1998.
- [110] Accelrys Software Inc. DS Visualizer, 2009.
- [111] J. Aqvist. Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations. *Journal of Physical Chemistry*, 94(21):8021–8024, October 1990.

- [112] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*, 79(2):926, 1983.
- [113] R. C. Rizzo, T. Aynechi, D. A. Case, and I. D. Kuntz. Estimation of Absolute Free Energies of Hydration Using Continuum Methods: Accuracy of Partial Charge Models and Optimization of Nonpolar Contributions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2(1):128–139, January 2006.
- [114] C Satheesan Babu and Carmay Lim. Empirical force fields for biologically active divalent metal cations in water. *The journal of physical chemistry. A*, 110(2):691–9, January 2006.
- [115] T. Hermann and H. Heumann. Determination of nucleotide distances in RNA by means of copper phenanthroline-generated hydroxyl radical cleavage pattern. *RNA*, 1(10):1009–1017, December 1995.
- [116] T. P. Lybrand, S. C. Brown, S. Creighton, R. H. Shafer, and P. A. Kollman. Computer modeling of actinomycin D interactions with double-helical DNA. *Journal of Molecular Biology*, 191(3):495–507, October 1986.
- [117] J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, and D. A. Case. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 25(2):247–60, October 2006.
- [118] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23:327–341, 1977.
- [119] Curves. Curves+, 2009.
- [120] A. Robertazzi, A. V. Vargiu, A. Magistrato, P. Ruggerone, P. Carloni, P. de Hoog, and J. Reedijk. Copper-1,10-phenanthroline complexes binding to DNA: structural predictions from molecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(31):10881–90, August 2009.

- [121] C. T. Liu, A. Neverov, C. I. Maxwell, and R. S. Brown. Demonstration of prominent Cu(II)-promoted leaving group stabilization of the cleavage of a homologous set of phosphate mono-, di-, and triesters in methanol. *Journal of the American Chemical Society*, 132(10):3561–73, March 2010.

Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 14510–14515

www.rsc.org/pccp

PAPER

π -Stacking between Casiopeínas[®] and DNA bases[†]

Rodrigo Galindo-Murillo,^a Joseelyne Hernandez-Lima,^a Mayra González-Rendón,^a
Fernando Cortés-Guzmán,^{*ab} Lena Ruíz-Azuara^c and Rafael Moreno-Esparza^c

Received 20th January 2011, Accepted 19th May 2011

DOI: 10.1039/c1cp20183b

Casiopeínas[®] are copper complexes with the general formula [Cu(N–N)(N–O)]NO₃ and [Cu(N–N)(O–O)]NO₃ where N–N denotes a substituted bipyridine or phenanthroline, N–O indicates α -aminoacidate or peptide and O–O represents acetylacetonate or salicylaldehyde. This family of compounds has been evaluated *in vitro* and *in vivo* showing cytotoxic, genotoxic, and antineoplastic activity. The action mechanism is still not completely elucidated, but the possibility exists that these compounds interact with DNA by intercalation due to the aromatic moiety. In this work we found, using the properties of the electron density of a π -complex model base–Casiopeína[®]–base, that the stacking mechanism between Casiopeínas[®] and DNA bases is due to an electron density deficiency of the ligand of the Casiopeína[®] which is compensated for by an electron transfer from adenines by a π – π interaction.

Introduction

In the last few decades, metal complexes have gained a growing interest as diagnostic agents and chemotherapeutic drugs. One of the main tasks is to develop molecules with less toxicity and more activity compared with known anticancer compounds. Several complexes with a metal center different from platinum have been proved.^{1,2}

Copper is an essential trace element, important for the function of several enzymes involved in energy metabolism, respiration and DNA synthesis in the cell.³ The major functions of biologically active copper compounds involve redox reactions in which copper reacts directly with molecular oxygen or hydrogen peroxide to produce free radicals.⁴ Copper toxicity comes from its ability to produce reactive oxygen species (ROS), to displace other metal ions, peroxidase lipids and directly cleave DNA and RNA.⁵ All these properties were developed in the design of copper(II) coordination compounds recorded and patented under the name Casiopeínas[®].⁶ The general formulae of these complexes are [Cu(N–N)(N–O)]NO₃ and [Cu(N–N)(O–O)]NO₃ where N–N denotes a substituted bipyridine or phenanthroline, N–O indicates α -aminoacidate or peptide and O–O represents acetylacetonate or salicylaldehyde. Two compounds of this family [Cu(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(acetylacetonato)]NO₃ (Casiopeína[®] III-ia) and

[Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)]NO₃ (Casiopeína[®] II-gly) have been evaluated *in vitro* and *in vivo* showing cytotoxic,³ genotoxic,⁷ and antineoplastic⁸ activity.

The action mechanism is still not completely elucidated. However, there is evidence that supports the idea that these compounds are able to inhibit cell proliferation and produce cell dose-dependent death by apoptosis through mechanisms dependent and independent of caspase activation.⁹ The apoptosis observed might be the result of several processes like generation of ROS⁵ or mitochondrial toxicity,¹⁰ that can act alone or in concomitance. Furthermore, experimental data shows that these compounds interact with DNA. Chikira *et al.* found, using EPR studies, that mono(1,10-phenanthroline)-copper(II) and ternary complexes with amino acids bind to DNA with several different binding modes.¹¹ Rivero-Müller *et al.* found that Casiopeínas[®] bind to DNA and degrade DNA and RNA in the presence of reducing agents.⁴ It is possible that the Casiopeína[®] interacts with DNA by stacking due to the planar moiety corresponding to the diimine or the acetylacetonate moiety. The aim of this paper is to study the stacking mechanism between Casiopeínas[®] and DNA bases, based on the properties of the electron density of a π -complex model, base–Casiopeína[®]–base.

The π – π interactions are important to understand the behaviour of several chemical and biochemical systems.¹² Most of the theoretical work about the π – π interaction has developed around the benzene dimer, which presents three arrangements: T-shaped; displaced parallel and face to face forms.^{13,14} In the displaced parallel form, a region of negative electrostatic potential on the face of one ring is oriented towards a positive region of the other ring.¹⁵ It is generally accepted that the stabilization of the benzene dimer is due to electrostatic, exchange and dispersion contributions.¹⁶

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México. E-mail: fercor@servidor.unam.mx

^b Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM, Carretera Toluca-Atzacmulco km 14.5, Toluca, México, 50200

^c Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

[†] Electronic supplementary information (ESI) available: See DOI: 10.1039/c1cp20183b

CCSD(T) is the best *ab initio* method to reproduce the potential energy surfaces of complexes stabilized by π - π interactions.¹⁶ DFT methods are generally deficient in the calculation of the interaction energy of these kinds of complexes,¹⁷ but recently new functionals have been developed which give good results in the description of stacking interactions.¹⁸

To find the origin of stabilization of π - π complexes some studies of local and integrated properties of electron density, $\rho(r)$, have been performed.^{19–21} Zhikol *et al.* studied the topology of electron density, of ten conformers of the benzene dimer, finding bond paths (BP) between the rings. The number of BPs changes from 12 to 1 depending on the dimer conformation.²² In all cases, cage critical points (CCP) are presented in the molecular graph (MG) of the dimer due to the interaction of the ring critical point (RCP) of each benzene ring. Zhikol *et al.* obtained empirical relationships between interaction energies and the CCP properties, as $\rho(r)$ and its laplacian, $\nabla^2\rho(r)$. Mosquera *et al.*²³ studied the properties of electron density of the benzoquinone–hydroquinone complex, which presents four BPs and an electron transfer of 0.046 e from the hydroquinone to quinone. Alkorta *et al.* evaluated the π - π stacking by presence of bond critical points between the atoms of the aromatic rings in the *syn* conformed substituted 3,3-dimethyl-1,10-diphenyl-5,50-bis-1*H*-pyrazoles.²⁴

In the case of stacking DNA interactions, the Hobza group has carried out several important studies about the stability of the π complexes.²⁵ Matta *et al.*²⁶ studied the properties of electron density of a CGCGAA TTCGCG dodecamer, from crystallographic geometries. They showed that π - π stacking between bases is the result of a set of closed shell weak interactions between neighbouring bases, where the DNA polymer can be visualised as a cylinder of electron density. Platts *et al.*²⁷ performed an ONIOM calculation of trinucleotides to study the stacking between bases, classifying π - π interactions and the hydrogen bonds for each base in DNA.

Computational methods

The geometries of the base–Casiopéina[®]–base complexes were optimized at the M05-2x/LANL2dZ level of theory.¹⁸ The M05-2x functional has been tested several times proving its reliability and significant improvements over traditional density functionals for the stacking interactions between biological and non-biological molecules.^{28,29} Recently Jeanvoine and Spezia found that the role of non-local Hartree–Fock exchange is crucial to describe Cu²⁺ complexes and M05-2x is the functional with better agreement with experiments and CCSD(T) calculations.³⁰ The functional proves to be reliable when describing stacking interactions and copper interactions. This was verified by comparing the geometries of the crystal and calculated structures. The stacking mean difference was 0.10 Å whereas the copper–ligand mean difference was 0.03 Å. The largest difference for stacking distances was 0.16 Å and the smallest was 0.02 Å, for metal–ligand distances it was 0.03 Å and 0.02 Å respectively. For electronic density analysis, a single point calculation with an all electron basis set was made using the optimized geometry of each Casiopéina[®], performed at the M05-2x/6-311++G(2d,2p) level of theory to obtain the respective wave function. All the calculations

were made using the Gaussian 09 program.³¹ The resulting wave functions were used to calculate local and integrated properties of electron density using the AIMAll program.³² The structures of 21 Casiopéinas[®] studied in this work are presented in Table 1.

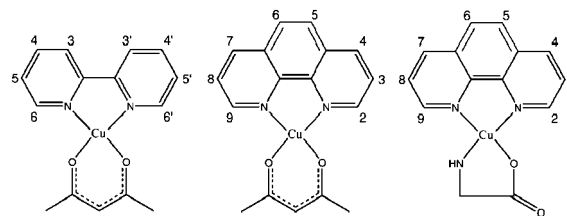


Table 1 Casiopéinas[®] studied in this work

Family	Number	Ligands ^{a,b,c,d}	Substituents
1	01	acac/bip	H
	02	acac/bip	4,4'-diMe
2	03	acac/phen	H
	04	acac/phen	4-Me
	05	acac/phen	5-Me
	06	acac/phen	4,7-diMe
	07	acac/phen	5,6-diMe
	08	acac/phen	3,4,7,8-tetraMe
	09	acac/phen	5-phenyl
	10	acac/phen	4,7-diphenyl
	11	acac/phen	5-Cl
	12	acac/phen	5-NO ₂
3	13	gly/phen	H
	14	gly/phen	4-Me
	15	gly/phen	5-Me
	16	gly/phen	4,7-diMe
	17	gly/phen	5,6-diMe
	18	gly/phen	3,4,7,8-tetraMe
	19	gly/phen	4,7-diphenyl
	20	gly/phen	5-Cl
	21	gly/phen	5-NO ₂

^a bip = bipyridine. ^b acac = acetylacetonate. ^c phen = phenanthroline. ^d gly = glycine.

Results and discussion

Local and integrated properties of the electron density of Casiopéinas[®]

The Casiopéinas[®] are square planar complexes, which present bond distances around 1.9515 Å between the copper cation and the ligands. The shortest and largest distances are presented in the complex 01, Cu–O (1.908 Å) and Cu–N (1.998 Å) respectively. Fig. 1 shows the MG of Casiopéina[®] 01 and 13, where it is possible to observe two BPs between Cu²⁺ and the nitrogen atoms of the aromatic ligands, and two more BPs between Cu²⁺ and the oxygen atoms of the acetylacetonate or oxygen and nitrogen atoms of glycine. The four BPs are characterized by their respective critical points (CP).³³ The CPs around the copper atom have donor–acceptor features, typical of metal–ligand interactions: small $\rho(r)$, $\nabla^2\rho(r) > 0$, $G(r)/\rho(r) \approx 1$ and $H(r)/\rho(r) < 0$.³⁴ In complex 01, the properties of the N–Cu CP are $\rho(r) = 0.087$ a.u., $\nabla^2\rho(r) = 0.367$ a.u., $\varepsilon = 0.018$ a.u. and $H(r) = -0.022$ a.u., whereas the properties of O–Cu CP are $\rho(r) = 0.095$ a.u., $\nabla^2\rho(r) = 0.489$ a.u., $\varepsilon = 0.032$ a.u. and $H(r) = -0.020$ a.u.

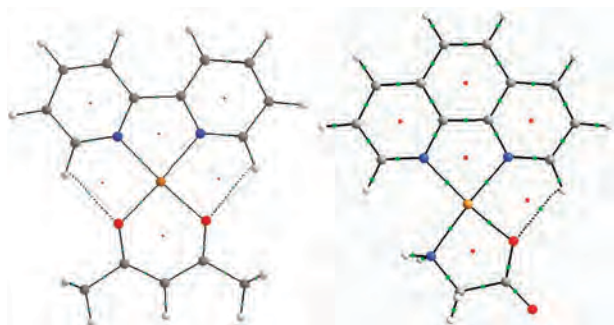


Fig. 1 MG of Casiopeínas[®] 01 and 13.

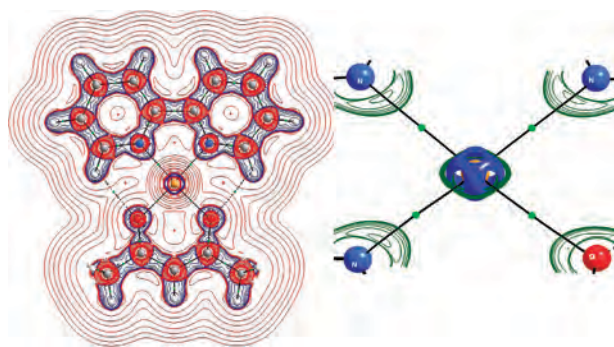


Fig. 2 Contour map of the $\nabla^2\rho(r)$ of complex 01 (left). Isosurface $\nabla^2\rho(r) = -25$ of complex 13, which corresponds to the density concentration pattern of the copper atom and contour maps of the charge concentration of heteroatoms of the ligands, directed toward charge depletion of the metal (right).

The donor–acceptor interactions can be also observed in the laplacian of electron density, $\nabla^2\rho(r)$, of Casiopeínas[®] as shown in Fig. 2. It is possible to observe four charge concentration of the ligand heteroatoms oriented toward the equatorial charge depletion of the metal, which also has two more charge depletion at the axial positions, which allow two more coordination sites in square pyramidal and octahedral geometries.

It is possible to define an atom using the properties of the gradient of electron density of a molecule.¹⁹ The atomic properties can be obtained by integration in the atomic region, where the sum of the properties of certain groups of atoms in a molecule, gives the group properties.³⁵ The atomic electronic populations of each group (N) in the complex were compared with those of the isolated molecules as shown in eqn (1).

$$\Delta N(\text{group}) = N(\text{group@complex}) - N(\text{isolated group}) \quad (1)$$

It is possible to observe an electronic charge donation from ligand to the metal centre. Families one and two present very similar electronic transfer from both ligands, but the glycinate in the third family donates 8.1% (0.063 e) more than acetylacetonate in the other two families. Additionally, the presence of glycinate provokes a small increase of donation from the aromatic ligand of 0.007 e as shown in Fig. 3.

A01A complex

To understand the interactions between the Casiopeínas[®] and bases of the DNA, we use the crystallographic data of the unit

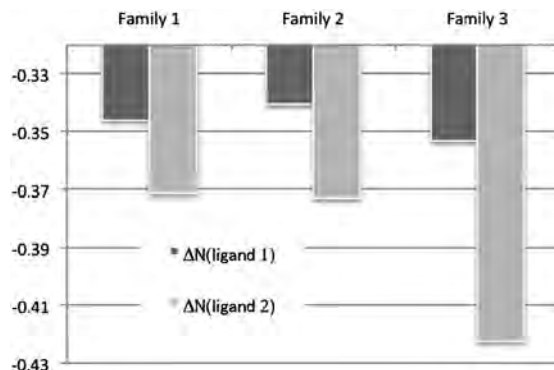


Fig. 3 Average values of the electron charge transfer from the ligand to the copper atoms in the three families of Casiopeínas[®].

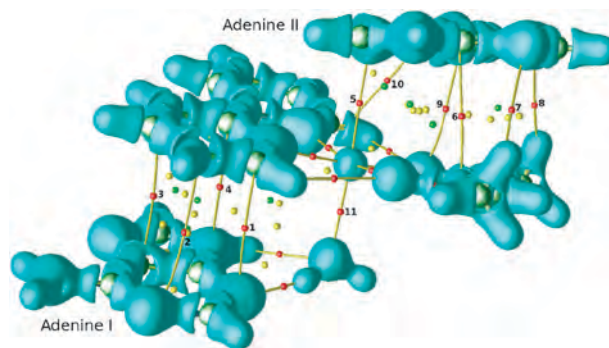


Fig. 4 MG and laplacian envelope ($\nabla^2\rho(r) = -0.2$) of A01A_1 complex (M05-2x/6-311++G(2d,2p)).

cell of a Casiopeína[®]–adenine crystal as the initial geometry.[‡] Each crystal cell shows one adenine (I) in front of the aromatic ligand and the other adenine (II) next to the acetylacetonate ligand of Casiopeína[®] 01 as displayed in Fig. 4. After the optimisation, the metal center shows an octahedral connectivity, binding the bipyridine and acac ligands at the equatorial position and in axial locations an oxygen from the water molecule and a nitrogen atom from adenine II. Distances and Bond Critical Points (BCP) properties of no covalent interactions between Casiopeína[®] 01 and the two adenines are shown in Table 2. The distances of these interactions are between 2.63 and 3.51 Å, in agreement with the reported distances for π – π stacking.³⁶ Average values of the BCP properties are $\rho(r) = 6.82 \times 10^{-3}$, $\nabla^2\rho(r) = 2.31 \times 10^{-2}$, $H(r) = 8.78 \times 10^{-4}$, $G(r)/\rho(r) = 6.94 \times 10^{-1}$ and $H(r)/\rho(r) = 1.40 \times 10^{-1}$. These are common BCP values involved in π – π stacking interactions.³⁷

The laplacian envelope, Fig. 4, shows that the stacking interaction between adenine I and bipyridine is due to the donor acceptor relationship, where the charge density concentrations of adenine I are directed toward charge depletion on the aromatic ligand, whereas adenine II and acetylacetonate present two N···H–C hydrogen bonds and two donor acceptor interactions.

The formation energy of the complex between Casiopeína[®], two adenines and water molecules (A01A) at the m052x/6-311++G(2d,2p) theoretical level is $-27.97 \text{ kcal mol}^{-1}$.

[‡] CCDC 737505

Table 2 Distances and properties of BCP of non-covalent interactions between Casiopeína[®] 01 and two adenines

BCP	Casiopeína [®] atom	Adenine I atom	Adenine II atom	Distance/Å	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$	$G(r)$	$V(r)$	$H(r)$	$G(r)/\rho(r)$	$H(r)/\rho(r)$
1	C	N		3.19	0.0075	0.0242	0.0050	-0.0039	0.0011	0.6607	0.1433
2	C	N		3.51	0.0048	0.0148	0.0030	-0.0022	0.0007	0.6233	0.1541
3	C	C		3.45	0.0060	0.0166	0.0033	-0.0025	0.0008	0.5591	0.1366
4	C	C		3.19	0.0076	0.0254	0.0052	-0.0041	0.0011	0.6861	0.1481
5	Cu		N	2.88	0.0136	0.0445	0.0105	-0.0100	0.0006	0.7773	0.0424
6	C		C	3.19	0.0069	0.0222	0.0045	-0.0034	0.0011	0.6466	0.1553
7	H		N	2.75	0.0066	0.0201	0.0043	-0.0035	0.0008	0.6431	0.1148
8	H		N	2.63	0.0084	0.0256	0.0055	-0.0045	0.0009	0.6513	0.1119
9	O		C	3.23	0.0067	0.0244	0.0050	-0.0038	0.0011	0.7449	0.1693
10	C17		H	2.93	0.0042	0.0142	0.0028	-0.0020	0.0008	0.6676	0.1801
11	Cu1	O(water)		2.23	0.0465	0.1996	0.0563	-0.0626	0.0063	1.2110	0.1366

Two more calculations were performed at this level of theory. Formation energy with just adenine I and the copper complex is $-17.42 \text{ kcal mol}^{-1}$, whereas the value with adenine II is $-11.25 \text{ kcal mol}^{-1}$. The interaction between Casiopeína[®] and adenine I is $6.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ greater than with adenine II. The stabilization energy is related to the exchange of electrons (ΔN) between the members of the complex, given that the molecular energy is a functional of electron density.³⁸

Bipyridine and acetylacetonate take 0.070 e and 0.067 e respectively from Cu and adenines. Adenine I gives 0.076 e, to bipyridine whereas adenine II transfers 0.037 e to acetylacetonate. On the other hand, the copper atom loses 0.035 e, while the water molecule gains 0.018 e. The stacking mechanism between Casiopeína[®], two adenines and one water molecule is based on electron density deficiency of the ligand of Casiopeína[®] which is compensated for by an electron transfer from adenines.

There are three other configurations of A01A beside that found in the crystal (A01A_1 in Fig. 5), depending on the orientation of the adenine molecules and their link site, N3 (pyrimidine moiety) or N7 (imidazole moiety) atoms. As shown in Fig. 5, when adenine II coordinates with the Cu atom by N3 the base prefers a perpendicular arrangement (A01A_2 and A01A_4) whereas a coordination by N7 allows a parallel orientation (A01A_1 and A01A_3). Adenine I is always parallel regardless of which nitrogen atom forms the hydrogen bond with the water molecule. A01A_1 and A01A_3 are $5.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ less stable than A01A_2 and A01A_4 due to the more favourable interaction between Cu and N3 atoms because N3 has a greater basicity than N7.³⁹

AXA complexes

Casiopeínas[®] 01 to 21 were manually inserted between two adenine molecules following the geometries of the original crystal structure. Full optimization was performed and the formation energies were obtained at the M05-2x/6-311++G(2d,2p) level. All AXA complexes show a tendency to group according to the families, the average formation energies for each family are -58.51 , -58.67 and $-61.97 \text{ kcal mol}^{-1}$ respectively. The ones with glycinate have a lower formation energy than those linked to acetylacetonate, $3.34 \text{ kcal mol}^{-1}$ on average. The interaction observed by AXA of families 1 and 2 is different to the one shown by family 3, where adenine II presents perpendicular geometry. Regardless, the

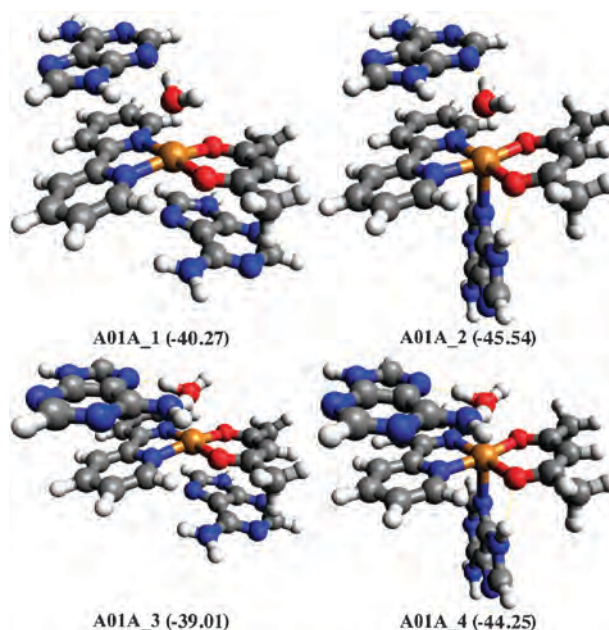


Fig. 5 Configurations of A01A depending on the orientation of the adenine molecules (M05-2x/6-311++G(2d,2p)).

N7 atom is coordinated to the metal. The most stable structure for the second family is the complex A12A and for the third family is A21A, in accordance with having the NO_2 group as a substituent in the aromatic ligand, increasing its electron deficiency, which agrees with the model of electron density deficiency of the ligand compensated by adenine molecules.

To isolate the contribution of the stacking interaction between the aromatic ligand and adenine I from the AXA stabilisation energy, we optimized the systems AX (Adenine I–Casiopeína[®]) and calculated the group electron populations and compared them with their respective population in the isolated molecules (ΔN). From these results it is possible to find a correlation of $R^2 = 0.92$, between the AX complex stabilisation energy and electrons transferred from adenine to the aromatic ligand of Casiopeína[®] as seen in Fig. 6. It is possible to conclude that the greater the electron transfer from adenine I to the aromatic ligand, the more stable the complex AX, following eqn (2).

$$\Delta E_{\text{stabilisation}} = -254.83 \Delta N (\text{adenine I}) - 34.542 \quad (2)$$

§ Number defined by IUPAC nomenclature.

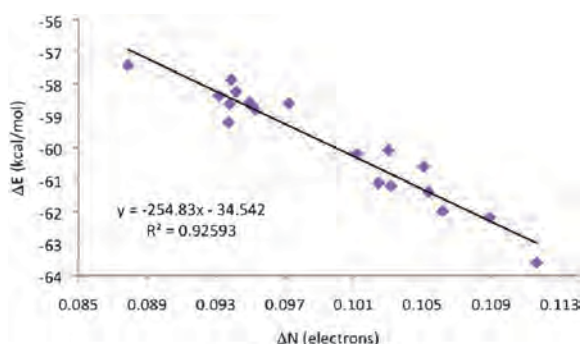


Fig. 6 Correlation between the stabilisation energy of the AX complexes and electrons transferred from adenine I to the aromatic ligand of Casiopeínas[®] (M05-2x/6-311++G(2d,2p)).

X01X complexes

The two adenine molecules in A01A were manually substituted by a pair of three other DNA bases (thymine, guanine and cytosine) to form the X01X complexes, and optimised. There are several arrangements for each X01X but not all exhibit stacking interactions with Casiopeína[®] 01; the two most stable configurations of each complex are shown in Fig. 7. The average stabilisation energy of the X01X complex is $-50.05 \text{ kcal mol}^{-1}$, where the most stable is G01G_1 which has one guanine parallel to the bipyridine with two hydrogen bonds to the water molecule and the other guanine perpendicular, coordinated to the Cu atom by N7. G01G_2 is $6.97 \text{ kcal mol}^{-1}$ less stable with the parallel guanine in the opposite direction with just one hydrogen bond to the water

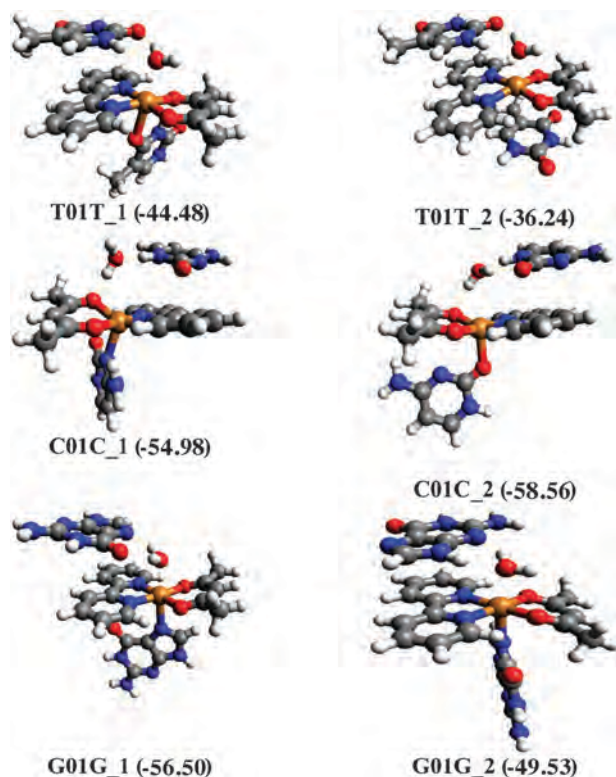


Fig. 7 The two most stable configurations of T01T, C01C and G01G complexes (M05-2x/6-311++G(2d,2p)).

Table 3 Formation energies (kcal mol^{-1}) and orientation of X01X complexes (M05-2x/6-311++G(2d,2p))

Complex X01X	ΔE (kcal mol^{-1})	Base orientation
T01C	-22.53	Parallel-parallel
A01T	-36.93	
A01C	-38.79	
C01G	-53.10	Parallel-perpendicular
A01G	-50.80	
G01G	-49.65	
T01G	-48.82	
C01A	-46.48	
T01A	-41.44	

molecule. The energy difference between the two complexes with cytosine is due to the orientation to the perpendicular base and the atom coordinated to the metal. The more stable thymidine complex, T01T_1, also presents the parallel/perpendicular arrangement of the bases around the Casiopeína[®] with an oxygen atom coordinated to Cu. T01T_2 is $8.23 \text{ kcal mol}^{-1}$ less stable than T01T_1 due to the parallel/parallel orientation of the bases. It seems that the affinity of the Casiopeína[®] to the DNA bases depend on the axial coordination of the base to the copper atom beside the stacking interaction. Based on the more stable configurations, the Casiopeína[®] seems to have the following affinity order to DNA bases: $C > G > A \approx T$.

We also optimized the possible combination between the four bases and Casiopeína[®]. The stabilisation energy of complexes with parallel/parallel and parallel/perpendicular configurations are shown in Table 3. Both bases in structures T01C, A01T, and A01C remain in a parallel configuration. In structures C01G, A01G, G01G, T01G, C01A and T01A, the base interacting with bipyridine is in a parallel orientation whereas the other base is in perpendicular arrangement. Whereas the complex A01C is clearly the more stable combination with parallel/parallel orientation, the complex C01G is the more stable parallel/perpendicular configuration. A01G, G01G and T01G are very close in energy, thus equally expected.

Conclusions

The Casiopeína[®] complexes show promising results *in vitro* as antineoplastic drugs. This activity is still not completely elucidated and the possibility exists that these compounds interact with DNA by intercalation by their aromatic moiety. From the electronic properties of the Casiopeínas[®], it is possible to observe an electronic charge donation from ligands to the metal centre. This electron density deficiency of the ligand of Casiopeínas[®] is compensated by an electron transfer from adenines when the stacking π - π complex is formed. It is possible to find a correlation between the complex stabilisation energy and electrons transferred from adenine to the aromatic ligand of Casiopeína[®] where a greater electron transfer from adenine I to the aromatic ligand is the more stable complex AX. It seems that the affinity of the Casiopeína[®] to the DNA bases depends on the axial coordination of the base to the copper atom beside the stacking interaction. The Casiopeína[®] affinity to the DNA bases has the following order: $C > G > A \approx T$.

Acknowledgements

The authors want to thank DGTIC-UNAM for the computer time and DGAPA-UNAM (IN208709) for the financial support.

Notes and references

- 1 M. J. Clarke, F. Zhu and D. R. Frasca, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2511–34.
- 2 P. Köpf-Maier, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1994, **47**, 1–16.
- 3 A. De Vizcaya-Ruiz, *Toxicology*, 2003, **194**, 103–113.
- 4 A. Rivero-Müller, A. De Vizcaya-Ruiz, N. Plant, L. Ruiz-Azuara and M. Dobrota, *Chem.-Biol. Interact.*, 2007, **165**, 189–99.
- 5 C. Sissi, F. Mancin, M. Gatos, M. Palumbo, P. Tecilla and U. Tonellato, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 2310–7.
- 6 L. Ruiz-Azuara, *Mexican Patent No. 407543*, 1992.
- 7 L. Ruiz-Ramírez, M. E. De La Rosa, I. Gracia-Mora, A. Mendoza, G. Pérez, G. Ferrer-Sueta, A. Tovar, M. Breña, P. Gutierrez and M. Cruces, *J. Inorg. Biochem.*, 1995, **59**, 207–207.
- 8 L. Ruiz-Ramírez, I. Gracia-Mora, M. E. De La Rosa, H. Sumano, C. Gómez, F. Arenas, E. Gomez, E. Pimentel and M. Cruces, in *Proceedings of the 6th International Conference on Bioorganics*, 1993, p. 406.
- 9 C. Trejo-Solís, G. Palencia, S. Zúñiga, A. Rodríguez-Ropon, L. Osorio-Rico, T. L. Sánchez, I. Gracia-Mora, A. Márquez-Rosado, M. E. Moreno-García, A. Cruz, M. E. Bravo-Gómez, L. Ruiz-Ramírez, S. Rodríguez-Enriquez and J. Sotelo, *Neoplasia*, 2005, **7**, 563–574.
- 10 A. Marin-Hernández, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez and R. Moreno-Sanchez, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **65**, 1979–1989.
- 11 M. Chikira, Y. Tomizawa, D. Fukita, T. Sugizaki, N. Sugawara, T. Yamazaki, A. Sasano, H. Shindo, M. Palaniandavar and W. Antholine, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **89**, 163–173.
- 12 E. A. Meyer, R. K. Castellano and F. Diederich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 1210–1250.
- 13 R. L. Jaffe and G. D. Smith, *J. Chem. Phys.*, 1996, **105**, 2780.
- 14 P. Hobza, H. L. Selzle and E. W. Schlag, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 18790–18794.
- 15 S. Cockroft, C. Hunter, K. Lawson, J. Perkins and C. Urch, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 8594–5.
- 16 J. A. Pople, M. Head-Gordon and K. Raghavachari, *J. Chem. Phys.*, 1987, **87**, 5968.
- 17 P. Jha, Z. Rinkevicius, H. Agren, P. Seal and S. Chakrabarti, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, **10**, 2715–21.
- 18 Y. Zhao and D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.*, 2007, **3**, 289–300.
- 19 R. F. W. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Oxford University Press, Oxford, 1990.
- 20 P. L. Popelier, *Atoms in Molecules: An Introduction*, Prentice Hall, London, 2000.
- 21 *The Quantum Theory of Atoms in Molecules: From Solid State to DNA and Drug Design*, ed. C. F. Matta and R. Boyd, WILEY-VCH, Weinham, 2007.
- 22 O. Zhikol, O. Shishkin, K. Lyssenko and J. Leszczynski, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 144104.
- 23 M. Moa, M. Mandado and R. Mosquera, *J. Phys. Chem. A*, 2007, **111**, 1998–2001.
- 24 I. Alkorta, F. Blanco and J. Elguero, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 7246–7249.
- 25 J. Sponer, K. Riley and P. Hobza, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, **10**, 2595–610.
- 26 C. Matta, N. Castillo and R. Boyd, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 563–78.
- 27 A. Robertazzi and J. A. Platts, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 3992–4000.
- 28 E. G. Hohenstein, S. T. Chill and C. D. Sherrill, *J. Chem. Theory Comput.*, 2008, **4**, 1996–2000.
- 29 B. M. Wong, *J. Comput. Chem.*, 2009, **30**, 51–6.
- 30 Y. Jeanvoine and R. Spezia, *THEOCHEM*, 2010, **954**, 7–15.
- 31 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez and J. A. Pople, *GAUSSIAN 09 (Revision A.01)*, Gaussian Inc., Wallingford CT, 2009.
- 32 Todd A. Keith, *AIMAll (Version 11.02.27)*, 2011 (aim.tkgristmill.com).
- 33 R. F. W. Bader and H. Essén, *J. Chem. Phys.*, 1984, **80**, 1943.
- 34 P. Macchi, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **238–239**, 383–412.
- 35 R. F. W. Bader, M. T. Carroll, J. R. Cheeseman and C. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 7968–7979.
- 36 E. C. Lee, D. Kim, P. Jurecka, P. Tarakeshwar, P. Hobza and K. S. Kim, *J. Phys. Chem. A*, 2007, **111**, 3446–57.
- 37 L. Estévez, N. Otero and R. Mosquera, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 11051–8.
- 38 P. Hohenberg and W. Kohn, *Phys. Rev.*, 1964, **136**, B864–B871.
- 39 A. Zhachkina, M. Liu, X. Sun, F. Amegayibor and J. K. Lee, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 7429–40.