

Explorando los mecanismos de interacción con el ADN en Inhibidores de topoisomerasa I de nueva síntesis

Miguel Largo Almoguera

Licenciatura de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid
miguel.largo@ucm.es

Víctor González Ruiz. M. Antonia Martín Carmona

S. D. de Química Analítica. Facultad de Farmacia
vg Ruiz@farm.ucm.es

Resumen: algunos fármacos antitumorales son capaces de inhibir enzimas fundamentales en los procesos de crecimiento y replicación celulares anómalos que presentan las células tumorales. En otros casos, el mecanismo de acción pasa por la intercalación de los fármacos en el ADN. Por ello, las técnicas de análisis que puedan evidenciar este mecanismo son cruciales en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos. En nuestro trabajo hemos utilizado una de estas técnicas, la viscosimetría, capaz de cuantificar el aumento de la viscosidad cuando la cadena de ADN se alarga tras la intercalación de un fármaco.

Palabras clave: intercalantes. ADN. Antitumorales. Viscosimetría.

INTRODUCCIÓN

En las células tumorales existen genes cuya expresión se encuentra desregulada, dando lugar al crecimiento descontrolado de las mismas. Por ello, la inhibición de las enzimas implicadas en la replicación celular constituye una valiosa herramienta en la terapéutica antitumoral actual, ya que la propia velocidad de división de los tumores hace muy selectiva la acción de estos fármacos ⁽¹⁾. Dentro de este grupo nos encontramos con aquellos que forman complejos estables con las enzimas del grupo de las topoisomerasas (por ejemplo, las camptotecinas se unen a la topoisomerasa I y las antraciclinas o las aminoacridinas, se unen a la topoisomerasa II) ⁽²⁾

Otra de las dianas mejor conocidas en la terapia antitumoral es el propio ADN. Existen moléculas que se unen a la cadena de ADN ya sea por enlaces covalentes, o por enlaces no covalentes. Entre estos últimos, destacan los compuestos intercalantes, además de los que se unen al surco menor de la doble hélice y los que interactúan por fuerzas electrostáticas con la cadena de fosfodiéster ⁽¹⁾. Nuestro trabajo se centra

en el estudio de los mecanismos por los que los principios activos intercalantes son capaces de interactuar con el ADN.

A día de hoy la investigación de los intercalantes sigue enfrentándose al desafío de técnicas de análisis que puedan demostrar de forma rápida y precisa la existencia de tal interacción y la magnitud de la misma ⁽¹⁾. La utilización en análisis de rutina de técnicas analíticas como la RMN, la absorción de infrarrojo, la espectroscopía Raman o la espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible, hacen posible un nuevo empuje a la investigación ⁽²⁾. No obstante, algunos ensayos que pueden clasificarse como *tradicionales* son ineludibles ya que confirman de manera inequívoca lo observado mediante otras técnicas analíticas; éste es el caso de la viscosimetría (Fig. 1).

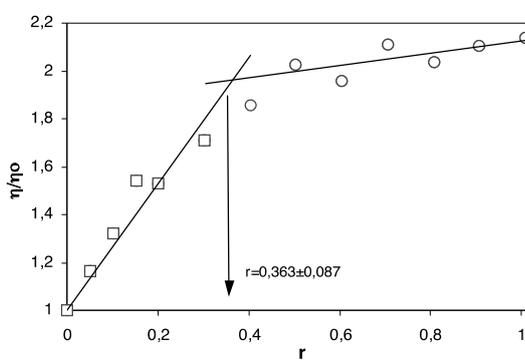


Figura 1. Incremento en la viscosidad de una disolución de concentración constante de ADN debida al aumento de la concentración de bromuro de etidio (agente intercalante).

Los fármacos que interactúan con el ADN intercalándose entre los pares de bases del mismo producen una elongación de la cadena, lo cual se manifiesta en un incremento en la viscosidad ⁽³⁾. Así es posible relacionar el aumento en la longitud del ADN con el cociente de concentraciones [fármaco/macromolécula] a través de la determinación experimental de los valores de viscosidad.

OBJETIVO

Considerando los antecedentes bibliográficos expuestos, nos propusimos discriminar si en la formación del complejo ternario fármaco-ADN-topoisomerasa I los antitumorales pueden aproximarse al ADN ejerciendo un comportamiento intercalante. Para ello decidimos emplear el estudio por viscosimetría de la interacción de la camptotecina y sus análogos con el ADN.

METODOLOGÍA Y MATERIAL

Todos los reactivos y disolventes orgánicos empleados son de calidad para análisis. El agua fue de calidad milli-Q (equipo Direct 8, Millipore). Las medidas de viscosidad se llevaron a cabo con un viscosímetro de Cannon-Fenske en baño de agua termostatzado a $27 \pm 0,1$ °C. El pH de las disoluciones tampón fue determinado con un potenciómetro micro-pH 2001 de Crison con electrodo combinado de membrana de vidrio. Los espectros de absorción UV-Vis se obtuvieron con un espectrofotómetro de doble haz Kontron Uvikon y empleando cubetas de cuarzo de 1 cm. de paso óptico.

RESULTADOS

Se determinó de forma exacta la concentración de bromuro de etidio (agente intercalante modelo, coeficiente de absorción $\epsilon_{480} = 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽⁴⁾ mediante la lectura espectrofotométrica de su absorción (Fig. 2). Como se puede observar (Fig. 3) aparece un pico de absorción a una longitud de onda de 480 nm con una intensidad de 0,389. Teniendo en cuenta las diluciones oportunas para el rango de cumplimiento de la ley de Lambert- Beer obtuvimos finalmente una disolución de concentración $7,1 \times 10^{-3} \text{ M}$.

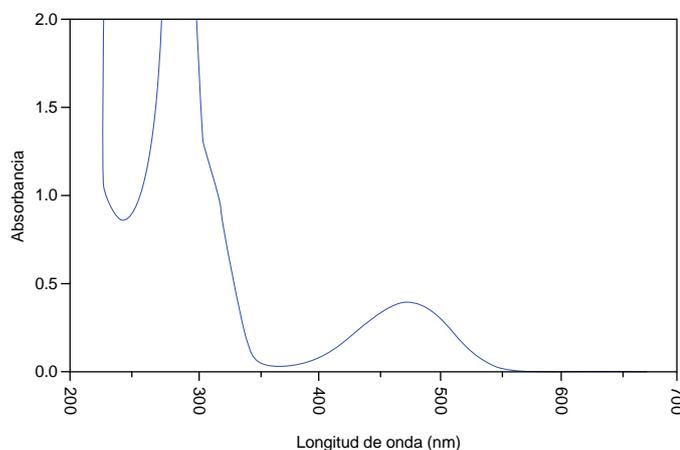


Figura 2. Espectro de absorción de la disolución con bromuro de etidio.

La intercalación de moléculas en una cadena de ADN provoca un incremento en su longitud. Este hecho se manifiesta en el aumento de la viscosidad de las disoluciones con respecto a las de ADN nativo, lo que experimentalmente se puede determinar como un aumento del tiempo de descenso en el capilar del viscosímetro. Verificando el aumento de tiempo de caída en presencia de fármaco podemos demostrar si la camptotecina y los análogos se comportan o no como intercalantes del ADN. Para conocer el incremento del tiempo de caída debida al fármaco, resulta

imprescindible determinar los tiempos de caída de las disoluciones de ADN con todos los componentes excepto el fármaco ⁽⁵⁾. De este modo, la diferencia que haya entre ese tiempo y el de la disolución con fármaco se deberá únicamente al agente intercalante, que incrementa la longitud de la cadena (Tabla 1).

Tris + DMSO (μL)	[ADN] (M)	Tiempo medio de caída (s)	(η/η ₀)
0	3x10 ⁻⁴	299	1
20	3x10 ⁻⁴	294	0,983
40	3x10 ⁻⁴	294	0,983
60	3x10 ⁻⁴	299,5	1,001
80	3x10 ⁻⁴	297,5	0,995
100	3x10 ⁻⁴	300,5	1,005
400	3x10 ⁻⁴	302,5	1,012

Tabla 1. Valores del tiempo de caída de la disolución sin agente intercalante.

Estudiamos previamente el comportamiento de un agente intercalante conocido que usamos como modelo, el bromuro de etidio⁽⁴⁾. El incremento en el tiempo de caída que produce en las disoluciones de ADN de igual concentración a las del experimento anterior nos permitiría comparar con los resultados que obtuviéramos de las disoluciones con nuestros fármacos.

[Bromuro de etidio] (M)	[DNA] (M)	r ([BrEt/ADN])	Tiempo medio de caída (s)	(η/η ₀)
0	3 x10 ⁴	0	292	1
1,5x10 ⁶	3 x10 ⁴	0,005	290	0,993
4,5 x10 ⁶	3 x10 ⁴	0,015	292	1
7,5 x10 ⁶	3 x10 ⁴	0,025	292,5	1,002
12 x10 ⁶	3 x10 ⁴	0,04	293	1,003
15 x10 ⁶	3 x10 ⁴	0,05	294,5	1,009
18 x10 ⁶	3 x10 ⁴	0,06	295,5	1,012
21 x10 ⁶	3 x10 ⁴	0,07	298,5	1,022

Tabla 2. Valores del tiempo de caída de la disolución con el agente intercalante modelo, bromuro de etidio.

CONCLUSIÓN

Se ha diseñado y puesto a punto la metodología necesaria para esclarecer el modo de interacción como intercalantes de nuevos compuestos antitumorales empleando como referencia el bromuro de etidio. Se ha determinado el intervalo de

relación de concentraciones óptimo para observar este comportamiento mediante viscosimetría.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chaires JB. Structural Selectivity of Drug-Nucleic Acid Interactions Probed by Competition Dialysis. En: Waring MJ, Chaires JB, editors. DNA Binders and Related Subjects. Berlin: Springer; 2005. p. 34-51.
2. Gonzalez-Ruiz V, Olives AI, Martín MA, Ribelles P, Ramos MT, Menéndez JC. An Overview of Analytical Techniques Employed to Evidence Drug-DNA Interactions Applications To Design Of Optical Genosensors. En: Komorowoska MA, Olsztynska-Janus S, editor. Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies. Rijeka: InTech; 2011. p. 65-90.
3. Gopal M, Veeranna S. 4-Anilinopyrimido[4',5':4,5]selenolo(2,3-b)quinoline and 4-piperazino pyrimido[4',5':4,5]selenolo(2,3-b)quinoline: new DNA intercalating chromophores with antiproliferative activity. Journal of Photochemistry and Photobiology. 2005; 81:181-189.
4. Suh D, Oh YK, Chaires JB. Determining the binding mode of DNA sequence specific compounds. Process Biochemistry. 2001; 37:521-525.
5. Bordelon JA, Feierabend KJ, Siddiqui SA, Wright LL, Petty JT. Viscometry and Atomic Force Microscopy Studies of the Interactions of a Dimeryc Cyanine Dye with DNA. J. Phys Chem. B. 2002;106(18):4838-4843.

Recibido: 7 noviembre 2013.

Aceptado: 24 febrero 2014.