



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR I

DISEÑO DE DROGAS FOTOACTIVAS
DIRIGIDAS A ÁCIDOS NUCLEICOS:
VIOLÓGENOS DERIVADOS DE
6-(2-PIRIDIL)FENANTRIDINA

TESIS DOCTORAL

GONZALO COLMENAREJO SÁNCHEZ



Madrid, 1996



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR I



* 5 3 0 9 6 0 7 3 5 4 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

DISEÑO DE DROGAS FOTOACTIVAS
DIRIGIDAS A ÁCIDOS NUCLEICOS:
VIOLÓGENOS DERIVADOS DE
6-(2-PIRIDIL)FENANTRIDINA

TESIS DOCTORAL

GONZALO COLMENAREJO SÁNCHEZ

VºBº DIRECTOR DE TESIS

Francisco Montero
Catedrático de Universidad
UCM

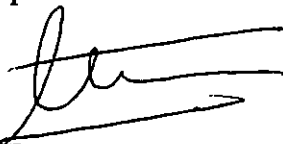
DOCTORANDO

Gonzalo Colmenarejo

FRANCISCO MONTERO CARNERERO, Catedrático de la Universidad
Complutense de Madrid,

INFORMA QUE:

El trabajo presentado como tesis doctoral, "Diseño de drogas fotoactivas dirigidas a ácidos nucleicos: viológenos derivados de 6-(2-piridil)fenantridina" por Gonzalo Colmenarejo Sánchez, ha sido realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid y, en mi opinión, reúne todos los requisitos necesarios para poder optar al grado de Doctor en Biología.



Madrid, 22 de Mayo de 1996

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar al Dr. Franciso Montero mi agradecimiento por haber impulsado desde el primer momento este trabajo. Su constante dedicación y su dirección han sido los mayores responsables de su finalización.

Asímismo, quiero agradecer al Dr. Guillermo Orellana (Departamento de Química Orgánica, UCM) su continuo apoyo y conocimientos. Las innumerables discusiones a lo largo de estos años me han permitido conocer lo poco que sé sobre Fotoquímica y Espectroscopía.

Y a M. Carmen Gutiérrez-Alonso (Departamento de Química Orgánica, UCM), sin cuya síntesis de los viológenos hubiera sido imposible realizar este trabajo.

Mis compañeros del grupo de Biofísica (antiguos y actuales) han sido a lo largo de estos años fuente de amistad. Gracias por todos los buenos momentos pasados.

Deseo agradecer también al Dr. Bengt Nordén (Department of Physical Chemistry, Chalmers University of Technology, Göteborg) por permitirme visitar su laboratorio en 1995, así como a Anders Holmen y Per Lincoln por su ayuda durante dicha estancia.

El Dr. Federico Gago (Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Alcalá de Henares) prestó su inestimable ayuda y conocimientos en distintos momentos para salir de atoyaderos en los estudios de modelado molecular.

Manuel Espinosa-Urgel y Anouska Velasco (Departamento de Bioquímica, UCM) ofrecieron su experiencia, que resultó imprescindible, para realizar los estudios de fotocorte de plásmidos.

La Dra. Inés Fernández (Departamento de Química Física, UNED) prestó su equipo para la realización de las titulaciones viscosimétricas.

Las Dras. Pilar Castrillón y Carmen Acebal prestaron su equipo para la realización de las cinéticas de flujo detenido.

El Dr. Jose Manuel Andreu (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid) prestó su ayuda en la realización de densitometrados para los estudios de fotocorte.

Finalmente, debo por supuesto agradecer a todos los contribuyentes españoles, por costear una beca predoctoral de la Universidad Complutense de Madrid.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Reconocimiento molecular de los ácidos nucleicos por drogas.	2
1.2. Manipulación química de los ácidos nucleicos. Fotoquímica de drogas con polinucleótidos	7
1.3. Viológenos	11
1.4. Hipótesis de trabajo	13
1.5. Objetivos	15
1.6 Metodología	15
 2. TÉCNICAS	 18
2.1. Técnicas espectroscópicas	18
2.1.1. Espectroscopía de absorción electrónica	18
2.1.2. Espectroscopía de emisión	18
2.1.2.1. Medidas de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal	18
2.1.2.2. Anisotropía de fluorescencia (AF)	20
2.1.3. Espectroscopía de dicroísmo circular (DC)	21
2.1.3.1. Dicroísmo circular natural (DC)	21
2.1.3.2. Dicroísmo circular magnético (DCM)	22
2.2. Técnicas para la caracterización experimental de la unión conpolinucleótidos .	23
2.2.1. Dicroísmo lineal en flujo (DL)	23
2.2.2. Isotermas de unión	24
2.2.3. Viscosimetría	27
2.2.4. Cinéticas de flujo detenido	28
2.3. Técnicas de modelado molecular	31
2.3.1. Cálculos cuánticos	31
2.3.2. Mecánica y dinámica molecular	34
2.3.2.1. Modelado de los complejos DNA-droga	36
2.3.2.2. Parametrización de las drogas	39
2.4. Técnicas para el estudio de la fotoquímica con polinucleótidos	41
2.4.1. Ensayos de reacción de fotocorte mediante electroforesis en gel de agarosa	41

2.4.2. Ensayos de fotoblaqueamiento y de formación de fotoaductos	44
2.5. Materiales	44
3. DQ2PYP, DQ3PYP Y Me2PYP	46
3.1. Análisis conformacional de las drogas.....	46
3.2. Caracterización de la estructura electrónica de las drogas.....	49
3.2.1. Espectros electrónicos y momentos de transición electrónicas.....	49
3.2.2. Luminiscencia	56
3.3. Estabilidad y reactividad de las drogas	57
3.3.1. Estabilidad frente a pH, temperatura y luz	57
3.3.2. Potenciales rédox	59
3.3.3. Autoasociación	60
3.4. Interacción de las drogas con ácidos nucleicos	60
3.4.1. Unión de alta afinidad al DNA.....	60
3.4.2. Intercalación en el DNA y rápida disociación.....	62
3.4.3. Especificidad por pares de bases GC alternantes del DNA.....	67
3.4.4. Intercalación parcial y asimétrica de las tres drogas en el DNA.....	68
3.4.5. Especificidad de base del dq2pyp desde el punto de vista molecular.....	70
3.4.6. La unión por surco mayor está favorecida.....	73
3.4.7. El modelado molecular predice una unión enantioespecífica del dq2pyp y del dq3pyq al B-DNA.....	73
3.4.7. Verificación experimental de la unión enantioespecífica a B-DNA de los viológenos.....	76
3.4.8. Efecto de polielectrolito. iseción de la energía libre de unión del dq2pyp al DNA.....	79
3.4.9. Interacción débil con RNA de doble hélice.....	83
3.5. Fotoquímica con ácidos nucleicos de las drogas.....	85
3.5.1. Apagamiento de la luminiscencia y fotooxidación de las bases del DNA.....	85
3.5.2. Inexistencia de fotoaductos con DNA.	87
3.5.3. Actividad fononucleásica de los viológenos.....	88
3.5.4. Fotoquímica del RNA de doble hélice.....	91
3.6. Discusión.....	92

4. DQ2PYP, DQ3PYP Y Me2PYP.....	101
4.1. Análisis conformacional de las drogas.....	101
4.2. Caracterización de la estructura electrónica de las drogas.....	101
4.2.1. Espectros electrónicos y momentos de transición electrónicas.....	101
4.2.2. Luminiscencia.....	104
4.3. Estabilidad y reactividad de las drogas.....	104
4.3.1. Estabilidad frente a pH, temperatura y luz.....	104
4.3.2. Potenciales rédox.....	106
4.4. Interacción de las drogas con ácidos nucleicos.....	106
4.4.1. Incremento de la afinidad de unión por el DNA.....	106
4.4.2. Intercalación clásica en el DNA y disociación lenta.....	106
4.4.3. Efecto de polielectrolito. Disección de la energía libre de unión del dadq2pyp al DNA.....	109
4.4.4. El modelado molecular predice una unión enantioespecífica del dadq2pyp y el dadq3pyp.....	111
4.5. Fotoquímica de las drogas con ácidos nucleicos.....	113
4.5.1. Ausencia de exaltamiento de la luminiscencia con ácidos nucleicos.....	113
4.5.2. Actividad fononucleásica de los viológenos.....	113
4.6. Discusión.....	114

1: Introducción

El diseño racional o basado en estructura de drogas dirigidas a ácidos nucleicos es un área objeto de intensa investigación en la actualidad.¹⁻³ Las aplicaciones de estos compuestos van desde la terapia y el diagnóstico molecular de múltiples enfermedades (por ejemplo, el cáncer), hasta el desarrollo de sondas moleculares y nucleasas artificiales específicas de secuencia o estructura utilizables en Biología Molecular. Aunque con cierto retraso respecto del diseño de drogas dirigidas a proteínas, este campo ha experimentado durante los últimos diez años un notable avance.⁴ Ello es el resultado de la mejora de las tecnologías de cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y modelado molecular aplicadas a los ácidos nucleicos, así como de la aparición de técnicas complementarias como el "footprinting".⁵ Como consecuencia, se ha recopilado una gran cantidad de información estructural y termodinámica sobre la interacción de diversas drogas con polinucleótidos, permitiendo racionalizar en bastantes casos el origen de la afinidad y especificidad de secuencia o estructura observada experimentalmente. Fruto de esta comprensión ha sido la aparición de diversos intentos de diseño "a medida" de nuevos candidatos con propiedades mejoradas, como por ejemplo las *lexitropsinas*,^{6,7} las *combilexinas*,⁸ los *análogos de oligonucleótidos*⁹ y los *microgonotropenos*.¹⁰ Estos ejemplos demuestran que el diseño racional de drogas dirigidas a DNA o RNA es un campo donde los resultados prácticos están siendo un hecho.

La asociación de drogas con ácidos nucleicos, en particular con DNA, puede darse por uno o varios de los siguientes modos de unión:⁷ intercalación, asociación no covalente con uno de sus surcos, asociación electrostática con los fosfatos de la cadena polinucleotídica y unión covalente. A estos modos habría que añadir la formación de enlaces de hidrógeno con ácidos nucleicos de cadena sencilla en el caso de oligonucleótidos antisentido. Hay drogas que utilizan simultáneamente más de un modo de unión,^{11,12} y otras que usan distintos modos dependiendo de la secuencia o de la naturaleza del ácido nucleico con el que estén interaccionando.^{13,14} Las drogas

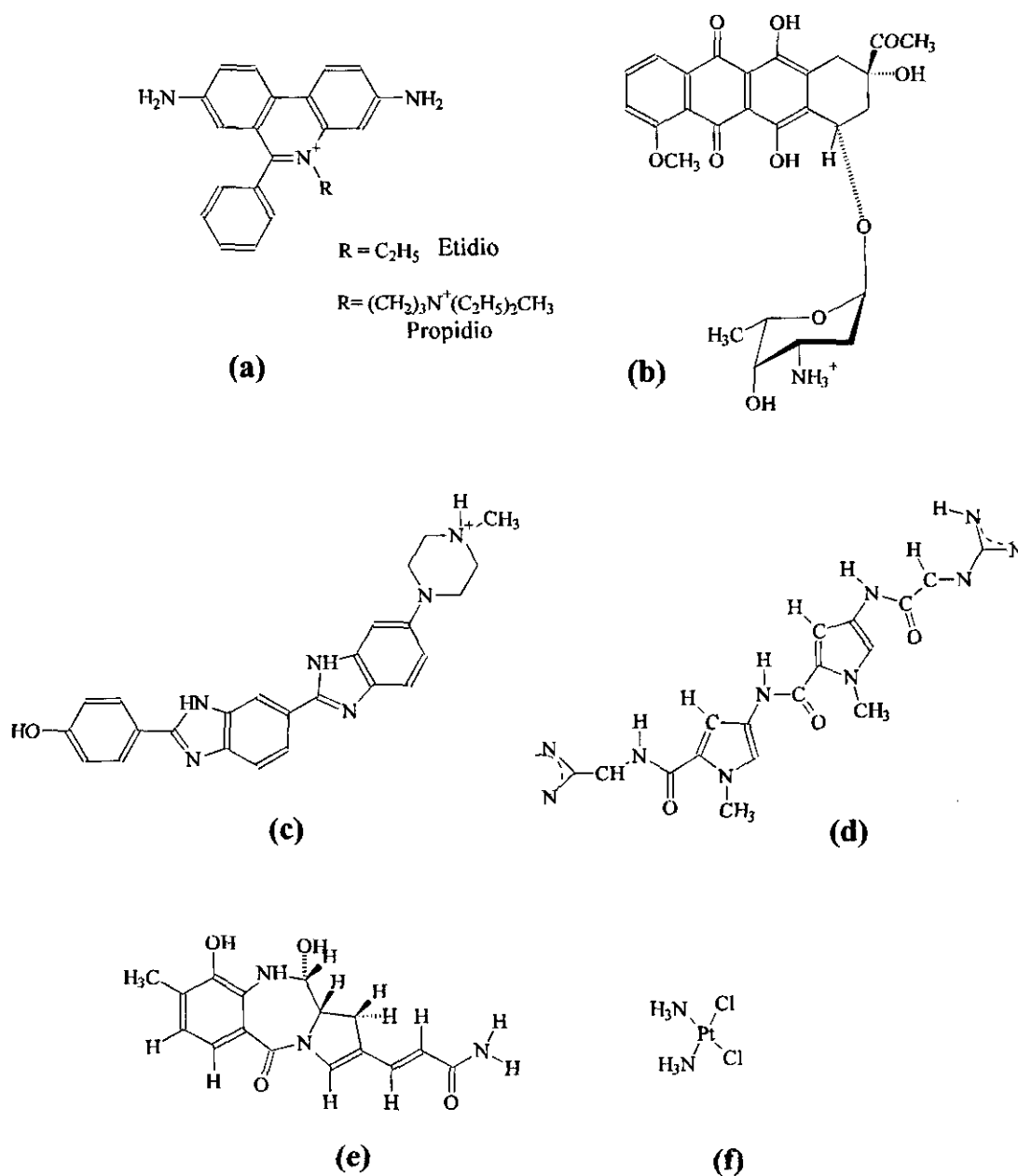


Figura 1.1. Estructura química de drogas dirigidas a ácidos nucleicos. Tres grandes categorías se representan en esta figura. De arriba a abajo, se muestran en primer lugar *drogas intercalantes*, caracterizadas por poseer un anillo heteroaromático que se inserta entre dos pares o tríadas de bases: (a) etidio y propidio, y (b) daunomicina. En esta última el azúcar se sitúa en el surco menor, de modo que la droga interacciona tanto por intercalación como por unión a dicho surco. Debajo se muestran dos *drogas de unión al surco menor*: © Hoechst 33258 y (d) netropsina. Estas drogas tienen forma cóncava, presentando dadores de enlaces de hidrógeno y cargas positivas. Son altamente específicas de regiones con tramos de tres o más pares de bases AT, que se caracterizan por ser electronegativas y poseer aceptores de enlaces de hidrógeno. Por último se muestran dos drogas que interaccionan covalentemente con el DNA: (e) antramycin y (f) cis-platino.

intercalantes (Figura 1.1., (a) y (b)) se suelen caracterizar por poseer un anillo aromático heterocíclico, capaz de apilarse entre dos pares o tríadas de bases a modo de "sandwich".¹⁵ Las que se unen al surco menor (Figura 1.1. (c) y (d)) tienen una estructura curva y estrecha, con dadores de enlaces de hidrógeno del lado cóncavo y con grupos cargados positivamente; la asociación con este surco, que suele ser específica de regiones con pares de bases AT, se estabiliza estereoelectrónicamente mediante una combinación de interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones coulombicas (dado el potencial electrostático altamente negativo de este surco en estas secuencias).⁷ La asociación deslocalizada con los fosfatos aniónicos del DNA se espera en principio para toda droga catiónica, independientemente de su estructura. Por último, las drogas que forman enlaces covalentes con el DNA (Figura 1.1. (e) y (f)) se caracterizan por ser altamente electrofílicas o tener una alta reactividad electrocíclica.¹⁶

Por otra parte, diferentes interacciones moleculares estabilizan la unión no covalente de drogas a polinucleótidos. Cabe destacar las interacciones electrostáticas, de van der Waals y los enlaces de hidrógeno.¹⁷ También, en casi todos los casos, una gran parte de la energía libre de unión viene del efecto hidrofóbico y del efecto de polielectrolito.¹⁷

1.1 Reconocimiento molecular de los ácidos nucleicos por drogas

El objetivo último de todo diseño racional de drogas es la creación de un ligando capaz de establecer una serie de interacciones moleculares localizadas con una macromolécula diana, es decir, de ejercer un *reconocimiento molecular* de la misma. La droga será en principio tanto más efectiva cuanto más *específica* sea su unión, puesto que así se evitará la aparición de efectos colaterales no deseados debidos a su interacción con macromoléculas diferentes a la diana.

Los ácidos nucleicos en muchos casos se encuentran formando estructuras doble-helicoidales repetitivas. La variabilidad estructural se localiza entonces únicamente en los patrones de grupos funcionales existentes en los surcos mayor y menor, y más particularmente en los situados en el surco mayor debido a su no degeneración.^{7,18} En dichos casos, una interacción específica requerirá (a) el reconocimiento del patrón particular de grupos funcionales de una secuencia de bases concreta vía surco mayor, y (b) que dicha secuencia no esté repetida. La droga que posea tal capacidad tendrá

*especificidad de secuencia.*¹⁹ A medida que el tamaño del ácido nucleico aumenta, el tamaño mínimo que debe tener una secuencia para ser única (suponiendo una distribución aleatoria de bases) también aumenta. Así, para el genoma humano se estima dicho tamaño mínimo en 15 pares de bases.²⁰ Las drogas tradicionales dirigidas a ácidos nucleicos (intercalantes, drogas de surco menor, etc) interaccionan con un reducido número de pares de bases (1-4), y además no establecen interacciones con patrones de grupos funcionales en el surco mayor. Por estas razones tiene una escasa especificidad de secuencia. Debido a ello, se han ideado nuevos esquemas de diseño, como el de los (análogos de) oligonucleótidos antigén y antisentido previamente citados, que aprovechan la complementariedad de dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno de las bases para reconocer patrones de grupos funcionales del surco mayor (o de bases en el caso de las drogas antisentido).⁹

En otros casos, nos encontramos frente a una batería de ácidos nucleicos de diferente estructura. La especificidad en la unión puede entonces conseguirse mediante el diseño de una droga que se una selectivamente a una de las estructuras presentes, es decir, que tenga *especificidad estructural.*²¹ Es bien conocido el polimorfismo del DNA, el cual, dependiendo de su composición de bases y del medio (actividad del agua, temperatura, contraiones, etc) puede adoptar diferentes conformaciones, todas ellas pertenecientes a una de las tres grandes familias A, B y Z.²² Además, los estudios de difracción de rayos X de cristales de oligonucleótidos han mostrado la existencia de variaciones estructurales locales alrededor de estas conformaciones básicas.²³ Por otra parte, existe un gran número de estructuras 'inusuales' (horquillas, triples hélices, cuadruplexos, sitios abásicos o anucleotídicos, DNA ramificado, lazos,...) que aumentan esta riqueza estructural intrínseca presente en las dobles hélices.²⁴ En cuanto al RNA, si bien sus estructuras de doble o triple hélice pertenecen casi siempre a la familia A, se han descrito numerosas estructuras inusuales en RNAs víricos y celulares: pseudonudos, estructuras globulares de tRNAs y ribozimas, etc.²⁵⁻²⁷ Por tanto, el diseño de drogas con tal especificidad es altamente atractivo, puesto que aunque el número de estructuras inusuales no sea tan elevado como el de secuencias, suelen ir asociadas a funciones altamente específicas.

Existe una muy fructífera línea de investigación dentro del diseño de drogas específicas de estructura, basada en la utilización de *drogas quirales* de forma y tamaño variables para el reconocimiento de motivos estructurales de polinucleótidos.²¹ El

fundamento último de esta aproximación es la propia quiralidad de los ácidos nucleicos, debida a su vez a la intrínseca de sus componentes, los nucleótidos, así como a la adopción de estructuras helicoidales con disposiciones espaciales disimétricas. Como consecuencia, la unión de estas drogas quirales es *enantioespecífica*, es decir, está favorecida para uno de sus enantiómeros. Para este tipo de diseño se han utilizado casi exclusivamente hasta la fecha complejos metálicos, dada la gran riqueza de estructuras tridimensionales de variadas simetrías que pueden generarse mediante la coordinación de metales con ligandos orgánicos.²⁸ Además, los complejos metálicos pueden interactuar con polinucleótidos mediante cualquiera de los modos anteriormente descritos: intercalación, unión no covalente a los surcos, asociación electrostática y coordinación del metal o unión covalente de un ligando con las bases.

A esta potencialidad estructural se unen dos factores adicionales. Por una parte, la rica (foto)química de los complejos metálicos con los ácidos nucleicos, que posibilita su utilización en la manipulación química de los mismos (ver más adelante). Por otra, un cambio dramático en sus propiedades fotofísicas al interactuar con polinucleótidos, que permite detectar con gran sensibilidad su unión y su usarlas como sondas moleculares estructurales.²⁸ En la Tabla 1.I se recopilan las enantioespecificidades observadas de complejos metálicos en su unión con ácidos nucleicos.

Entre estos ejemplos, cabe destacar el enantiómero Λ del $\text{Ru}(\text{TMP})_3^{3+}$, que es preferido por A-RNA (no uniéndose a B-DNA),²⁹ así como el enantiómero Λ del $\text{Ru}(\text{DIP})_3^{2+}$, de unión preferente a Z-DNA (el enantiómero Δ se une mejor a B-DNA). El análogo de cobalto de esta última droga ($\Lambda\text{-Co}(\text{DIP})_3^{3+}$) se ha utilizado como fotonucleasa específica de Z-DNA. La preferencia del B-DNA por los enantiómeros en su unión reversible se invierte cuando la asociación es por coordinación del metal (ver Tabla 1.I).

TABLA 1. Enantioespecificidades descritas para complejos de metálicos. Tomado de la referencia 28.

COMPLEJO	TECNICA	SELECTIVIDAD
$[\text{Fe}(\text{bpy})_3]^{2+}$	DC: Efecto Pfeiffer	Δ preferido por B-DNA
$[\text{Zn}(\text{phen})_3]^{2+}$	Diálisis & DC	enantioselectividad Δ con B-DNA
$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	Diálisis & DC	Δ preferido con B-DNA
$[\text{Ru}(\text{DIP})_3]^{2+}$	Cambios en absorción	solamente Δ une a B-DNA
$[\text{Ru}(\text{IME})_3]^{2+}$	Diálisis & DC	Δ preferido con A-RNA (no se une a B-DNA)
$[\text{Fe}(\text{bpy})_3]^{2+}$, $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$	\rightarrow DC: efecto Pfeiffer	Δ preferido con B-DNA para todos los complejos
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	\rightarrow Diálisis & DC	
a) $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ b) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	DC	a) Δ preferido con B-DNA b) Δ preferido con Z-DNA debido a la conversión Z \rightarrow B
a) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phen})]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy})]^{2+}$ $[\text{Ru}(5\text{-NO}_2\text{-phen})_3]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{DIP})]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{DIP})]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{DIP})_2(\text{phen})]^{2+}$	Diálisis y DC	a) Δ preferido con B-DNA
b) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phen})]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{phen})]^{2+}$	Diálisis y DC	b) Enantioselectividad, pero configuración absoluta no asignada
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ppz})]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{DIP})_2]^{2+}$	Cromatografía de DNA y DC	Δ preferido por B-DNA
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ppz})]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{qpy-Me})]^{2+}$	Diálisis y DC	Δ preferido por B-DNA
$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{DIP})_3]^{2+}$	Intensidad y polarización de fluorescencia	Δ preferido por B-DNA Δ preferido con Z-DNA
$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	Constantes de unión	Δ preferido por B-DNA
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ppz})]^{2+}$	Constantes de unión	Δ preferido por B-DNA
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phen})]^{2+}$	Constantes de unión	Δ ligeramente preferido por B-DNA
$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{ddpz})]^{2+}$	Constantes de unión	Δ preferido por B-DNA
a) $\text{cis-}[\text{Rh}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^{2+}$ $\text{cis-}[\text{Rh}(\text{phen})_2(\text{OH})_2]^{2+}$ b) $\text{cis-}[\text{Rh}(\text{phen})_2(\text{OH})_2\text{Cl}]^{2+}$ c) $\text{cis-}[\text{Rh}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^{2+}$	Diálisis y DC	a) Δ preferido covalentemente y no covalentemente b) Δ preferido covalentemente c) No enantioselectividad
$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH})_2]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{OH})_2]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH})_2(\text{py})]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{OH})_2(\text{py})]^{2+}$	Ultrafiltración y DC	Δ preferido para unión covalente a B-DNA
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^{2+}$	Precipitación en EtOH y DC	Enantioselectividad covalente Δ con B-DNA

1.2 Manipulación química de los ácidos nucleicos. Fotoquímica de drogas con polinucleótidos.

Un gran número de aplicaciones de las drogas dirigidas a polinucleótidos se basan en su capacidad de modificarlos químicamente. Existe todo un arsenal de moléculas que reaccionan con distintos componentes (bases, azúcares, fosfatos) o estructuras de ácidos nucleicos, destacando las utilizadas para la secuenciación de los mismos y en las técnicas de "footprinting" (Tabla 1.II).³²

TABLA 1.II. Pruebas químicas utilizadas en la manipulación de los ácidos nucleicos. Tomada de la referencia 32.

PRUEBA	COMENTARIOS
Haloacetaldéhdos	Base A>C; aducto eteno
Tetraóxido de Osmio	Base T; aducto 5,6-diéster; cortado con piperidina
Permanganato	Base T; producto diol; cortado con piperidina
Pirocarbonato de Dietilo (DEP)	Base A>G; carboxilación; cortado con piperidina
Formaldehído	Entrecruzamiento
Gloxal	Base G; aducto eteno
Glicilaldehído	Base G
Bisulfito	Base C; deaminación a dU
Hidroxilamina	Base C
Sulfato de dimetilo (DMS)	Base G; metilación en N7; cortado con piperidina
Azul de metileno	Fotooxidación de la base G
Oxígeno singlete	Corte descrito en kinks de DNA
Etilnitrosourea	Etilación de fosfato
Carbodiimida	Modificación de T y G en cadenas sencillas
Ozono	Escisión de cadena en secuencias ricas en A+T
Psoraleno	Entrecruzamiento dependiente de superenrollamiento
EDTA-Fe	Corte de la dextrosirribosa por HO [•]
MPE-Fe	Unión del complejo a DNA; escisión de cadena
Cu(0)-phen	Corte por ataque a la dextrosirribosa
Metales de transición	Unión o corte en función de la estequiometría
Ion uranilo	Fotooxidación de dextrosirribosa

En este sentido, son especialmente útiles para la manipulación de los polinucleótidos las drogas capaces de fotosensibilizarlos en reacciones de corte o formación de aductos, debido a que permiten usar la luz para controlar dichas modificaciones de una forma rápida y "limpia".^{33,34} La fotoquímica de drogas con ácidos nucleicos tiene además un interés médico adicional, debido a la existencia de fotosensibilizadores endógenos (porfirinas, riboflavina, bilirrubina, etc) que provocan efectos deletéreos en el DNA en

presencia de luz, y de compuestos utilizables beneficiosamente como fotosensibilizadores exógenos en la terapia fotodinámica de tumores (derivados de la hematoporfirina, ftalocianina, etc).³⁴

Las reacciones de fotocorte y formación de fotoaductos de los ácidos nucleicos ocurren vía múltiples mecanismos. Concretamente, el fotocorte del DNA se inicia en todos los casos conocidos por una de las tres siguientes reacciones fotoquímicas:³⁴ (a) *oxidación de la guanina por parte de la droga excitada*; (b) *captura de un hidrógeno de la desoxirribosa*, bien directamente por la droga excitada, bien por OH producido a partir de anión radical superóxido (O_2^- , con hierro como catalizador), el cual a su vez es generado por reducción del O_2 por la droga excitada; (c) *oxidación de la guanina por oxígeno singlete*, producido por transferencia de energía del triplete excitado de la droga al oxígeno molecular.

La secuencia de reacciones posteriores a la fotooxidación de la guanina en el caso (a) ha sido estudiada con cierto detalle utilizando como modelo la 3',5'-di-O-acetil-2'-desoxiguanosina (Figura 1.2).³⁵

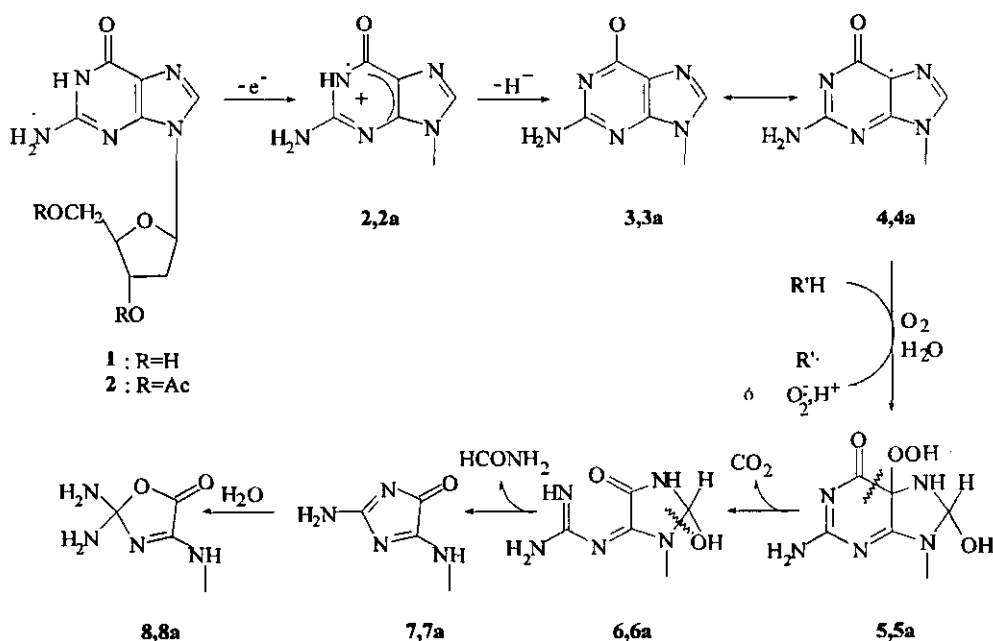


Figura 1.2. Fotooxidación de la guanina. El radical catiónico de la guanina formado tras la transferencia electrónica (2a) se desprotona en agua a pH neutro y evoluciona a un radical neutro, con dos formas en equilibrio tautomérico centradas respectivamente en el O6 y el C5 (3a y 4a). Este mismo radical neutro puede formarse directamente por captura de un hidrógeno por la droga excitada, como de hecho ha sido propuesto para el azul de metileno. A la forma 4a se adiciona una molécula de oxígeno, formándose un radical peróxido y/o el hidroperóxido 5a, y a éste una molécula de agua en el enlace etilénico N7-C8. Como resultado, se genera la carbinolamina 6a, con la consiguiente apertura del anillo de pirimidina en el enlace C5-C6 y liberación de CO_2 . A continuación se libera una molécula de formamida y el anillo se reordena dando lugar a la imidazolona 7g, que por hidrólisis rinde la oxazolona 2h.

Cuando se utiliza 2'-desoxiguanosina como sustrato (Figura 1.3) se produce competitivamente una adición nucleofílica intramolecular del grupo 5'-hidroximetilo para producir **9**, que da lugar al nucleósido **10** tras liberar CO_2 .³⁵

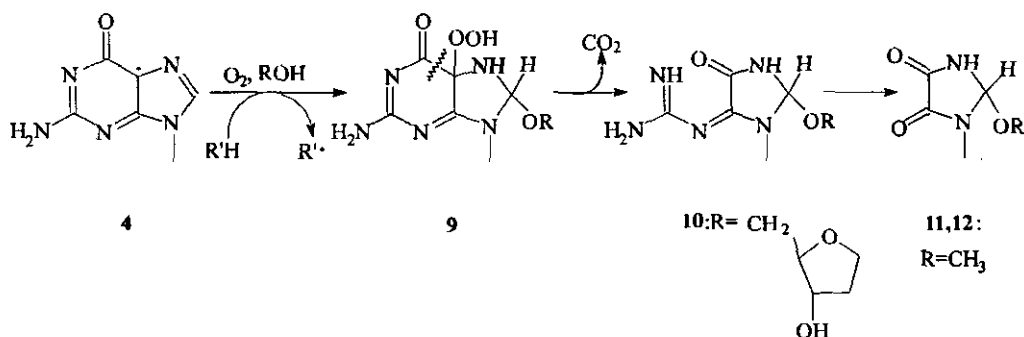


Figura 1.3. Fotooxidación de la guanina. Via alternativa con 2'-desoxiguanosina como sustrato. Los productos **11** y **12** se producen en metanol-agua.

La fotooxidación por oxígeno singlete (caso (c)) ha sido estudiada principalmente con 2'-dexosiguanosina (Figura 1.4).³⁵

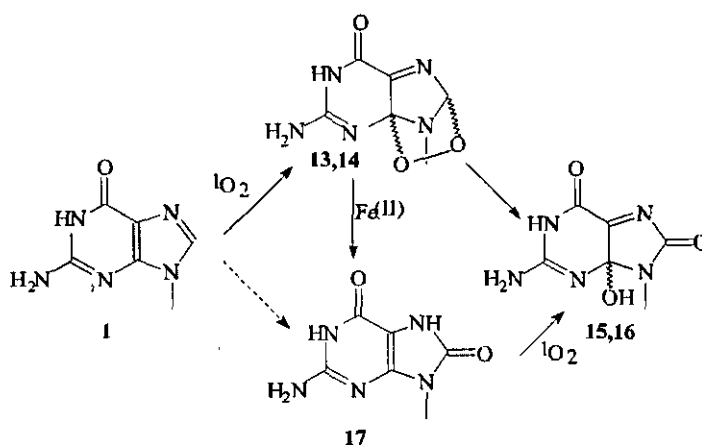


Figura 1.4. Fotooxidación de la guanina. Oxidación por oxígeno singlete. Tras una cicloadición [4+2] de Diels-Alder del oxígeno singlete en las posiciones C4 y C8, se originan los endoperóxidos inestables **13** y **14**, que evolucionan posteriormente hacia los diastereoisómeros 4R^* y 4S^* de la 4,8-dihidro-4-hidroxi-8-oxo-2'-desoxiguanosina (**15** y **16**). En menor medida también se produce 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (**17**), que posteriormente se oxida dando igualmente **17**.

Por su parte, la captura de hidrógeno de la desoxirribosa (caso (b)) se da preferentemente en cinco de las siete posiciones posibles, debido a la presencia de un átomo geminal de oxígeno o nitrógeno. En la Figura 1.5a se muestran los cinco radicales generables, que evolucionan para formar diferentes productos estables (Figura 1.5b).³⁵

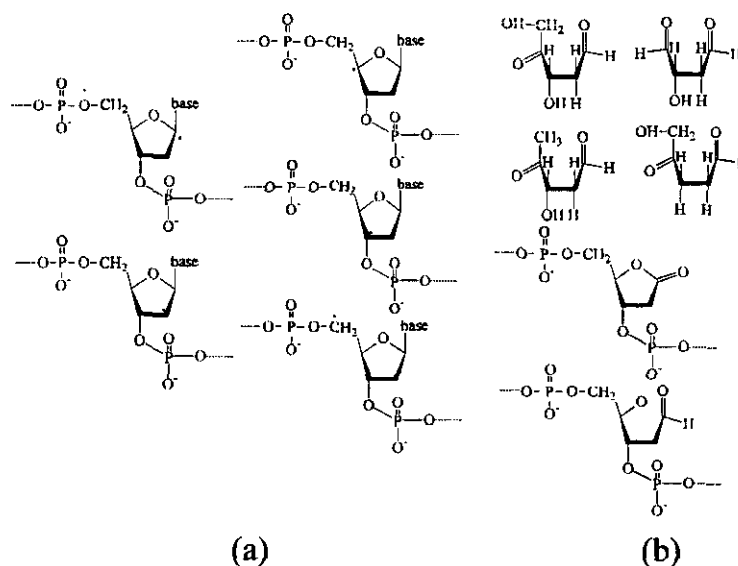


Figura 1.5. (a) Radicales formados por captura de H de la desoxirribosa. (b) Productos generados tras evolución de los anteriores radicales. Los dos de abajo son azúcares lábiles al álcali.

Los compuestos químicos capaces de fotosensibilizar el corte del DNA, vía uno o varios de los mecanismos anteriormente descritos, son de muy diferente naturaleza: drogas heteroaromáticas (acridinas, azul de metileno, daunomicina, etc), complejos de metales de transición ($\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$, $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, etc), cetonas (acetofenona, benzofenona, acetona) e hidrocarburos aromáticos policíclicos. En la Tabla 1.III se recogen algunos de estos compuestos junto con los mecanismos de fotocorte propuestos para los mismos.

Tabla 1.3. Mecanismos de fotocorte descritos para diferentes drogas. Tomado de la referencia 34.

Compuesto	Mecanismo
Naranja de acridina	$^1\text{O}_2$
Proflavina	$^1\text{O}_2$ (440 nm), t.e. del triplete al H_2O , y seguida de reacción del radical catiónico (440 + 360 nm)
Fluorpirronina	t.e. intramolecular del triplete al estado fundamental, y oxidación de G por el radical catiónico
Azul de metileno	fotooxidación de la guanina
Rosa bengala	reacción del triplete con DNA ($- \text{O}_2^{*}$), ? ($+ \text{O}_2^{*}$)
Etidio	?
Clorpromazina	vía radicales de la droga ($- \text{O}_2$); t.e. al O_2 para dar $\text{O}_2^{\cdot -}$, y formación de OH
Tetraciclinas	t.e. al O_2 para dar $\text{O}_2^{\cdot -}$, y subsiguiente formación de OH
Daunomicina	t.e. al O_2 para dar $\text{O}_2^{\cdot -}$, y subsiguiente formación de OH
Camptotecina	captura directa de H ($- \text{O}_2$), t.e. al O_2 para dar $\text{O}_2^{\cdot -}$, y formación de OH ($+ \text{O}_2$)
Complejos metálicos	$^1\text{O}_2$ ($+ \text{O}_2$); fotooxidación de bases o formación de OH por fotooxidación de OH
Porfirinas	$^1\text{O}_2$ y otros
Benzofenona	captura de H del H_2O por el triplete con formación de OH
BDPE	?

^{*}t.e.= transferencia electrónica

^{**} $\pm \text{O}_2$ = en presencia/ausencia de oxígeno

1.3 Viológenos

Los viológenos constituyen un grupo de dicaciones orgánicas derivados de 2,2'- o 4,4'-bipiridinas dialquiladas (Figura 1.6).³⁶ Son particularmente interesantes por su capacidad de sufrir procesos de oxidorreducción reversibles, inusual en otras familias de compuestos orgánicos. Esta capacidad puede explicarse considerando la estabilidad del radical catiónico generado por reducción monolectrónica del correspondiente dicatión debido a la deslocalización por toda la estructura del electrón adicional. Han sido principalmente utilizados como herbicidas, debido a su interferencia con los procesos redox fotosintéticos, y como oxidantes en numerosos sistemas químicos y biológicos.³⁶

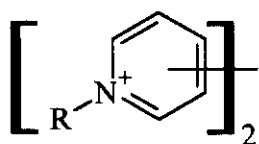


Figura 1.6. Estructura química general de un viológeno.

También ha sido investigada la interacción y fotoquímica con ácidos nucleicos de diversos viológenos. Por ejemplo, el metil-viológeno o paraquat (Figura 1.7), de unión electrostática a los fosfatos, presenta actividad fononucleásica dependiente de oxígeno.³⁷ Además, puede actuar como cosensibilizador en la reacción de fotocorte del DNA por parte del etidio.³³ En este caso, el mecanismo propuesto implica la transferencia electrónica desde el etidio excitado (intercalado) hasta el metil-viológeno (unido al DNA externamente), seguido de la oxidación de la guanina por parte del etidio oxidado. Esta oxidación en una matriz de DNA del etidio excitado por el metil viológeno fue estudiada y demostrada previamente: la correspondiente constante cinética de transferencia electrónica, determinada por el apagamiento de la fluorescencia del etidio, aumenta cinco órdenes de magnitud respecto a un control sin DNA.³⁸

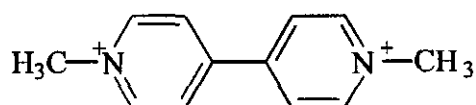


Figura 1.7. Estructura química del metil-viológeno o paraquat (ion 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio).

Otros viológenos investigados en relación con el DNA son el ion *N,N'*-dimetil-2,7-diazapirenio (MDAP²⁺, Figura 1.8a) así como el correspondiente dímero bis-DAP⁴⁺ (Figura 1.8b). Estos viológenos son capaces de fotosensibilizar el corte del DNA.³⁹ El

segundo es una fotonucleasa mucho más efectiva que el primero, particularmente en la formación de fragmentos de DNA de pequeño tamaño, seguramente por su mayor constante de asociación y por la presencia de dos grupos fotoactivos. El MDAP²⁺ se une fuertemente al DNA ($K=O(10^5) M^{-1}$) y de forma no intercalante (posiblemente electrostática, al igual que el metil-viológeno, resultados no publicados). Presenta absorción en el visible y fluorescencia relativamente intensa.⁴⁰

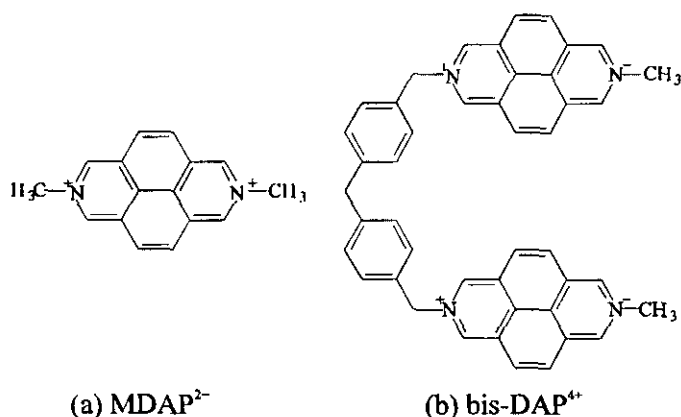


Figura 1.8. Estructuras químicas del (a) MDAP²⁺ y (b) el dímero bis-DAP⁴⁺.

El ion dimetildiazaperopireno (ADIQ²⁺, figura 1.9) tiene también actividad fotonucleásica sobre DNA de cadena sencilla.⁴¹ El corte ocurre principalmente en las guaninas, y aumenta de forma importante si tras la irradiación se trata la muestra con piperidina 1 M a 90 °C, indicando la formación simultánea de sitios lábiles al álcali. Presenta bandas de absorción en el visible y es luminiscente. La fluorescencia es apagada por nucleósidos, así como por poly(dG) y dobles hélices con pares de bases GC. Por el contrario, se incrementa en presencia de poly(dA), poly(rA) y polinucleótidos sintéticos de doble cadena con pares de bases AT.^{41,42}

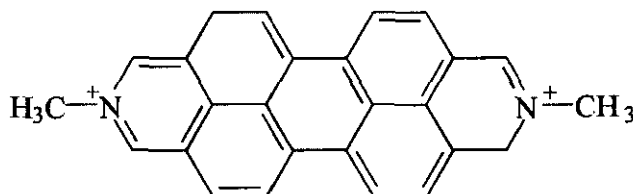


Figura 9. Estructura del ADIQ²⁺ (ion *N,N'*-dimetilanttra[2,1,9-def:6,5,10,*d'e'f'*]diisoquinolinio).

La interacción con nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos también ha sido estudiada con detalle. Las constantes de asociación a nucleósidos y nucleótidos resultan ser mucho mayores que las observadas para otras drogas, posiblemente por su carácter dicatiónico y su mayor superficie hidrofóbica en comparación con éstas. Los estudios de

transferencia de energía y de dicroísmo lineal en flujo indican que la unión al DNA es por intercalación. La unión es más fuerte en dobles hélices ricas en pares de bases GC.^{41,42}

En un estudio posterior se ha investigado detalladamente la fotoquímica del MDAP²⁺ y el ADIQ²⁺.⁴³ El apagamiento de la fluorescencia observado es debido a una transferencia electrónica desde las bases al singlete excitado de las drogas, altamente oxidante. Sin embargo, la reacción es altamente reversible, por lo que los autores concluyen que el mecanismo de fotocorte ha de involucrar a moléculas de droga unidas externamente, bien vía fotooxidación de los azúcares o mediado por oxígeno singlete. Este último mecanismo estaría de acuerdo con la inhibición del corte en ausencia de oxígeno observada con el MDAP²⁺.

1.4 Hipótesis de trabajo

Hemos visto las interesantes propiedades redox que presentan los viológenos. Por otra parte, derivados de estas moléculas con estructuras aromáticas extendidas (MDAP²⁺, bis-DAP⁴⁺, ADIQ²⁺) han resultado ser luminiscentes y absorber en el visible, cambiando drásticamente sus propiedades fotofísicas como consecuencia de la unión a polinucleótidos. Además, muestran una interesante fotoquímica con los ácidos nucleicos: sus estados excitados oxidan las bases del DNA, y son capaces de sensibilizar la formación de oxígeno singlete. Como resultado, se observa una importante actividad fotonucleásica, que en el caso del ADIQ²⁺ se ha demostrado que es específica de guaninas. Por otro lado, presentan fuerte unión con el DNA, y en el caso del ADIQ²⁺ es por intercalación.

Consideremos una estructura genérica como la mostrada en la Figura 1.10, en la que una de las piridinas de un viológeno típico se ha sustituido por una fenantridina cuaternizada. Como viológenos con estructura aromática extendida, y en vista de los precedentes descritos en el apartado anterior, cabe esperar de estas hipotéticas moléculas propiedades fotofísicas, fotoquímicas y de unión a polinucleótidos similares o mejoradas con respecto a las de los viológenos MDAP²⁺ y ADIQ²⁺: en principio es esperable que absorban en el visible y que sean luminiscentes; como derivados de las 2,2'-bipiridinas dialquiladas, deberían ser capaces de sufrir procesos redox reversibles, y como consecuencia (en combinación con la anterior previsión), procesos fotorredox. Además,

esta estructura genérica muestra gran parecido con la del etidio, y por ello cabe esperar que por analogía se unan fuertemente y por intercalación al DNA y al RNA.⁴⁴

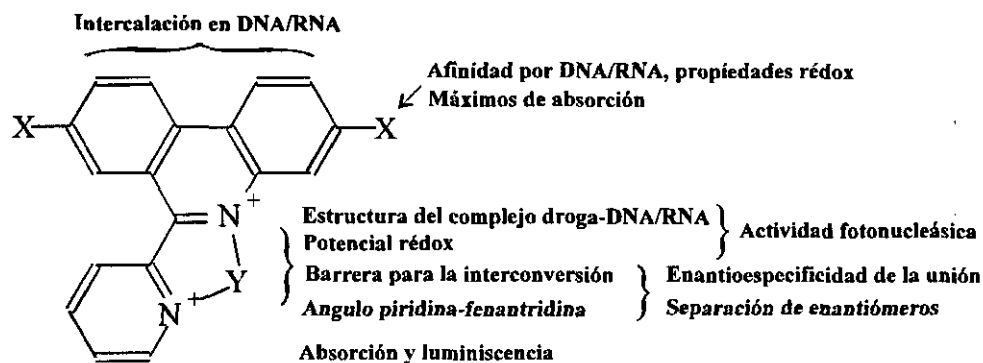


Figura 1.10. Estructura general de los viológenos derivados de *N,N'*-dialquil 6-(2-piridil)fenantridina, mostrando las posiciones modificables para obtener diferentes propiedades fotofísicas, fotoquímicas y de unión a polinucleótidos.

Por otra parte, y considerando la inestabilidad de una conformación en la que la piridina y la fenantridina fueran coplanares, para cada una de estas moléculas existirían dos atropisómeros enantioméricos, correspondientes a orientaciones opuestas de la piridina respecto a la fenantridina donde el nitrógeno de aquella queda a un lado u otro del plano de ésta. Por tanto, estas moléculas serían quirales aunque no posean carbonos asimétricos. En consecuencia, existe la posibilidad de que su unión con ácidos nucleicos sea enantioespecífica, añadiendo propiedades adicionales de especificidad estructural a las anteriores fotofísicas y fotoquímicas.

Una ventaja adicional de esta estructura genérica es que posee múltiples posiciones modificables al objeto de seleccionar sus propiedades redox, fotofísicas y de unión a ácidos nucleicos. Sustituciones en el anillo de fenantridina permitirían controlar la afinidad de la unión por intercalación de la molécula (si la interacción se da por dicho modo), así como sus propiedades redox, de absorción y de luminiscencia. La piridina, suponiendo una unión por intercalación, quedaría en uno de los surcos de una estructura doble- o triple-helicoidal, de modo que tanto la afinidad como la especificidad de secuencia podrían controlarse mediante sustituyentes apropiados en este anillo. Por último, los grupos alquilantes de la piridina y la fenantridina (particularmente si forman parte de una misma cadena dialquilante) permitirían controlar el ángulo entre estos dos anillos, y por tanto las propiedades fotofísicas (absorción y luminiscencia), (foto)redox, la enantioespecificidad de la unión y la barrera para la interconversión entre los enantiómeros (con la posibilidad incluso de separarlos).

En resumidas cuentas, estos viológenos derivados de *N,N'*-dialquil 6-(2-piridil)fenantridina presentan prometedoras capacidades de fotomodificación de ácidos nucleicos (en particular de fotocorte), así como de unión enantioespecífica a los mismos. Muestran además gran versatilidad en cuanto a la posibilidad de diseño "a medida" de candidatos con diferentes propiedades.

1.5 Objetivos

El objetivo de esta tesis es la caracterización de la interacción y fotoquímica con ácidos nucleicos de este nuevo grupo de drogas quirales fotoactivas, los *viológenos derivados de 6-(2-piridil)fenantridina*. La investigación estará orientada principalmente a confirmar la posible actividad fotonucleásica y de formación de fotoaductos de las mismas (y en su caso su mecanismo), así como la existencia de unión enantioespecífica a B-DNA. Este estudio intentará discernir si de hecho esta nueva familia de moléculas es utilizable como herramientas capaces de fotomodificar específicamente estructuras particulares de ácidos nucleicos.

1.6 Metodología

Un total de cinco compuestos se investigarán en este trabajo: dq2pyp, dq3pyp, Me2pyp, dadq2pyp y dadq3pyp (Figura 1.11).

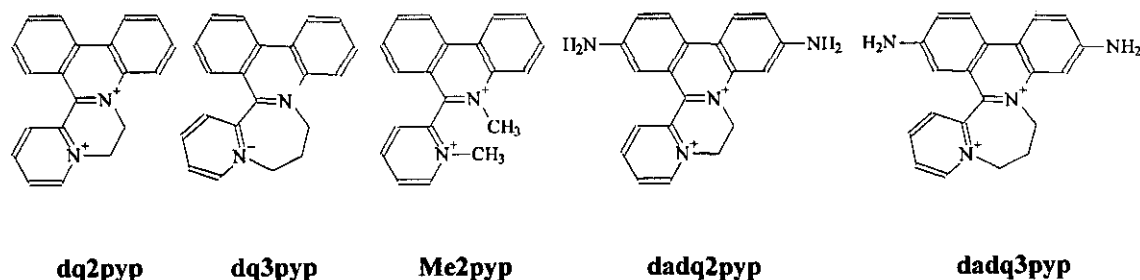


Figura 1.11. Estructura química de las drogas investigadas en este trabajo.

El estudio se realizará en dos etapas; en la primera se estudiarán los compuestos no aminados dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp, cuya síntesis se realizó inicialmente. A partir del análisis de la información obtenida se propondrá una nueva generación de viológenos, que tras ser sintetizados se investigarán comparativamente en la segunda etapa. En la descripción del trabajo, se utilizarán sucesivamente para cada uno de los dos grupos de drogas los siguientes epígrafes:

- **Análisis conformacional de las drogas:** inicialmente es necesario determinar la geometría molecular de mínima energía de las drogas per se, así como estudiar diversos aspectos estructurales y dinámicos de las mismas como por ejemplo su flexibilidad conformacional y las barreras para la interconversión entre enantiómeros. Estos estudios previos son imprescindibles para los posteriores de modelado molecular de los complejos con ácidos nucleicos, y permiten asimismo explicar variaciones observadas en las propiedades redox y espectroscópicas entre los diferentes candidatos a partir de diferencias estructurales entre los mismos. Para estos estudios se utilizarán cálculos cuánticos semiempíricos (hamiltoniano AM-1⁴⁵) y de mecánica molecular (campo de fuerzas AMBER⁴⁶), resonancia magnética nuclear y cinéticas de dicroísmo circular a diferentes temperaturas.
- **Caracterización de la estructura electrónica de las drogas:** la importancia de los estados excitados en la fotoactividad de estos compuestos hace necesario un estudio del número, energías y multiplicidades de los mismos, así como de las polarizaciones y fuerzas de oscilador de las transiciones electrónicas que los originan. Para este fin se utilizarán medidas de absorción UV-visible, luminiscencia en estado estacionario y con resolución temporal, anisotropía de fluorescencia, dicroísmo circular (natural y magnético), que se complementarán con cálculos cuánticos semiempíricos (hamiltoniano INDO/1⁴⁷).
- **Estabilidad y reactividad:** previamente a un estudio experimental de la interacción y fotoquímica de estas drogas con diversos ácidos nucleicos es imprescindible determinar las condiciones experimentales (temperatura, pH, etc) en las cuales la estabilidad de las mismas es máxima. Esta investigación se completa e interpreta con la de la reactividad química de estas moléculas, que a su vez puede ser interesante en la investigación posterior de la fotoquímica con ácidos nucleicos. A este efecto se utilizarán medidas de absorción, resonancia magnética nuclear y voltametría cíclica.
- **Interacción con polinucleótidos:** dado que el fin último es el diseño de drogas dirigidas a ácidos nucleicos, evidentemente es necesario investigar en detalle su unión a estos biopolímeros. Dicho estudio debe pasar por la determinación de la afinidad, modo de unión, especificidad de secuencia, enantioespecificidad (dado que son quirales), efecto de polielectrolito y cinética de la interacción, tanto desde un punto de

vista termodinámico como estructural y dinámico. Esta caracterización se realizará en este trabajo mediante isotermas de unión, cinéticas de flujo detenido, dicroísmo circular, cromatografía de afinidad en fase estacionaria de celulosa-DNA, diálisis, cálculos de mecánica y dinámica molecular, viscosimetría y dicroísmo lineal en flujo.

- **Fotoquímica con ácidos nucleicos:** el otro aspecto a abordar es el de la posible existencia y en su caso el mecanismo de reacciones de fotosensibilización de polinucleótidos, bien sea de fotocorte como de formación de fotoaductos. En este caso se utilizarán medidas de luminiscencia en estado estacionario, electroforesis en geles de agarosa de plásmidos superenrollados irradiados en presencia de las drogas, medidas de absorción y diálisis de complejos droga-polinucleótido irradiados.
- **Discusión:** por último, la información obtenida para cada grupo de drogas servirá para proponer modificaciones dirigidas a la obtención de candidatos mejorados. En el caso del dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp, una de estas modificaciones, dirigida a aumentar la afinidad de unión por intercalación, dió lugar al segundo grupo de drogas: dadq2pyp y dadq3pyp. También se propondrán modificaciones dirigidas a aumentar la estabilidad frente a la temperatura, el pH y la interconversión.

2:Técnicas y materiales

2.1 Técnicas espectroscópicas

2.1.1 Espectroscopía de absorción electrónica

El número, energía y fuerza de oscilador de las transiciones electrónicas de una molécula pueden estudiarse a través de su espectro de absorción. Con ese fin se registraron los espectros de absorción del dq2pyp, dq3pyp, Me2pyp, dadq2pyp y dadq3pyp. Para ello se utilizó un espectrofotómetro GBC UV/VIS 918, con una lámpara de xenon para longitudes de onda visibles y de deuterio para el UV. Las condiciones típicas de recogida de espectros fueron una anchura de rendija de 1 mm, una velocidad de barrido de 200 nm/min, y una resolución de 0.21 nm. A cada espectro se le restó su correspondiente línea base.

2.1.2 Espectroscopía de emisión

2.1.2.1 Medidas de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal

La medida del *rendimiento cuántico de fluorescencia* (Φ_f) de una molécula es fundamental a la hora de evaluar la contribución competitiva con el proceso de fluorescencia de otros procesos de desexcitación no radiativa⁴⁸ (conversión interna, cruce intersistémico, relajación vibracional, apagamiento bimolecular o "quenching" y reacciones fotoquímicas). Para su medida experimental, normalmente se determina el rendimiento cuántico relativo a un estándar conocido, mediante la siguiente expresión:

$$\Phi_f = \Phi_f^r \frac{S}{S_r} \cdot \frac{A_r}{A} \quad (2.1)$$

donde Φ_f^r es el rendimiento cuántico de fluorescencia de la referencia, S y S_r son las áreas bajo los espectros de emisión de la muestra y la referencia, y A_r y A son las

absorbancias de la referencia y muestra, respectivamente, a la longitud de onda de excitación.

El *tiempo de vida* de los estados excitados de una molécula es otra de sus características fundamentales, y su evaluación puede proporcionar información sobre la multiplicidad de los mismos⁴⁸. Este puede ser natural (τ_f^0 , inversa de la constante cinética de emisión espontánea) o de fluorescencia (τ_f , inversa de la constante cinética de despoblación del estado excitado). Ambos se relacionan por la expresión $\Phi_f = \frac{\tau_f}{\tau_f^0}$.

En el presente trabajo, se realizaron medidas de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal para caracterizar los caminos de relajación de los estados electrónicos excitados de las drogas estudiadas, bien por vías radiativas como por apagamiento por ácidos nucleicos o sus componentes. También sirvieron para la determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia de las drogas. Las medidas de fluorescencia en el estado estacionario se realizaron en un fluorímetro Perkin-Elmer LS-50 con interfase a un ordenador IBM PS/55SX para control del instrumento, transferencia de datos y análisis. Los espectros obtenidos fueron corregidos (cuando fue necesario) frente a la respuesta del monocromador y del fotomultiplicador. La temperatura se mantuvo constante a 25.0 ± 0.2 °C mediante un baño termostático circulante Haake D8-GH. En las determinaciones de rendimientos cuánticos se utilizó como referencia bisulfato de quinina 1 N en ácido sulfúrico ($\Phi_f = 0.546$)⁴⁹. Las medidas de fluorescencia con resolución temporal se realizaron en un espectrómetro SPC Edinburgh Instruments FL-900, dotado de una lámpara de descarga de nitrógeno a baja presión pulsada a 40.0 kHz. El control del espectrómetro y del analizador multicanal, así como la recogida de datos (1024 canales) y el análisis de los mismos se realizó mediante un ordenador COP 386SX/20. Las trazas obtenidas se deconvolucionaron por la respuesta instrumental, y las resultantes fueron analizadas mediante un modelo monoexponencial utilizando el programa del instrumento. La bondad del ajuste se comprobó mediante el análisis de los parámetros χ^2 reducido y de Durbin-Watson, así como de la distribución de desviaciones y la función de autocorrelación⁵⁰. La temperatura de la muestra se mantuvo constante a 25.0 ± 0.2 °C mediante un baño termostático circulante Haake D8-GH.

2.1.2.2. Anisotropía de fluorescencia (AF)

La anisotropía de fluorescencia a una longitud de onda λ de excitación se define como la siguiente relación de intensidades de fluorescencia de luz polarizada ($I_{xy}(\lambda)$)⁵¹:

$$AF(\lambda) = \frac{I_{vv}(\lambda) - I_{vh}(\lambda)G(\lambda)}{I_{vv}(\lambda) + 2I_{vh}(\lambda)G(\lambda)} \quad (2.2)$$

donde $G(\lambda)$ es un factor utilizado como corrección instrumental, igual a $I_{hv}(\lambda)/I_{hh}(\lambda)$; el primer subíndice de las intensidades se refiere a la dirección de polarización del polarizador de excitación, mientras que el segundo subíndice se refiere a la del polarizador de emisión. En el caso de una muestra totalmente inmovilizada, puede demostrarse que la anisotropía de fluorescencia viene dada por:⁵¹

$$AF(\lambda) = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta(\lambda) - 1}{2} \right) \quad (2.3)$$

siendo β el ángulo entre el momento de la transición de absorción y el momento de la transición de emisión (en principio aproximadamente paralelo al de la transición de absorción de menor energía). De esta forma, la anisotropía de fluorescencia permite calcular los ángulos entre el primero y sucesivos momentos de transiciones de absorción, si bien no da información acerca de la orientación *absoluta* de los mismos en el sistema de referencia molecular. Dicha información debe obtenerse por estudios de dicroísmo lineal en películas orientadas de polímeros o por cálculos cuánticos. Obsérvese que los valores que puede adoptar la AF se encuentran entre -0.2 (momentos perpendiculares) y +0.4 (momentos paralelos). Por tanto, en principio el espectro de AF de un fluoróforo alcanzará el valor de +0.4 en la región de su banda de absorción de menor energía.

En el presente trabajo, se realizaron espectros de AF al objeto de estudiar el número y polarizaciones de las transiciones electrónicas del dq2pyp y el dq3pyp. Los cuatro espectros de excitación necesarios para obtener el de AF se registraron en un espectrofluorímetro AMINCO SPF-500 de "espectro corregido". En el haz excitador se utilizó un polarizador Glan y en el de emisión uno Polaroid. Las moléculas estudiadas se inmovilizaron en mezclas 7/3 v/v de etilenglicol/agua, mantenidas a 170 K en un criostato con ventanas laterales para permitir el paso de los dos haces de luz perpendiculares. Las intensidades de emisión se midieron a 520 y a 495 nm, respectivamente para dq2pyp y dq3pyp.

2.1.3 Espectroscopía de dicroísmo circular (DC)

2.1.3.1 Dicroísmo circular natural (DC)

El dicroísmo circular de una muestra se define como la diferencia de sus absorciones de luz polarizada circular a izquierdas y derechas:⁵¹

$$DC = A_l - A_d \quad (2.4)$$

La consecuencia es que resulta una luz polarizada elípticamente, y de hecho la elipticidad molar, expresada en $\text{grados} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$, es la unidad usualmente utilizada.

El DC puede aparecer principalmente por dos mecanismos.⁵² El primero, denominado como de "oscilador acoplado", implica la interacción de dos momentos dipolares eléctricos $\vec{\mu}_A$ y $\vec{\mu}_B$ de transiciones electrónicas de sendos cromóforos A y B. En este caso, el DC es proporcional al producto escalar triple :

$$DC \propto \pm \left[\vec{\mathfrak{R}}_{BA} \cdot \vec{\mu}_B \times \vec{\mu}_A \right] \quad (2.5)$$

donde $\vec{\mathfrak{R}}_{AB}$ es el vector que conecta los centros de los dos cromóforos. El segundo mecanismo aparece cuando existe un momento magnético, aparte del eléctrico, asociado a una transición. Ahora el dicroísmo circular es proporcional al producto escalar:

$$DC \propto \vec{\mu}_{if} \cdot \vec{m}_{if}$$

(2.6) siendo \vec{m}_{if} el momento magnético, función de las coordenadas rotacionales electrónicas. Este mecanismo únicamente puede darse en cromóforos quirales; en caso contrario el producto escalar anterior se anula.

El DC de los ácidos nucleicos es debido a ambos mecanismos. Por una parte, asociado a las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ de las bases suele haber un importante momento magnético; por otra parte, existen interacciones entre momentos eléctricos de las bases y azúcares, y de las bases entre sí. El mecanismo de oscilador acoplado asimismo explica la aparición de DC visible en drogas aquirales al unirse a DNA (lo que se denomina *dicroísmo inducido*⁵²).

El perfil de una banda de dicroísmo debe ser similar al de la correspondiente banda de absorción si sólo una transición electrónica contribuye a la misma, y en ausencia de acoplamiento vibrónico y/o excitónico.⁵¹

Los espectros de DC para este trabajo se realizaron en espectropolarímetros Jovin-Ivon y Jasco J-720, este último con accesorio de cubetas termostatzado por efecto Peltier. En este caso, las medidas se realizaron a 25.0 ± 0.1 °C, utilizando una anchura de rendija de 1 nm, un tiempo de respuesta de 1 s, una resolución de 2 nm y una velocidad de barrido de 100 nm/min. En todos los casos se registró previamente la línea base, que se restó del espectro obtenido.

2.1.3.2 Dicroísmo circular magnético (DCM)

Una muestra, ópticamente activa o no, dentro de un campo magnético, presenta DC cuando la dirección de propagación de la luz incidente es paralela a la de dicho campo magnético. Tres términos dan cuenta del DCM.⁵³ Dos de ellos, usualmente denominados con las letras A y C, aparecen únicamente en moléculas con estados fundamental y/o excitados degenerados. El tercer término (B) se da en todas las moléculas, y es debido a la mezcla de niveles de energía como consecuencia del campo magnético. Para dos transiciones cercanas en energía, $0 \rightarrow f$ y $0 \rightarrow k$, con momentos no paralelos y bien separadas de otras transiciones, los correspondiente términos B son similares en magnitud pero de signo opuesto:

$$B(0f) \cong (\nu_k - \nu_f)^{-1} \bar{m}(kf) [\bar{\mu}(0f) \times \bar{\mu}(0f)] \quad (2.7)$$

$$B(0k) \cong (\nu_f - \nu_k)^{-1} \bar{m}(fk) [\bar{\mu}(0f) \times \bar{\mu}(0k)] \quad (2.8)$$

De esta forma el DCM puede utilizarse para determinar si una banda de absorción es debida a una o dos transiciones electrónicas, puesto que en este último caso el espectro de DCM será intenso y aparecerá una sucesión de dos bandas de elipticidad de distintos signos, ambas de similar amplitud.

En el presente trabajo se realizaron espectros de DCM del dq2pyp y dq3pyp al objeto de caracterizar las transiciones electrónicas responsables de sus respectivos espectros de absorción. Los espectros de DCM se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-720 equipado con un imán en el soporte de cubetas. Los espectros de las mezclas racémicas se registraron con orientación norte-sur (NS) y sur-norte (SN) del campo magnético. El espectro SN se restó del NS y el resultado se dividió por dos, para eliminar efectos de DC no generados por el campo magnético. El mismo procedimiento se empleó para el

tampón, que fue después sustraído del espectro de la muestra. El espacio entre los polos magnéticos fue de 2 mm, y el campo magnético efectivo se calibró a partir de la señal de DCM a 510 nm de una disolución estándar de CoSO_4 1 M ($\Delta\epsilon = -1.88 \times \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{T}^{-1}$).⁵⁴ Las condiciones de registro de espectros fueron las mismas que las de los espectros de DC. Un total de 10 espectros fueron promediados por cada medida para aumentar la relación señal/ruido.

2.2 Técnicas para la caracterización experimental de la unión con polinucleótidos

2.2.1 Dicroísmo lineal en flujo (DL)

La geometría de los complejos droga-polinucleótidos puede estudiarse mediante dicroísmo lineal del complejo orientado, por ejemplo vía un flujo hidrodinámico.⁵² El dicroísmo lineal (DL) de una muestra orientada se define como:

$$DL(l) = A_{||}(l) - A_{\perp}(l) \quad (2.9)$$

donde $A_{||}$ y A_{\perp} son, respectivamente, las absorbancias de luz polarizada en planos paralelo y perpendicular a la dirección de orientación. El correspondiente dicroísmo lineal reducido (DL') se obtiene dividiendo la anterior magnitud por la absorción isotrópica (medida en la muestra sin orientar):

$$DL'(\lambda) = \frac{DL(\lambda)}{A_{\text{iso}}(\lambda)} \quad (2.10)$$

La magnitud obtenida es, por tanto, independiente de la concentración y la extinción molar de la muestra. Puede demostrarse que para moléculas con simetría cilíndrica efectiva, como es el caso del DNA, el dicroísmo lineal reducido se puede expresar como el producto de un término orientacional y uno óptico :

$$DL'(\lambda) = S \times O \quad (2.11)$$

donde el término óptico se puede expresar como una función del ángulo formado entre el momento de la transición de absorción i y el eje de la molécula:

$$O = \frac{3 \sum (A_i(\lambda) 3 \cos^2 \alpha_i - 1)}{2 \sum A_i(\lambda)} \quad (2.12)$$

Es conveniente, en el caso de existir múltiples transiciones, hablar de un ángulo efectivo α_{ef} . Dicho ángulo es el promedio entre los distintos ángulos de las diferentes transiciones. El término óptico se puede expresar en función de este ángulo efectivo a través de la siguiente expresión:⁵²

$$O = \frac{3}{2}(3 \cos^2 \alpha_{ef} - 1) \quad (2.13)$$

El DL^f de un B-DNA, en la zona correspondiente a la banda de absorción centrada a 260 nm, es negativo y constante, ya que los momentos de las transiciones de las bases se encuentran en el plano de las mismas, que es aproximadamente perpendicular al eje longitudinal del DNA. Una droga intercalante cuyas transiciones se encuentren en el plano molecular, tendrá por tanto un DL también negativo y constante (y de igual o distinta magnitud que el del DNA según si se intercale paralelamente o no a los pares de bases).

Los espectros de DL se midieron en un espectropolarímetro Jasco J-500. La orientación se obtuvo mediante un gradiente de cizalla creado por una célula de Couette. En esta célula, un cilindro de cuarzo externo rota alrededor de uno interno fijo concéntrico, dotado de una ventana también de cuarzo a través de la cual pasa el haz de luz. La muestra se sitúa en el espacio intermedio, y como consecuencia de la rotación del cilindro externo, las cadenas de DNA se orientan perpendicularmente al eje de giro. El espacio intermedio es de 0.5 mm, por lo que el paso óptico efectivo de la célula es de 1 mm. Los espectros se registraron utilizando una anchura de rendija de 1 nm, con una resolución de 1 nm y a una velocidad de barrido de 100 nm/s. Al espectro registrado se le restó la línea base, obtenida registrando otro espectro en las mismas condiciones que el anterior pero con la muestra no orientada (célula de Couette parada). Por último, el espectro resultante se dividió entre el de absorción obtenido en condiciones similares en un espectrofotómetro Cary 2300, para obtener el dicroísmo reducido. No se corrigió por los diferentes pasos ópticos.

2.2.2 Isotermas de unión

La afinidad, cooperatividad y estequiometría de la interacción de una droga con una macromolécula puede estudiarse realizando isotermas de unión. En el caso de interacciones inespecíficas con polinucleótidos, normalmente se utilizan para su análisis

representaciones de Scatchard,⁵⁵ a las cuales se ajusta la ecuación de McGhee-von Hippel,⁵⁶ bien en su forma no cooperativa:

$$\frac{v}{L} = K_b(1 - nv) \left(\frac{1 - nv}{1 - nv + v} \right)^{n-1} \quad (2.14)$$

como en su forma cooperativa:

$$\frac{v}{L} = K_b(1 - nv) \left(\frac{(2\omega - 1)(1 - nv) + v - R}{2(\omega - 1)(1 - nv)} \right)^{n-1} \left(\frac{1 - (n+1)v + R}{-2(1 - nv)} \right)^2 \quad (2.15)$$

donde

$$R = \sqrt{\{1 - (n+1)v\}^2 + 4\omega v(1 - nv)} \quad (2.16)$$

En las anteriores ecuaciones, v es la función de saturación (es decir, la concentración de ligando unido dividida por la concentración de pares de bases totales), L es la concentración de ligando libre, K_b es la constante de asociación a un sitio aislado, n es el número de pares de bases que forman un sitio de unión, y ω es la constante de cooperatividad (que mide la tendencia de los ligandos para unirse contiguamente). Estas ecuaciones tienen en cuenta el solapamiento de sitios de unión debido a la inespecificidad de la interacción, y consideran al polinucleótido como una red unidimensional infinita.

Debido a la naturaleza polielectrolítica de los ácidos nucleicos y a su alta densidad de carga, existe una alta concentración local de contraiones alrededor de los mismos. Como consecuencia, la unión de ligandos catiónicos y/o que aumenten el espaciado entre los fosfatos, es conducida termodinámicamente por la liberación simultánea del polinucleótido de contraiones a favor de gradiente (efecto de polielectrolito), y depende de las condiciones iónicas del medio.¹⁷ La teoría molecular de la condensación de contraiones en polielectrolitos^{57,58} ha sido adaptada con éxito a la descripción termodinámica de la interacción de ligandos con ácidos nucleicos por parte de Record y colaboradores.^{17,59} Según la misma, la dependencia de m con la concentración de sal monovalente para un ligando que forme pares iónicos con el polinucleótido, viene dada por:

$$\frac{\partial \log K}{\partial \log [M^+]} = -m\psi = -m(\psi_c + \psi_s) \quad (2.17)$$

En la anterior ecuación, $[M^+]$ es la concentración de contraión monovalente, y ψ es la fracción de contraiones asociada por carga del polielectrolito, bien condensados (ψ_c), bien unidos por interacción de tipo Debye-Huckel (ψ_s). En el B-DNA $\psi_c = 0.76$ y $\psi_s = 0.12$, lo que rinde un valor para ψ de 0.88. Debido al pequeño tamaño de las drogas, en su caso m suele ser aproximadamente igual a la carga de las mismas. La anterior fórmula no tiene en cuenta cambios conformacionales en el polielectrolito que alteren el espaciado entre sus cargas, como sería el caso de una droga intercalante. Considerando el cambio conformacional provocado por la generación de un sitio de intercalación, la dependencia anterior se transforma en:^{60,61}

$$\frac{\partial \log K}{\partial \log [M^+]} = -2n(\psi - \psi^*) - m\psi^* \quad (2.18)$$

donde ψ^* es la fracción de contraiones asociados por carga del polielectrolito *en el sitio de intercalación* (cuyo valor predicho teóricamente es de 0.82), y n es el número de pares de bases afectados (2 si se supone un modelo de exclusión por vecino).

La energía libre de unión a una determinada concentración de sal puede obtenerse a partir de la correspondiente constante de asociación (K_b) en dichas condiciones: $\Delta G^0 = -RT \ln K_b$. Esta energía libre puede ser dividida en dos contribuciones:

$$\Delta G^0 = \Delta G_{ep} + \Delta G_{nep} \quad (2.19)$$

siendo ΔG_{ep} la contribución del efecto de polielectrolito, y ΔG_{nep} la energía libre de unión restante (referida a un estado estándar de concentración 1 M de sal monovalente, $M^+ X$). La primera contribución puede estimarse a cualquier concentración de sal a partir de la pendiente (S) de una representación de $\log K_b$ vs. $\log [M^+]$, siendo $\Delta G_{ep} = SRT \ln [MX]$.¹⁷ La energía libre restante contendrá, por su parte, contribuciones debidas a interacciones de van der Waals, efecto hidrofóbico, enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas.

Las isotermas de unión realizadas en este trabajo se obtuvieron mediante titulaciones espectrofotométricas en el visible de la droga con polinucleótido, en un espectrofotómetro GBC 918 con accesorio de cubetas termostatazadas por efecto Peltier. Las concentraciones de ligando libre y unido se determinaron en las primeras a partir de la absorción en el máximo de absorción en el visible A_{obs}^{λ} , previa determinación del

coeficiente de extinción de la droga a esa longitud de onda en presencia de un exceso de ácido nucleico (ϵ_b^λ), y utilizando la expresión:

$$C_b = \frac{C_T \epsilon_f^\lambda - A_{obs}^\lambda}{\epsilon_f^\lambda - \epsilon_b^\lambda} \quad (2.20)$$

donde ϵ_f^λ es el coeficiente de extinción molar a esa longitud de onda de la droga en ausencia de ácido nucleico, es decir, de la droga libre. En todos los casos se mantuvo la temperatura a 25.0 ± 0.1 °C, dejando a la muestra equilibrarse durante unos minutos tras cada adición. Un total de 5-10 titulaciones se emplearon para elaborar cada isoterma de unión, a distintas relaciones droga/polinucleótido, al objeto de tener el máximo rango de saturaciones. Tras construir las representaciones de Scatchard, los parámetros de McGhee-von Hippel se estimaron mediante el ajuste de la ecuación no cooperativa utilizando el algoritmo de Marquardt implementado en el programa FIGP, o bien de la cooperativa mediante un programa desarrollado en nuestro laboratorio para tal fin.

2.2.3 Viscosimetría

La unión por intercalación de una droga a un polinucleótido puede probarse mediante titulaciones viscosimétricas del ácido nucleico con la droga. Si existe intercalación, la longitud del polinucleótido (L_0 cuando está libre) aumentará (L) al unirse la droga, lo cual se reflejará en un incremento de la viscosidad de la disolución:

$$\frac{L}{L_0} = \left(\frac{\eta}{\eta_0} \right)^{1/3} \quad (2.21)$$

siendo en la anterior ecuación η_0 y η la viscosidad del polinucleótido libre y unido a droga, respectivamente. Cohen y Eisenberg mostraron que para moléculas de polinucleótido suficientemente cortas (de tamaños igual o menores a su longitud de persistencia) existe una relación lineal entre la saturación del polinucleótido y la raíz cúbica de la viscosidad reducida.⁶²

$$\left(\frac{\eta}{\eta_0} \right)^{1/3} = 1 + \hat{m} \nu \quad (2.22)$$

donde la constante de proporcionalidad m es el denominado *parámetro de extensión* de la hélice. Aunque en la teoría original de Cohen y Eisenberg el valor de m era

exactamente 1.0, en la práctica es posible observar pendientes menores, cuyo valor depende de la estructura particular de la droga. Este hecho fue racionalizado por Gabbay y colaboradores a través del *modelo de intercalación no clásica*.⁶³ Según este modelo, una droga que se intercale de forma asimétrica y/o parcial en la doble hélice producirá, junto con el alargamiento típico de la cadena, una curvatura en la misma, de modo que la longitud hidrodinámica final (y por tanto la viscosidad) será inferior que la prevista para un intercalante "clásico".

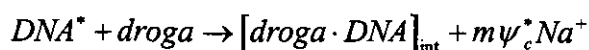
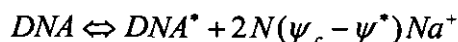
Las medidas de viscosidad para este trabajo se realizaron en un viscosímetro capilar de tipo Ubbelohde (Schott) equipado con un controlador automático para bombeo y medida de la velocidad de caída (Lauda VB2), y sumergido en un baño termostático de agua (Lauda CD15) a 25.1 ± 0.05 °C. Las titulaciones consistieron en la adición de alícuotas de una disolución concentrada de droga a muestras de DNA/RNA de aproximadamente 6×10^{-4} M. Las viscosidades relativas se calcularon a partir de la expresión $\eta = (t - t^0)/t^0$, donde t es el tiempo de caída de la muestra, y t^0 el tiempo de caída del tampón. Las titulaciones viscosimétricas se analizaron mediante representaciones de viscosidad reducida (η/η_0) vs. relaciones droga/polinucleótido, o bien, de acuerdo con la teoría de Cohen y Eisenberg,⁶² representando $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. v .

2.2.4 Cinéticas de flujo detenido

El estudio de la cinética de la interacción de una droga con un polinucleótido puede aportar información adicional sobre la misma aparte de la obtenida a partir de estudios en equilibrio. Una técnica cinética comúnmente utilizada para este tipo de sistemas es la de flujo detenido (*stopped-flow*), y es la que se adoptó en este trabajo.

Al igual que ocurría con las constantes de equilibrio de asociación K_b , las constantes cinéticas de interacción de ligandos con polinucleótidos dependen de la concentración de sal, dada la naturaleza polielectrolítica de estos biopolímeros. De nuevo la teoría de la condensación de contraiones en polielectrolitos ha sido aplicada con éxito para describir estas dependencias, y el análisis de las mismas con dicho formalismo ha demostrado ser de gran utilidad en el estudio del mecanismo de unión de ligandos a polinucleótidos.^{64,65,61} En el caso de drogas intercalantes Wilson *et al.*⁶¹ propusieron dos modelos, que a continuación se describen, para describir las dependencias con la concentración de sal.

Modelo 1. Unión directa. Inicialmente se produce la apertura de la doble hélice. Este paso es muy rápido con relación a los restantes, por lo que se alcanza rápidamente una situación de *preequilibrio*. Se sigue la intercalación de la droga, que constituye el paso lento del proceso:



donde DNA^* representa la unidad cooperativa de DNA "abierto", N el número de pares de bases que forman el sitio de intercalación (2 siguiendo un modelo de exclusión vecina), ψ_c y ψ_c^* son las fracciones de contraiones condensados por fosfato en el DNA nativo y abierto (0.76 y 0.64, respectivamente) y $[droga \cdot DNA]_{int}$ representa el complejo de intercalación.

La dependencia resultante para la constante de asociación es :

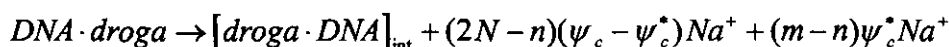
$$\frac{\partial \log K_a}{\partial \log [Na^+]} = -2N(\psi_c - \psi_c^*) - m\psi_s \quad (2.23)$$

y para la de disociación es :

$$\frac{\partial \log K_a}{\partial \log [Na^+]} = -m\psi_s + m\psi_s^* + 2N(\psi_s - \psi_s^*) \quad (2.24)$$

donde ψ_s y ψ_s^* son las fracciones de contraiones unidos por fosfato vía interacción de Debye-Huckel en el DNA nativo y "abierto", respectivamente.

Modelo 2. Unión mediada por condensación. En un primer momento la droga se une por condensación al DNA, con la consiguiente liberación de iones Na^+ (paso de preequilibrio), y posteriormente se abre el DNA, intercalándose la droga (paso lento) :



En las anteriores reacciones, $DNA \cdot droga$ representa el complejo electrostático droga-DNA, y n es el número de pares iónicos formados en dicho complejo. El valor de este último parámetro puede considerarse igual al número de pares iónicos formados en el

complejo de intercalación ($n = m$), o bien igual a 0.76, tal y como se esperaría de una asociación por simple condensación.

La dependencia para la constante de asociación es :

$$\frac{\partial \log k_a}{\partial \log [Na^+]} = -n\psi \quad (2.25)$$

y para la de disociación es :

$$\frac{\partial \log k_a}{\partial \log [Na^+]} = -n\psi + 2N(\psi - \psi^*) + m\psi^* \quad (2.26)$$

La comparación de las pendientes de las constantes de asociación y disociación experimentales con las teóricas de uno y otro modelo permiten discernir cuál describe mejor el mecanismo de unión de la droga estudiada.

Las cinéticas de disociación para este trabajo se realizaron en un aparato de flujo detenido Hi-Tech SF-40, con una interfase a un ordenador Tandon 386/20 a través de un convertidor analógico/digital de 12 bits, y controlado mediante el programa Rapid Kinetics del instrumento. La temperatura se mantuvo constante a 25.0 ± 0.1 °C mediante un baño termostatizado en el cual se encontraba sumergida la cámara de mezcla. El experimento típico consistía en la mezcla de 100 mL de complejo droga-DNA (a una relación de concentraciones de 10 pb/(molécula de droga), para asegurar la total unión de la droga) con el mismo volumen de una disolución de SDS al 1%. En el caso del dq2pyp, la reacción se registró a través del incremento de la intensidad de fluorescencia a longitudes de onda ≥ 435 nm; como fuente de luz se utilizó una lámpara Oriel de xenon (150 W) con un filtro de paso de banda a 360 nm. En el caso del dadq2pyp, y debido a que no presenta luminiscencia, se midieron los cambios de absorbancia a 317 nm de la muestra; como fuente de luz se utilizó la lámpara de UV del aparato. En ambos casos, por cada traza se recogieron 512 puntos, utilizando una constante de tiempo de cero. Al objeto de mejorar la relación señal/ruido, para cada experimento se promediaron de diez a quince trazas, y la resultante se analizó con el programa *Rapid Kinetics* del instrumento mediante un modelo monoexponencial o biexponencial. La bondad del ajuste se comprobó mediante el parámetro χ^2 y la distribución de las desviaciones.

2.3 Técnicas de modelado molecular

2.3.1. Cálculos cuánticos

Para calcular cualquier propiedad molecular G a partir de primeros principios, es necesario resolver la ecuación de Schrödinger molecular, y a continuación calcular el valor promedio de la propiedad a partir de:⁶⁶

$$\langle G \rangle = \int \psi^* \hat{G} \psi \, d\tau = \langle \psi | \hat{G} | \psi \rangle \quad (2.27)$$

donde G es el operador asociado a dicha propiedad y ψ es la función de onda obtenida por resolución de la ecuación de Schrödinger. El método comúnmente utilizado para dicha resolución en átomos y moléculas es el denominado del *campo autoconsistente* o de *Hartree-Fock*. Según dicho método, la función de estado es aproximada por un producto antisimetrizado (en forma de determinante de Slater) de orbitales-espín. En dicho caso, puede demostrarse que los mejores orbitales espaciales ϕ_i satisfacen las ecuaciones de Hartree-Fock siguientes:

$$\hat{F}(1)\phi_i(1) = \varepsilon_i \phi_i(1) \quad (2.28)$$

$$\hat{F}(1) = \hat{H}_{core} + \sum_j [2\hat{J}_j(1) - \hat{K}_j(1)] \quad (2.29)$$

$$\hat{H}_{core} = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla_1^2 - \sum_\lambda Z_\lambda \frac{e^2}{r_{1\lambda}} \quad (2.30)$$

$$\hat{J}_j(1)\phi_i(1) = \phi_i(1) \int |\phi_j(2)|^2 \frac{e^2}{r_{1\lambda}} \, dv_2 \quad (2.31)$$

$$\hat{K}_j(1)\phi_i(1) = \phi_j(1) \int \phi_j^*(2)\phi_i(2) \frac{e^2}{r_{1\lambda}} \, dv_2 \quad (2.32)$$

En las anteriores ecuaciones, \hat{F} , \hat{H}_{core} , \hat{J}_j y \hat{K}_j son respectivamente los operadores de Hartree-Fock, hamiltoniano del "core", de Coulomb y de intercambio. \hat{H}_{core} contiene términos de energía cinética del electrón y de atracción electrón-núcleo, y \hat{K}_j es un término debido al uso de una función de onda antisimétrica. Por último, \hat{J}_j corresponde a la interacción de la carga puntual del electrón 1 con la nube de carga de densidad $e|\phi_j(2)|^2$ de electrón 2 (se consideran interacciones interelectrónicas promediadas, en vez

de instantáneas). Debido a que \hat{F} es función de los orbitales espaciales, la resolución se hace de forma iterativa. En la práctica se utiliza un procedimiento ideado por Roothaan, que implica la resolución iterativa de sistemas de ecuaciones lineales. Cada orbital espacial ϕ_i se expresa como una combinación lineal de un conjunto de funciones de base g_k :

$$\phi_i = \sum_k c_{ik} g_k \quad (2.33)$$

Sustituyendo esta expresión en las ecuaciones de Hartree-Fock, multiplicando por g_j^* e integrando sobre todo el espacio, se llega al siguiente sistema homogéneo de las variables c_{ik} :

$$\sum_k (F_{jk} - \varepsilon_i S_{jk}) c_{ik} = 0; \quad j = 1, 2, 3, \dots \quad (2.34)$$

$$\text{donde } F_{jk} = \langle g_j | \hat{F} | g_k \rangle, \quad S_{jk} = \langle g_j | g_k \rangle \quad (2.35)$$

Para obtener una solución distinta de la trivial, el determinante de los coeficientes debe anularse:

$$\det(F_{jk} - \varepsilon_i S_{jk}) = 0 \quad (2.36)$$

Se comienza dando valores iniciales al conjunto de coeficientes c_{ik} , a partir de los cuales se obtienen unos orbitales ϕ_i iniciales. Con estos orbitales se define el operador F correspondiente a la iteración. Se calculan entonces las integrales F_{jk} y S_{jk} , y se resuelve el determinante anterior, obteniéndose un conjunto de soluciones ε_i . Sustituyendo cada una de ellas en la ecuación (2.34) se llega a un nuevo conjunto de coeficientes c_{ik} . El proceso se repite hasta que se cumple un determinado criterio de convergencia.

A la hora de describir aceptablemente estados excitados, es necesario considerar la interacción entre configuraciones excitadas. Esto se consigue haciendo adicionalmente un cálculo de *interacción de configuraciones*. La función de onda se expresa como combinación lineal de determinantes de Slater correspondientes tanto al estado fundamental como a configuraciones excitadas:

$$\psi = \sum_i c_i \Phi_i \quad (2.37)$$

y a continuación se optimiza esta función utilizando el método de variaciones. Dado que se trata de una función variacional lineal, dicha optimización pasa por la resolución de la correspondiente ecuación secular:

$$\det(H_{ij} - ES_{ij}) = 0 \quad (2.38)$$

$$H_{ij} = \langle \Phi_i | \hat{H} | \Phi_j \rangle, \quad S_{ij} = \langle \Phi_i | \Phi_j \rangle \quad (2.39)$$

Las soluciones E_0, E_1, E_2, \dots de esta ecuación son límites superiores a las energías de los primeros estados de la molécula, y a partir de ellas se obtienen las correspondientes funciones de onda moleculares.

Existen dos tipos de cálculos cuánticos moleculares. En los cálculos *ab initio* se emplea el hamiltoniano molecular completo, sin introducir ningún parámetro experimental. Por el contrario, los métodos *semiempíricos* utilizan un hamiltoniano simplificado, con términos con parámetros obtenidos por ajuste a los datos experimentales. En este trabajo se utilizaron métodos del segundo tipo, dada su mayor rapidez y el tamaño de las moléculas estudiadas. Concretamente, para la optimización de geometrías moleculares de las drogas se utilizó el hamiltoniano AM-1,⁴⁵ implementado en el programa MOPAC 6.0 y empleando el minimizador EF.⁶⁷ Los contornos de orbitales moleculares y de densidad electrónica se calcularon con el programa DENSITY utilizando la salida de los anteriores cálculos. Las cargas parciales puntuales utilizadas en los cálculos de mecánica molecular (vide infra) se obtuvieron por ajuste al potencial electrostático molecular calculado utilizando el hamiltoniano MNDO⁶⁸ implementado en MOPAC 6.0 y utilizando la opción ESP⁶⁹ con las geometrías moleculares previamente obtenidas: el modelo de cargas puntuales se ajustó al potencial electrostático calculado en cuatro capas de Connolly a 1.4, 1.6, 1.8 y 2 veces el radio de van der Waals, con una densidad de 5 puntos por Å². Para el cálculo de momentos dipolares de transiciones electrónicas se realizaron cálculos de interacción de configuraciones (200 configuraciones) utilizando el hamiltoniano INDO/1⁴⁷ implementado en el programa ZINDO, y de nuevo sobre las geometrías moleculares resultantes de la optimización con AM-1; las integrales de repulsión de dos centros se aproximaron por el esquema de Mataga-Nishimoto.⁷⁰ En todos los casos se realizaron cálculos de Hartree-Fock restringidos (RHF o "restricted Hartree-Fock"). Los programas MOPAC 6.0 y ZINDO

se emplearon como módulos del programa InsightII (Biosym Technologies). Todo este trabajo se realizó en estaciones de trabajo Silicon Graphics IRIS4D/310, Indigo, Indigo2 e Indy.

2.3.2 Mecánica y dinámica molecular

Los anteriores métodos cuánticos de optimización de geometrías moleculares se basan últimamente en la resolución de la ecuación de Schrödinger para diferentes coordenadas nucleares, con las consiguientes evaluaciones de la energía potencial nuclear o *superficie de energía potencial* y su gradiente. Una aproximación alternativa consiste en utilizar para estas evaluaciones un ajuste empírico de una función previamente postulada, eliminando así la necesidad de resolver la ecuación de Schrödinger en cada evaluación. Este ajuste empírico es lo que se llama *campo de fuerzas*. Por ejemplo, el campo de fuerzas AMBER⁴⁶ (*Assisted Model Building and Energy Refinement*, utilizado en esta tesis), fue desarrollado para la simulación de proteínas y ácidos nucleicos, y utiliza la siguiente expresión para la energía potencial:

$$E_{pot}(R) = \sum_b K_2 (b - b_0)^2 + \sum_\theta H_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_\phi \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \phi_0)] + \sum \varepsilon [(r^*/r)^{12} - 2((r^*/r)^6)] + \sum q_i q_j / \varepsilon_{ij} r_{ij} + \sum \left[\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right] \quad (2.40)$$

En la anterior ecuación, \mathbf{R} es el vector de coordenadas nucleares. Los dos primeros términos dan cuenta respectivamente de las distancias y ángulos de enlace, mientras que el tercero lo hace de los ángulos diedros; el cuarto y quinto términos representan respectivamente las interacciones de van der Waals y electrostáticas. Por último, el sexto término corresponde a enlaces de hidrógeno. La utilización de un campo de fuerzas permite ahorrar gran cantidad de tiempo de cálculo y, por tanto, simular sistemas moleculares con mayores números de átomos que los abordables por los métodos cuánticos, incluso los semiempíricos. Como contrapartida, ni las propiedades electrónicas ni las reacciones químicas pueden ser estudiadas con esta aproximación, puesto que en ella no se consideran explícitamente los electrones.

En las minimizaciones de energía molecular, tanto en los métodos cuánticos como en los de campo de fuerzas, se utilizan diferentes algoritmos de optimización. En estos últimos, los algoritmos más comúnmente utilizados (y utilizados en este trabajo) son los

de descenso más pronunciado y de gradientes conjugados. En el primero, en cada iteración se evalúa la energía en puntos sucesivos de la recta definida por el gradiente de la energía en el punto actual y dicho punto, es decir :

$$E(\{x'_i\}) = E\left(\left\{x_i^0 + \alpha \frac{\partial E}{\partial x_i} \Big|_{\{x_i^0\}}\right\}\right) \quad (2.41)$$

donde $\{x_i^0\}$ representa el conjunto de coordenadas nucleares actuales, $\{x_i\}$ los diferentes puntos probados dentro de la recta y α es un parámetro creciente a medida que se evalúan puntos más alejados del actual. Al encontrarse un punto de menor energía, se adopta como nuevas coordenadas.

En el algoritmo de gradientes conjugados, la recta en la cual se evalúa la energía viene definida por el punto actual y el vector :

$$\mathbf{h}_n = \nabla E_n + \frac{\nabla E_n \cdot \nabla E_{n-1}}{\nabla E_{n-1} \cdot \nabla E_{n-1}} \mathbf{h}_{n-1} \quad (2.42)$$

donde \mathbf{h}_{n-1} , y ∇E_{n-1} representan, respectivamente, el vector de dirección y el gradiente de la energía en la iteración previa ($n-1$). La utilización de esta combinación lineal en lugar del gradiente asegura una convergencia más rápida.

Como criterio de convergencia en las minimizaciones se suele utilizar la raíz cuadrada de la media de los cuadrados de las derivadas parciales ("RMSder", de "root mean square derivatives").

Dentro de la aproximación de campo de fuerzas, el método de la *dinámica molecular* consiste en la integración numérica de las ecuaciones de movimiento newtonianas correspondientes a la superficie de energía potencial del sistema molecular:

$$\mathbf{f} = -\nabla E(\mathbf{R}) = \mathbf{m} \frac{d^2 \mathbf{R}}{dt^2} \quad (2.43)$$

donde \mathbf{f} es el vector de fuerzas que actúan sobre los átomos, y \mathbf{m} es la matriz de masas puntuales atómicas. A partir de esta integración, se genera una trayectoria en el espacio de fases del sistema, cuyo análisis permite estudiar las propiedades dinámicas y termodinámicas del sistema.

El algoritmo de integración utilizado en este trabajo es el denominado *leap-frog*⁷¹. A partir de unas coordenadas $\{x_i(t)\}$, velocidades $\{v_i(t-\Delta t/2)\}$ y aceleraciones $\{a_i(t)\}$ a tiempos t , $t-\Delta t/2$ y t , respectivamente, se calcula :

$$v_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v_i\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \Delta t a_i(t) \quad (2.44)$$

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + \Delta t v_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \quad (2.45)$$

$$a_i(t + \Delta t) = -\frac{dE(\mathbf{R})}{dr_i} \frac{1}{m_i} \quad (2.46)$$

Las nuevas coordenadas, velocidades y aceleraciones sirven para calcular las siguientes, y así sucesivamente. Lógicamente, se necesitan unas coordenadas y velocidades iniciales. Las primeras se suelen obtener como resultado de una minimización del sistema molecular estudiado, y las segundas suelen ser generadas aleatoriamente siguiendo una distribución de Maxwell-Boltzmann a la temperatura a la cual se simula la dinámica molecular.

Una técnica adicional de campo de fuerzas muy útil al modelar interacciones de ligandos con macromoléculas es la de *ensamblado* ("docking"). Esta técnica consiste en la evaluación de la energía intermolecular no enlazante entre el ligando y la macromolécula a medida que se varían, manual o automáticamente, las posiciones relativas entre ambos. De esta forma, es posible encontrar posicionamientos del ligando en la macromolécula de mínima energía intermolecular. En este trabajo, como energía intermolecular se utilizó la parte no enlazada del campo de fuerzas AMBER (ver 2.3.2.1) sin términos de enlaces de hidrógeno, sólo considerando interacciones de van der Waals y electrostáticas.

2.3.2.1 Modelado de los complejos DNA-droga

En todos los estudios de ensamblado ("docking"), minimizaciones de energía y simulaciones de dinámica molecular realizados en este trabajo se utilizó la versión de átomos completos ("all-atom") del campo de fuerzas AMBER, completada con los parámetros adicionales para las drogas previamente descritos. Debido a que en ningún caso se utilizó una solvatación explícita, como sustituto siempre se empleó una función

dieléctrica dependiente de distancia del tipo $\epsilon=4r$ para considerarla implícitamente. En ningún momento se utilizaron cortes ("cutoffs") para las interacciones no enlazantes.

Se contruyeron hexa- y deca(desoxi)nucleótidos doble helicoidal en conformaciones A o B y con diversas secuencias mediante el módulo Biopolymer de InsightII 95.0 (Biosym Technologies). Se creó un sitio de intercalación en el par de bases central de dichas secuencias mediante minimizaciones de energía restringidas empleando el módulo Discover de Insight 95.0. Inicialmente se sometió al correspondiente oligonucleótido a 1500 iteraciones de gradientes conjugados con los átomos pesados de los dos pares de nucleótidos centrales forzados (*template forcing*) a adoptar la estructura de los equivalentes presentes en el cristal de CpG-etidio.⁷² Cuando se modelaron otras secuencias, las estructuras a las cuales fueron forzados los dos pares de nucleótidos centrales fueron aquellas generadas a partir del cristal mediante las sustituciones de bases apropiadas. Simultáneamente, se restringieron con potenciales armónicos los enlaces de hidrógeno de Watson-Crick del resto de pares de bases, al objeto de mantener la estructura doble-helicoidal del oligonucleótido. A continuación se eliminó el forzamiento anteriormente comentado y se fijaron las cuatro bases del sitio de intercalación, y el sistema fue minimizado mediante 500 iteraciones adicionales de gradientes conjugados. Finalmente, se eliminaron todas las restricciones y se minimizó el sistema mediante 500 iteraciones de gradientes conjugados. Estas dos últimas minimizaciones tuvieron como objetivo el adaptar el esqueleto azúcar-fosfato observado en el cristal a la influencia de una secuencia más larga. Sin embargo, este procedimiento tiene la desventaja de que provoca cierta disminución de la distancia fosfato-fosfato en el sitio de intercalación. Si bien para el dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp esto no constituye ningún problema, puesto que aún así no rellenan completamente el espacio del sitio de intercalación, en el caso del dadq2pyp, dadq3pyp y propidio impide un ensamblaje apropiado en el mismo. Al modelar los complejos de estas drogas, los correspondientes sitios de intercalación se crearon sin las dos últimas minimizaciones.

Posteriormente se ensambló la droga en el sitio de intercalación manualmente, buscando minimizar las interacciones no enlazantes (electrostática y de van der Waals) mediante el programa Docking. Entonces se minimizó el complejo, inicialmente mediante 600 iteraciones de minimización por máximas pendientes con los átomos de fósforo fijos,

y finalmente y sin ninguna restricción, mediante gradientes conjugados hasta alcanzar la convergencia (RMSder 0.001 kcal/mol Å⁻¹).

Las energías de unión ΔE se calcularon como $\Delta E = \Delta E_{in} + \Delta E_{hg} + \Delta E_{dd}$. En la anterior expresión, E_{in} es la energía de interacción no enlazante droga-oligonucleótido en el complejo minimizado, E_{hd} es la energía de desestabilización de la hélice (energía del DNA en el complejo menos energía de la correspondiente secuencia en conformación A/B minimizada), y E_{dd} es la energía de desestabilización de la droga (energía de la droga en el complejo menos energía de la droga aislada minimizada).

Las simulaciones de dinámica molecular in vacuo y a temperatura constante se realizaron utilizando como coordenadas iniciales las estructuras de los complejos previamente minimizados, y con el objetivo de investigar la flexibilidad conformacional y movilidad de las distintas drogas en los distintos sitio de intercalación. Inicialmente se calentó el sistema hasta 300 K a través de diez incrementos de 30 K en etapas de 2 ps, resultando una fase inicial de calentamiento de 20 ps. Durante cada etapa las velocidades iniciales se asignaron aleatoriamente siguiendo una distribución de Maxwell-Boltzmann para la temperatura correspondiente. A continuación, se computaron un total de 100 ps a 300 K, y las coordenadas fueron salvadas al final de cada ps de simulación, resultando en un colectivo de 100 conformaciones en la fase de producción. La temperatura se mantuvo constante en todas estas etapas mediante escalado directo de las velocidades. La movilidad de la droga en el sitio de intercalación se caracterizó a través del máximo desplazamiento cuadrático medio (MSD, "mean-square-displacement") de la conformación inicial alcanzado durante la fase de producción. Para la conformación τ , el MSD se define como :

$$MSD = \frac{1}{n - \tau} \sum_{j=0}^{n-\tau} [\tau_i(\tau + j) - \tau_{i(j)}]^2 \quad (2.47)$$

donde n es la última conformación.

Las estructuras resultantes de los cálculos de mecánica y dinámica molecular fueron analizadas en cuanto a energías y geometrías con InsightII 95.0, y con NewHel93 y Curves 4.1 en cuanto a parámetros torsionales y helicoidales.

Todos estos cálculos se realizaron en estaciones de trabajo Silicon Graphics IRIS4D/310, Indigo, Indigo 2 e Indy.

2.3.2.2 Parametrización de las drogas

Dada la ausencia de estructuras cristalográficas de estas drogas, a la hora de parametrizar se tomaron como referencia las estructuras optimizadas por AM-1. Esta elección fue motivada por los excelentes resultados obtenidos con este hamiltoniano en moléculas relacionadas de estructura cristalográfica conocida. Así, la RMSdev del etidio optimizado por AM-1 con el presente en el cristal de CpG-etidio⁷² es de 0.02 Å, y el ángulo entre la fenantridina y el fenilo es 85.12° y 86.2°, en uno y otro caso. El ángulo diedro piridina-piridina predicho para el diquat es de 21.2°, mientras que los observados en dos cristales diferentes⁷³ son de 19.7° y 20.4°. Este buen acuerdo indica la habilidad de este hamiltoniano para reproducir geometrías moleculares, y justifica el uso de las resultantes de optimizaciones con el mismo como modelo para la parametrización de las drogas en ausencia de estructuras cristalográficas, y como entrada en los cálculos espectroscópicos.

La parametrización se basó principalmente en la realizada por Lybrand y Kollman para el etidio (de hecho algunos parámetros se tomaron de los allí por primera vez derivados) y tuvo como objetivo la minimización de la RMSdev entre las coordenadas "AM-1" y "AMBER", así como la reproducción del ángulo piridina-fenantridina "AM-1". Considerando que todas las moléculas estudiadas están íntimamente relacionadas, se buscó un ajuste global, evitando crear tipos de átomos o parámetros sólo utilizables para moléculas particulares dentro del grupo.

La asignación de tipos de átomos se muestra en la Figura 2.1. Los parámetros no presentes en el campo de fuerzas AMBER se recogen en la Tabla 2.I. Tal y como se dijo en el apartado 2.3.1, las cargas parciales se obtuvieron por ajuste al potencial electrostático molecular obtenido a partir de una función de onda MNDO. Estas cargas se muestran en Figura 2.2.

Tabla 2.I. Parámetros adicionales del campo de fuerzas AMBER obtenidos por interpolación o analogía para las drogas estudiadas en este trabajo.

Tipos de átomos	b ₀ /Å	k ₀ /kcal·mol ⁻¹ ·Å ⁻²
CG-CC	1.49	342

Tipos de átomos	θ ₀	k ₀ /kcal·mol ⁻¹ ·grado ⁻²
CG-N-CA	120	85
CG-N-CA-N	120	85

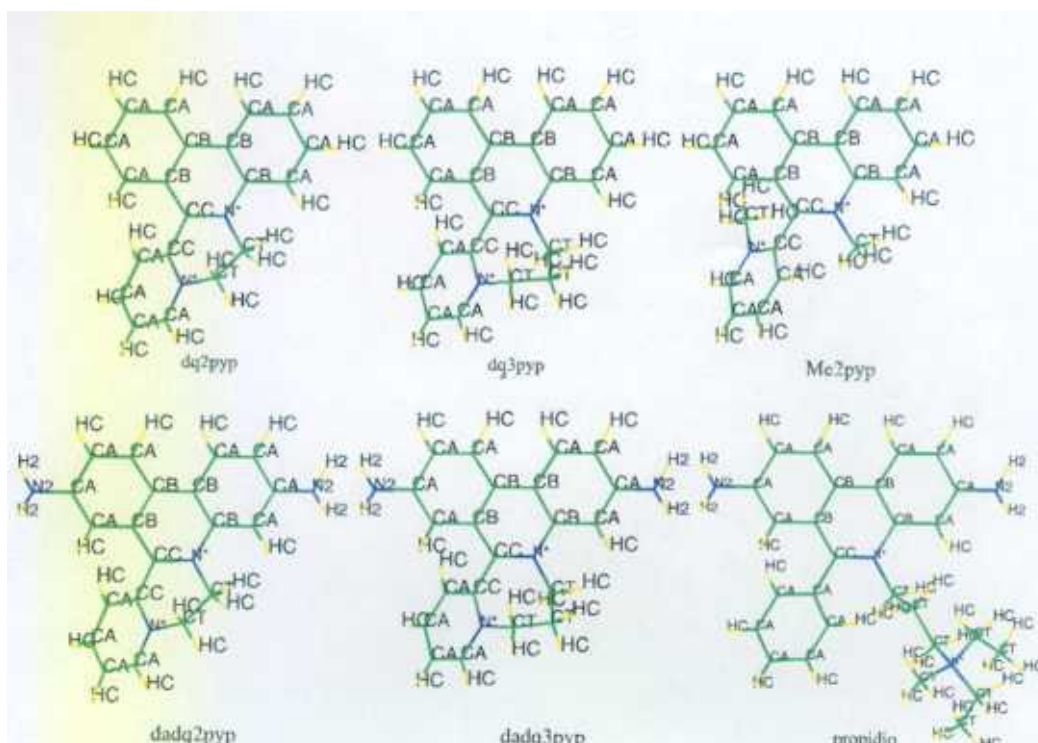


Figura 2.1. Tipos de átomos utilizados en la parametrización de los viológenos y el propidio.

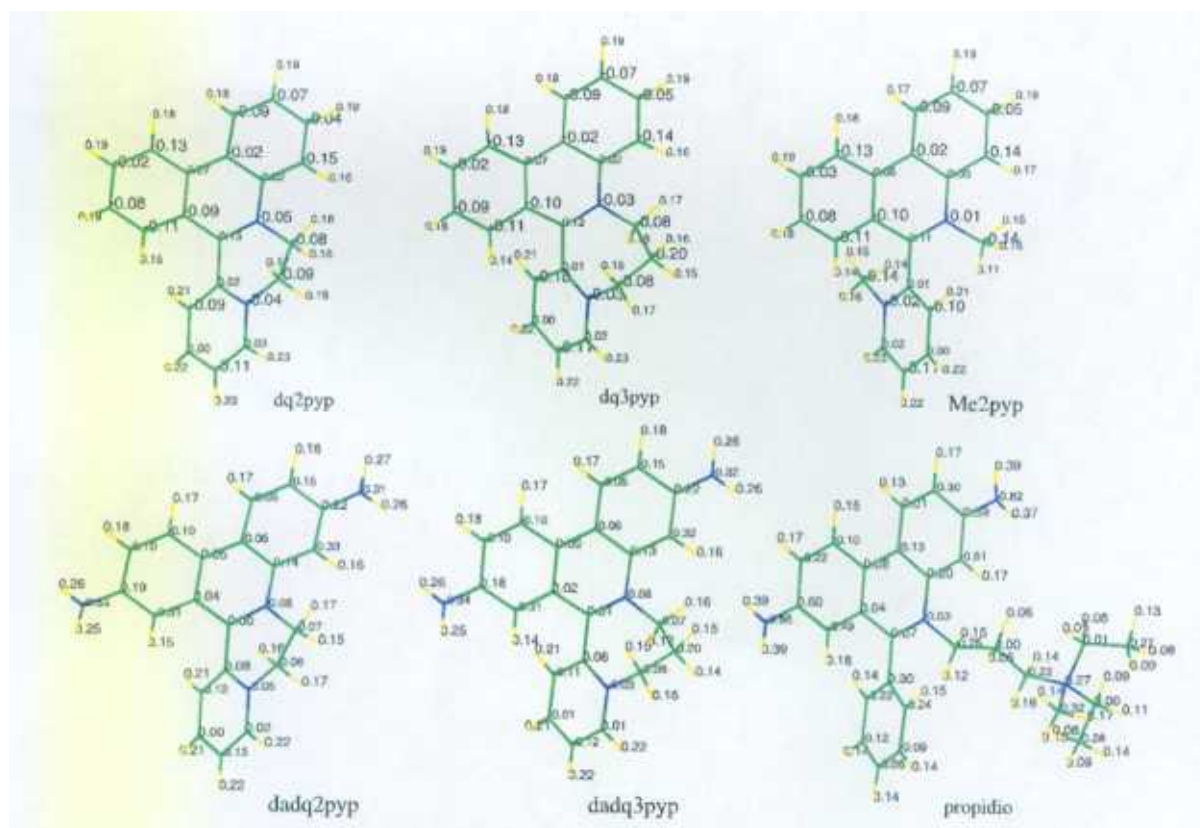


Figura 2.2. Cargas parciales de los viológenos y el propidio obtenidas por ajuste al potencial electrostático obtenido a partir de una función de onda MNDO.

2.4 Técnicas para el estudio de la fotoquímica con polinucleótidos

2.4.1 Ensayos de reacción de fotocorte mediante electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una herramienta muy útil para la separación de fragmentos de DNA de tamaño relativamente grande (200 pb-50 kpb).⁷⁴ Las formas superenrollada (I), relajada (II) y linealizada (III) de un plásmido pueden ser fácilmente separadas con esta técnica debido a que tienen muy diferente movilidad electroforética. La forma I es la de mayor movilidad debido a que se comporta hidrodinámicamente como una varilla rígida; la forma III tiene movilidad intermedia, ya que se asemeja a una varilla flexible. Por último, la forma II es la más lenta ya que su disposición extendida le impide penetrar con facilidad por los poros del gel. Las bandas correspondientes a las distintas formas se detectan iluminando con luz UV el gel previamente teñido con bromuro de etidio, ya que esta droga intercalante incrementa su fluorescencia al unirse al DNA.

La actividad fotonucleásica de una droga puede demostrarse y cuantificarse analizando con esta técnica los productos resultantes de la irradiación de un plásmido superenrollado en presencia de dicha droga. Si dicha droga provoca cortes en el DNA, generará a partir de la forma I bien formas relajadas (por corte en una cadena), bien formas lineales (por cortes simultáneos en cadenas opuestas en posiciones cercanas). Por tanto, si tras la irradiación las bandas II y III están engrosadas, y la I adelgazada o ausente, en comparación con un control irradiado sin droga, o con uno no irradiado y en presencia de droga, se concluye que existe corte fotoinducido del DNA.

Cabe preguntarse si la forma linealizada (III) aparece como consecuencia de la acumulación estadística de cortes cercanos en cadenas complementarias del DNA, o si por el contrario la droga es capaz de provocar cortes simultáneos en ambas cadenas durante el tiempo en que permanece unida al polinucleótido. Kishikawa *et al.*⁷⁵ han propuesto un método para discernir entre los dos modelos (corte de cadena sencilla y corte de doble cadena), consistente en ajustar la cinética acoplada de generación de formas II y III mediante las ecuaciones de velocidad correspondientes a los dos modelos.

Modelo de corte de cadena sencilla:



Si se representa por C_0 , N_0 y L_0 las concentraciones iniciales (a tiempo cero) de, respectivamente, las especies I, II y III, la evolución temporal de las mismas vendrá dada por las siguientes ecuaciones:

$$[I](t) = C_0 e^{-k_1 t} \quad (2.49)$$

$$[II](t) = \frac{k_1 C_0}{k_2 - k_1} e^{-k_1 t} + \left(N_0 - \frac{k_1 C_0}{k_2 - k_1} \right) e^{-k_2 t} \quad (2.50)$$

$$[III](t) = \alpha e^{-k_1 t} + \beta e^{-k_2 t} + (L_0 - \alpha - \beta) e^{-k_3 t} \quad (2.51)$$

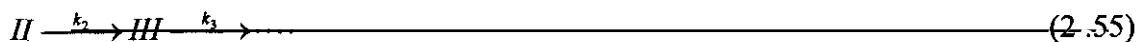
donde

$$\alpha = k_1 k_2 C_0 (k_2 - k_1)^{-1} (k_3 - k_1)^{-1} \quad (2.52)$$

y

$$\beta = k_2 \left(\frac{-k_1 C_0}{k_2 - k_1} + N_0 \right) (k_3 - k_2)^{-1} \quad (2.53)$$

Modelo de corte de doble cadena:



A partir del anterior esquema resultan ahora las siguientes expresiones para la evolución temporal de las concentraciones de las distintas especies :

$$[I](t) = C_0 e^{-k_4 t} \quad (2.56)$$

$$[II](t) = N_0 e^{-k_2 t} \quad (2.57)$$

$$[III](t) = \alpha e^{-k_4 t} + \beta e^{-k_2 t} + (L_0 - \alpha - \beta) e^{-k_3 t} \quad (2.58)$$

donde α y β son :

$$\alpha = \frac{k_4 C_0}{k_3 - k_4} \quad , \quad \beta = \frac{k_2 N_0}{k_3 - k_2} \quad (2.59)$$

y C_0 , N_0 y L_0 son, al igual que en el modelo anterior, las concentraciones iniciales (a tiempo cero) de, respectivamente, las especies I, II y III.

A partir de qué modelo se ajuste mejor, y de la relación de constantes cinéticas k_1/k_2 , se concluye cuál de las dos opciones es la correcta.

El plásmido superenrollado utilizado en este trabajo fue el pBR322 (New England Biolabs). Las muestras para irradiación (15 μ l, en tubos Eppendorf) contenían tampón P y concentraciones variables de plásmido y droga. Las irradiaciones se realizaron a través de una fibra óptica de silicio empaquetado de 6.5 mm de diámetro ajustada al tubo irradiado. La luz conducida por la misma provenía de una lámpara de Xe de 150 W (Oriol), con un filtro de corte que permitía pasar únicamente longitudes de onda mayores de 360 nm. Tras irradiar las muestras a temperatura ambiente, se añadían a las mismas 2 μ l de tampón de carga (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xileno cianol, 40% sacarosa), y a continuación se aplicaban a los pocillos de un gel de agarosa al 1% en tampón TAE, sobre el cual se corría la electroforesis (50 V/cm) hasta su completo desarrollo. Una vez terminada ésta, el gel se tiñió por inmersión durante 30 minutos en una disolución de bromuro de etidio (1 mg/ml), y se fotografió a continuación sobre un transiluminador de luz UV, mediante una cámara Polaroid con filtro naranja. Los negativos de las películas (Polaroid 665) se escanearon posteriormente con un densitómetro Molecular Dynamics 325S, y las bandas observadas se integraron mediante el programa ImageQuant. Al objeto de comparar calles diferentes del mismo o diferentes geles, las intensidades de cada banda se dividieron entre la suma de las intensidades de todas las bandas de su calle; de esta forma se corrigió frente a las inhomogeneidades de la intensidad de luz del transiluminador y frente a los errores de pipeteo. Asimismo, se dividieron las intensidades correspondientes a la forma I entre 0.8, para tener en cuenta la menor unión de etidio a DNA superenrollado. La remesa de plásmido utilizada presentaba, además de la forma superenrollada, un dímero (D), identificable como una banda adicional con menor movilidad electroforética. Al irse desarrollando la reacción de fotocorte, dicha banda disminuía y llegaba a desaparecer, antes de que hubiera aparecido forma linealizada, de donde se concluye que existía una transformación directa D II, que debía de tenerse en cuenta a la hora de cuantificar la reacción. Por tanto, en ausencia de forma III, el fotocorte se definió como el cociente de concentraciones $[II]/([I]+[II]+[D])$.

2.4.2 Ensayos de fotoblanqueamiento y de formación de fotoaductos

Para los experimentos de fotoblanqueamiento y formación de fotoaductos se utilizaron muestras de 1 mL en cubetas de cuarzo conteniendo tampón P, dq2pyp (2×10^{-5} M) y opcionalmente DNA de timo de ternera en exceso (5×10^{-4} M). Estas muestras se irradiaron durante diferentes periodos de tiempo con la misma lámpara y filtro de corte que en los experimentos de fotocorte, excepto que no se utilizó la fibra óptica. La cubeta se colocó en un soporte fijo construido para garantizar la reproducibilidad del experimento. Entre irradiaciones se registraron espectros de absorción a 25 °C.

2.5 Materiales

- Los viológenos dq2pyp, dq3pyp, Me2pyp, dadq2pyp y dadq3pyp fueron sintetizados en el laboratorio del Prof. G. Orellana (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid) y amablemente cedidos por el mismo para su estudio. La netropsina utilizada se adquirió de Boehringer Mannheim. El bromuro de etidio fue suministrado por Aldrich, y previamente a su utilización fue recristalizado.
- El agua utilizada en todos los experimentos fue agua ultrapura obtenida de un sistema Millipore Milli-Q. El tampón P (fosfato sódico 10 mM, pH 5.5), se preparó utilizando reactivos p.a.
- El DNA de timo de ternera se adquirió en Pharmacia Biotech (tamaño medio 1000 pb), o bien se aisló de acuerdo con Kay et al.,⁷⁶ con un tratamiento posterior con RNAsa, pronasa y proteinasa K para eliminar completamente el RNA y las proteínas contaminantes. Tras ser rediseuelto en tampón P, el DNA se dializó exhaustivamente frente al mismo tampón. En el caso del DNA aislado en el laboratorio, previamente a la diálisis se sonicó en baño de hielo durante tres tandas de 30 s espaciadas por otros 30 s; este tratamiento genera una distribución estrecha de tamaños, centrada a 400 pb. El estado doble-helicoidal del DNA a 25 °C en el tampón P y a todas las concentraciones de sal se comprobó mediante el efecto hipercrómico (1.33) resultante en curvas de fusión medidas en el UV, así como de los correspondientes espectros de DC. Para determinar su concentración en pares de bases se midió la absorbancia en el UV, utilizando como coeficiente de extinción molar $12800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 260 nm.

- Los polinucleótidos sintéticos (poly[d(GC)] , poly[d(AT)] , poly(dA)·poly(dT) y poly(dG)·poly(dC)) fueron suministrados por Boehringer Mannheim. Tras redisolverse en tampón P, se dializaron exhaustivamente frente al mismo tampón. Su estado doble-helicoidal en este medio y a 25 °C se comprobó en todos los casos a partir del efecto hipercrómico a partir de curvas de fusión medidas en el UV, así como de los correspondientes espectros de DC. Para determinar su concentración en pares de bases se midió la absorbancia en el UV, utilizando los siguientes coeficientes de extinción molar:⁷⁷ $\epsilon_{260} = 13300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (poly[d(AT)]); $\epsilon_{260} = 12000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (poly(dA)·poly(dT)) ; $\epsilon_{254} = 16800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (poly[d(GC)]) ; $\epsilon_{253} = 14800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (poly(dG)·poly(dC)).
- El polinucleótido sintético poly(A)·poly(U) fue suministrado por Sigma. Tras redisolverse en tampón P, se dializó exhaustivamente frente al mismo tampón. Su estado doble-helicoidal y conformación A en este medio y a 25 °C se comprobó en todos los casos a partir del efecto hipercrómico a partir de curvas de fusión medidas en el UV, así como de los correspondientes espectros de DC. Para determinar su concentración en pares de bases se utilizó como coeficiente de extinción molar $\epsilon_{260} = 14280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- La celulosa con DNA de timo de ternera adsorbido se obtuvo de Sigma. Previamente a su utilización en las cromatografías de afinidad se resuspendió en tampón P y sedimentó varias veces al objeto de eliminar finos.
- El plásmido DNA superenrollado pBR322 se adquirió de New England Biolabs.
- El marcador de peso molecular X se obtuvo de Boehringer-Mannheim.
- La agarosa (tipo D2) para las electroforesis en gel se obtuvo de Pronadisa.

3: dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp

3.1 Análisis conformacional de las drogas

Las estructuras resultantes de la optimización de geometría del dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp utilizando el hamiltoniano AM-1 muestran que los anillos de piridina y fenantridina no son coplanares, variando los respectivos ángulos diedros (ángulo ϱ) con la naturaleza de los grupos alquilantes (Lámina 3.I). Esta no coplanaridad se puede explicar considerando que en una conformación donde la piridina y la fenantridina fueran paralelas, en el caso del Me2pyp habría repulsiones estéricas entre los hidrógenos en *peri* y los metilos, y en el caso del dq2pyp y del dq3pyp, aparte de los choques entre los hidrógenos en *peri*, los hidrógenos de la cadena dialquilo estarían en una disposición eclipsada, de gran energía. Los valores de los ángulos obtenidos son concretamente de 33.1°, 57.2° y 94.1°, respectivamente para dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp. Considerando viológenos con cadenas dialquilo más largas, se obtiene el valor de 70.2° para el hipotético dq4pyp. Con AM-1 no se pudo optimizar el dq5pyp, aunque por mecánica molecular el ángulo obtenido es de 81.3°. Por tanto, parece que en ausencia de cadena dialquilo ambos planos tienden a disponerse perpendicularmente ($\varrho \approx 90^\circ$), tal y como ocurre en la molécula de Me2pyp; cadenas dialquilo cortas fuerzan al anillo de piridina hacia la coplanaridad con el de fenantridina, con los nitrógenos cuaternizados en *cis* ($\varrho < 90^\circ$), mientras que cadenas dialquilo largas fuerzan la rotación de la piridina en sentido contrario (*trans*, $\varrho > 90^\circ$). A esta tendencia a la perpendicularidad se opondría en principio la estabilización de la conformación plana por el aumento de la conjugación entre los dos sistemas de resonancia en la misma; sin embargo, considerando las estructuras predichas, este factor parece tener una influencia menor en la conformación, justificando así el no introducir términos que fuercen la coplanaridad en la parametrización para los cálculos de campo de fuerzas. En todas las estructuras optimizadas, los átomos del anillo de fenantridina se encuentran casi perfectamente en un plano, indicando que la dialquilación no parece distorsionar apreciablemente su

estructura. La desviación de la planaridad de este anillo decrece en el orden $dq2pyp > dq3pyp > Me2pyp$, indicando que el $dq2pyp$ tendría la estructura más tensionada de todas.

Las estructuras de los análogos biperidínicos del $dq2pyp$ (*diquat*) y del $dq4pyp$ se han determinado por cristalografía de rayos X; el ángulo ϱ resulta ser en el primero de 19.7° y 20.4° (en dos cristales diferentes),⁷³ y de 65.8° en el segundo.⁷³ Los menores ángulos que aparecen en comparación con los del $dq2pyp$ y del $dq4pyp$ (respectivamente 33.1° y 70.2° , ver más arriba) podrían deberse a la inexistencia en aquéllos de interacción entre hidrógenos en *peri*, de modo que la torsión observada se debería únicamente a la cadena dialquilo.

La reducción de la cadena dialquilo en los viológenos *pyp* se traduce también en una mayor restricción de la libertad torsional alrededor del ángulo ϱ , tal y como puede verse a partir de simulaciones de dinámica molecular de las drogas en vacío: la varianza de ϱ a lo largo de 100 ps de simulación aumenta en el orden $dq2pyp < dq3pyp < Me2pyp$ (Figura 3.1).

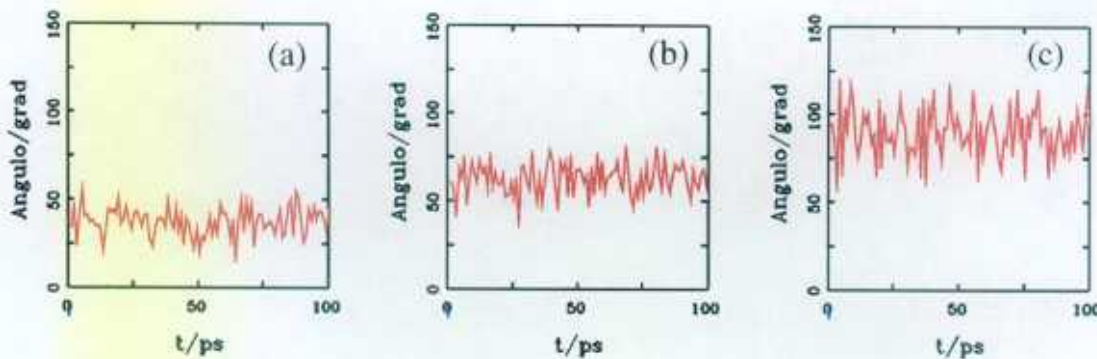


Figura 3.1. Variación de ϱ a lo largo de 100 ps de dinámica molecular en vacío de (a) $dq2pyp$, (b) $dq3pyp$ (c) $Me2pyp$. Los valores medios \pm desviaciones estándar resultantes son 37.14 ± 7.94 , 62.06 ± 9.13 y 89.50 ± 14.34 , respectivamente.

Para cada uno de los viológenos *pyp* existen dos conformaciones enantioméricas *S* y *R* de mínima energía, caracterizadas por ángulos ϱ de igual valor absoluto pero de signo opuesto (Lámina 3.I). Para pasar de un enantiómero a otro, es necesario rotar la piridina alrededor del enlace que la conecta con la fenantridina. En el caso del $dq2pyp$ y del $dq3pyp$, y debido a sus cadenas dialquilo, esta rotación sólo puede realizarse en un sentido, que es aquél en el cual los nitrógenos cuaternizados se disponen en *cis* respecto al enlace piridina-fenantridina. Se atraviesa entonces necesariamente una conformación

en la que tanto la piridina como la fenantridina y los carbonos de la cadena dialquilo se encuentran en el mismo plano ($\rho=0$), y los hidrógenos de ésta adquieren una disposición eclipsada, localizándose por encima y debajo del plano molecular (Lámina 3.I). Es razonable, por tanto, suponer que la energía de interconversión entre enantiómeros es mayor en el dq3pyp, donde hay tres pares de hidrógenos eclipsados en la cadena dialquilo, que en el dq2pyp, donde sólo hay dos. A partir de los espectros de RMN a diferentes temperaturas, es posible confirmar experimentalmente esta suposición. Al calentar el dq2pyp en acetonitrilo- d_3 de 20 a 70 °C se observa que el espectro de ^1H en la región de la cadena metilénica pasa de un sistema de espines complejo (representativo de interconversión lenta entre enantiómeros) a un sistema de dos tripletes A_2M_2 (interconversión muy rápida). Por el contrario, los espectros de dq3pyp en N,N -dimetilformamida- d_7 no muestran cambios entre 20 y 100 °C en la región metilénica, indicando la ausencia de interconversión por debajo de dichas temperaturas. Evidencia adicional de esta diferencia de energías de interconversión se obtiene a partir de las cinéticas de desaparición de dicroísmo circular de los enantiómeros separados mediante cromatografía de afinidad en celulosa-DNA. Así, a 25 °C la constante cinética de racemización en agua del dq3pyp es de $1.5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, mientras que a 6 °C es del orden de 10^{-7} s^{-1} , lo cual prueba de nuevo la alta estabilidad frente a la racemización del dq3pyp. Por contra, no fue posible obtener de forma reproducible el espectro de dicroísmo circular de los enantiómeros del dq2pyp a temperatura ambiente, si bien se obtenían dos picos en los perfiles de elución cromatográfica (ver apartado 3.4.7).

Considerando el Me2pyp, la ausencia de la cadena dialquilo no restringe el sentido de rotación para la interconversión enantiomérica, que por tanto puede darse a través de una de las dos siguientes conformaciones planas: *cis*, tal y como ocurre en el dq2pyp y el dq3pyp, y *trans*, donde los nitrógenos cuaternizados se encuentran en lados opuestos respecto al enlace piridina-fenantridina. En ambas conformaciones planas se dan importantes choques estéricos, ya sean hidrógeno-hidrógeno, metilo-hidrógeno o metilo-metilo, sugiriendo una alta energía de interconversión para los dos caminos de interconversión.

Mediante cálculos de mecánica molecular se estimaron las energías de interconversión de los tres viológenos, como la diferencia entre las energías de las conformaciones totalmente planas y las de mínima energía. Para ello, las conformaciones planas se

optimizaron a través de minimizaciones de energía de las moléculas forzadas a la total planaridad mediante términos torsionales adicionales. Los valores resultantes de energías de interconversión son de 36.81, 113.83, 113.62 y 256.09 kcal/mol, respectivamente para dq2pyp, dq3pyp, Me2pyp vía *trans* y Me2pyp vía *cis*. Como puede verse, se reproducen las tendencias observadas experimentalmente para el dq2pyp y el dq3pyp. Al objeto de estudiar la posible influencia de la fuerza iónica en la barrera, se repitieron los cálculos utilizando una constante dieléctrica de $\epsilon=1$ (para los anteriores se había empleado $\epsilon=4r$), obteniéndose valores que diferían de los anteriores en menos de 0.5 kcal/mol. Por tanto, parece existir una influencia despreciable de la concentración de contraiones en las energías de interconversión. De hecho, la estabilidad frente a la racemización de los dos enantiómeros separados de dq3pyp, que se obtienen a diferente fuerza iónica (ver apartado 3.4.7), es similar, apoyando experimentalmente los anteriores cálculos.

3.2 Caracterización de la estructura electrónica de las drogas

3.2.1 Espectros electrónicos y momentos de transiciones electrónicas

Los espectros de absorción electrónica de los viológenos en agua se muestran en la Figura 3.2, junto con el de la 6-(2-piridil)fenantridina (pyp). Los máximos de absorción de los viológenos, así como los respectivos coeficientes de extinción molar, se recogen en la Tabla 3.I.

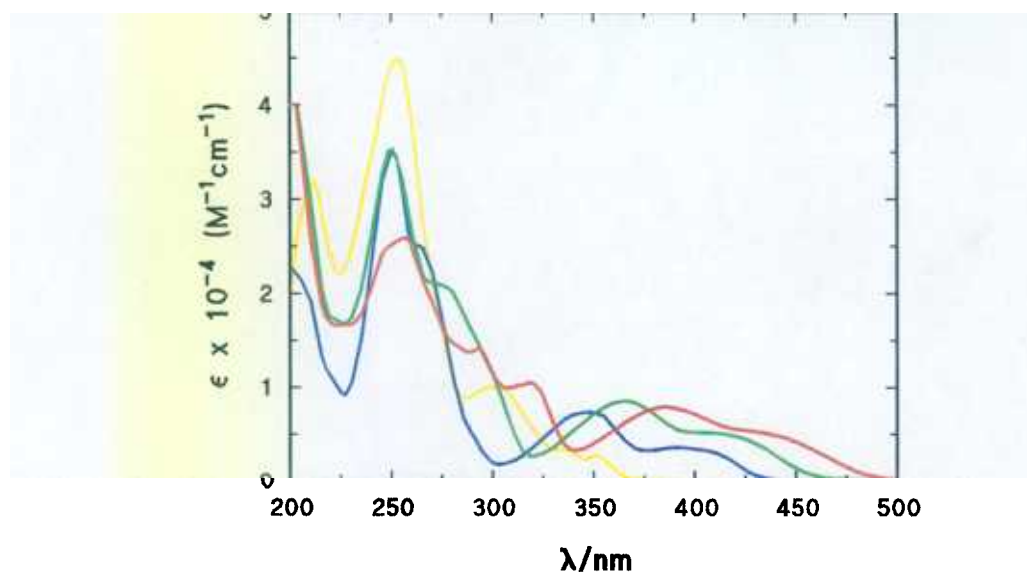
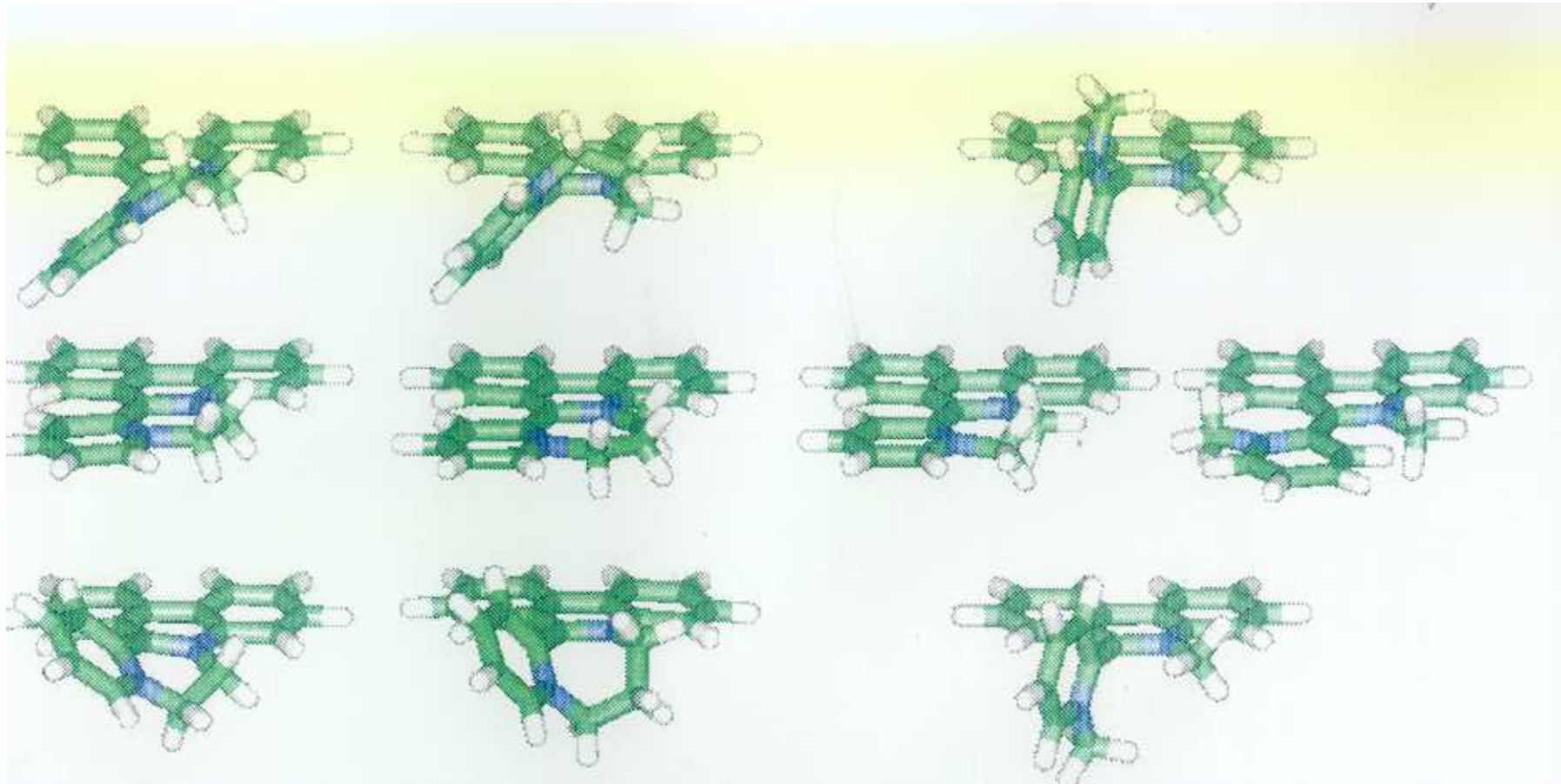


Figura 3.2. Espectros de absorción en agua del dq2pyp (rojo), dq3pyp (verde), Me2pyp (azul) y 6-(2-piridil)fenantridina (amarillo).

S



dq2pyp

dq3pyp

Me2pyp

LAMINA 3.1

positiva aquella más desplazada hacia el rojo. Los máximos de elipticidad absoluta de ambas bandas están centrados a 430/415 nm y 375/355 nm, respectivamente para dq2pyp/dq3pyp. A longitudes de onda menores se observan múltiples bandas de elipticidad positiva y negativa: para ambas drogas se pueden distinguir dos bandas de elipticidad negativa a aproximadamente 280 y 250 nm, así como dos de elipticidad positiva a 260 y 290 nm. Aparece también una banda de elipticidad negativa a 320 nm en el espectro del dq2pyp, que parece corresponder con otro del dq3pyp localizado a 310 nm que solaparía con la banda negativa centrada a 350 nm.

La AF de ambas drogas en etilenglicol/agua a 170 K (Figuras 3.3d y 3.3i) es constante y toma un valor de casi +0.4 en la región del hombro de la banda visible. El valor ligeramente inferior a +0.4 podría deberse bien a una ligera reorientación de la droga en el tiempo de vida del estado excitado, o bien a una pequeña diferencia en las direcciones de los momentos de transición de emisión y absorción. A longitudes de onda correspondientes al máximo de la banda visible la AF disminuye hasta ser casi nulo, y a menores longitudes de onda aumenta, mostrando una gran variación con la longitud de onda.

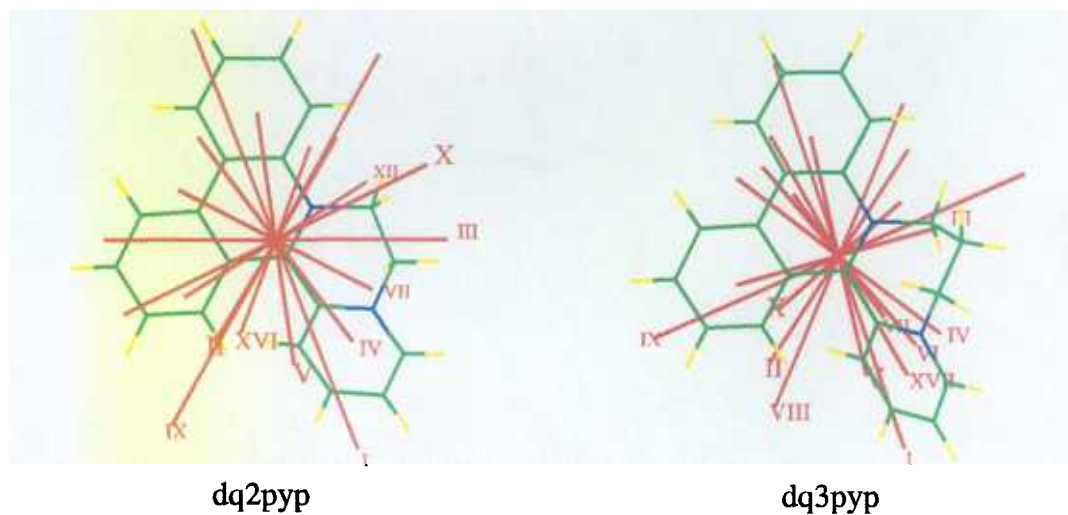


Figura 3.4. Direcciones de los momentos de transiciones electrónicas del dq2pyp y el dq3pyp obtenidas tras un cálculo de interacción de configuraciones utilizando el programa ZINDO. La longitud de las barras es proporcional a la fuerza de oscilador de las transiciones.

Los cálculos cuánticos (Figuras 3.3e y 3.3j) predicen dos transiciones en el visible. La de menor energía tiene una mayor fuerza de oscilador, y está polarizada aproximadamente paralela al enlace que conecta los anillos de piridina y fenantridina (Figura 3.4, transición I). La segunda transición (Figura 3.4, transición II) tiene menor

fuerza de oscilador y su momento de transición es paralelo al eje longitudinal del anillo de fenantridina, formando un ángulo con la anterior transición de 53° (dq2pyp) y 52° (dq3pyp). Ambos momentos son paralelos al plano de la fenantridina. El desplazamiento hacia el azul de estas transiciones al pasar del dq2pyp al dq3pyp es reproducido por los cálculos cuánticos. Las energías predichas son algo menores que las experimentales, aunque si se incluye el campo de reacción en el cálculo de interacción de configuraciones el acuerdo aumenta considerablemente (Figuras 3.3e y 3.3j, líneas rojas). A mayores energías se predicen múltiples transiciones, polarizadas en muy diferentes direcciones, si bien siempre paralelas al plano de la fenantridina. Las más intensas se localizan a 331, 271 y 250 nm (dq2pyp) y a 264, 251 y 220 nm (dq3pyp). El análisis de las contribuciones de las distintas configuraciones en los diferentes estados excitados (Tabla 3.II) permite concluir que la primera transición en ambas drogas corresponde al paso de un electrón del HOMO al LUMO, mientras que el segundo estado excitado está compuesto principalmente por la configuración HOMO-1 \rightarrow LUMO (dq2pyp), o una combinación de ésta con la HOMO-1 \rightarrow LUMO+1 (dq3pyp). Los contornos de orbitales moleculares del HOMO y el LUMO muestran que el primero está centrado principalmente en el anillo de fenantridina, mientras que el segundo lo está sobre el de piridina.

TABLA 3.II. Coeficientes de los cálculos de interacción de configuraciones realizados con el dq2pyp y el dq3pyp.

dq2pyp	
Transición	Coficiente(configuración)*
I	-0.947(52,53)
II	0.914(51,53)
III	0.432(50,53), -0.734(52,54)
IV	-0.792(50,53)
X	-0.374(52,55), 0.632(52,56)

dq3pyp	
Transición	Coficiente(configuración)*
I	0.915(55,56)
II	0.877(54,56), -0.345(54,57)
III	0.819(55,57)
IV	-0.821(53,56)
X	0.437(55,58), 0.541(55,59)

* (m,n) denota la configuración generada al pasar un electrón del orbital molecular m al n.

Considerando que, en ausencia de acoplamiento vibrónico o excitónico con otras transiciones, la forma de una banda de DC debe ser similar a la correspondiente de absorción,⁵¹ la forma positivo-negativa del espectro de DC del enantiómero aislado del dq3pyp en la región visible/UVp indica que la banda de absorción en esta región es debida a dos transiciones electrónicas diferentes. En el caso del dq2pyp unido a un exceso de DNA sólo se observa una banda positiva, cuya forma es diferente a la del espectro de absorción. Teniendo en cuenta que el DC de esta droga es debido tanto a enriquecimiento en un enantiómero como a un mecanismo de oscilador acoplado, no es posible concluir nada en cuanto al número de transiciones en esta región. Sin embargo, la aparición en el espectro de DCM de la mezcla racémica del dq2pyp de una banda de elipticidad positiva en la zona menos energética del espectro, seguida por otra banda de signo opuesto a menores longitudes de onda permite concluir que, al igual que ocurría con el dq3pyp, la correspondiente banda de absorción es debida a dos transiciones electrónicas no paralelas y de energías parecidas. El espectro de DCM de la mezcla racémica del dq3pyp es también posee las características antes referidas, confirmando lo que se había concluido a partir del DC.

El carácter bifásico de la AF en esta región está de acuerdo con la existencia de dos transiciones no paralelas. Suponiendo que las dos transiciones que aparecen en el visible en los cálculos cuánticos corresponden a estas dos transiciones experimentalmente detectadas, se obtiene un buen acuerdo entre la teoría y el experimento en cuanto al ángulo entre las mismas: los predichos son de $53^\circ/52^\circ$, respectivamente para dq2pyp/dq3pyp, mientras que los estimados a partir de la AF son de $50^\circ/57^\circ$ grados (asumiendo que el momento de la transición de emisión y la de absorción de más baja energía son paralelos). A partir de los cálculos cuánticos el momento de la segunda transición estaría dirigido paralelamente al eje longitudinal de la fenantridina, mientras que el de la primera transición estaría dirigido hacia el anillo de la piridina, ambos paralelos al plano de la fenantridina.

Este esquema es similar al observado en el etidio, donde la transición principal en el UV está polarizada paralelamente al eje longitudinal de la fenantridina, mientras que la visible lo está hacia el anillo de fenilo, formando sus momentos un ángulo de 60° y estando ambos en el plano de la fenantridina.⁷⁸

A partir de la composición de configuraciones de la primera transición (ver Tabla 3.II), así como las contribuciones de orbitales atómicos (OAs) a los HOMO y LUMO (el primero compuesto principalmente por OAs situados en la fenantridina, y el segundo de OAs situados en la piridina), se concluye que esta transición viene acompañada de un importante desplazamiento de carga de la fenantridina a la piridina. Dicho desplazamiento provocaría una gran reorientación del disolvente tras la excitación de la droga, lo cual se reflejaría en un importante desplazamiento de Stockes de la emisión que es de hecho lo que se observa (aproximadamente de 130 nm, ver 3.2.2). Asimismo, la fotooxidación de las bases del DNA por las drogas (ver 3.5.1) estaría muy favorecida por esta distribución de los orbitales moleculares implicados en la transición. La razón sería el gran solapamiento esperado entre el HOMO (orbital molecular al cual podría ir el electrón de la base tras la excitación) y los orbitales moleculares de las bases, ya que la fenantridina está apilada entre dos pares de bases en el sitio de intercalación, mientras que la piridina se sitúa en uno de los surcos (ver 3.4.4).

La interpretación del número y polarizaciones de las transiciones electrónicas a menores longitudes de onda es más problemático, dado el gran solapamiento observado. Comparando los espectros de DCM y AF con los de absorción en esta región, es posible distinguir al menos cinco diferentes transiciones. De menores a mayores energías, habría primero una transición a aproximadamente 320 nm en el dq2pyp y a 310 nm en el dq3pyp, que formaría un ángulo con la primera transición de 27° y 32° , respectivamente. Esta transición daría cuenta del máximo local a 318 nm observado en el espectro de absorción del dq2pyp. Considerando los espectros de DCM, tres transiciones seguirían a esta primera, y estarían centradas tanto para el dq2pyp como para el dq3pyp a aproximadamente 290, 280 y 270 nm. Los hombros observados a 293 nm en el espectro del dq2pyp, y a 270 en el del dq3pyp, podrían deberse respectivamente a la primera y última de estas transiciones. A partir de los espectros de AF es posible estimar los ángulos de las transiciones a 290 y 280 nm, resultando ser $42^\circ/39^\circ$ y $46^\circ/36^\circ$ para respectivamente dq2pyp/dq3pyp. Finalmente, es posible distinguir una transición a 250 nm en ambas drogas, que corresponde al máximo en el UV de los correspondientes espectros de absorción. El ángulo derivado a partir de la AF es de $53^\circ/60^\circ$, respectivamente para dq2pyp/dq3pyp.

Dado el gran número de transiciones predichas en esta región por los cálculos ZINDO, no es posible una asignación inambigua de las distintas transiciones. La transición experimental a 250 nm podría corresponder a la transición X (Figuras 3.3e y 3.3j), aunque el ángulo predicho (85°) no reproduce bien el estimado experimentalmente ($53^\circ/60^\circ$, ver anterior párrafo). Como anteriormente se dijo, los cálculos sitúan todos los momentos de estas transiciones paralelos al plano de la fenantridina, aunque en principio por razones de simetría sus direcciones no están restringidas.

3.2.2 Luminiscencia

Los espectros de emisión de las drogas en agua presentan una única banda, la cual se desplaza hacia el azul al seguir el orden dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp, debido a la energía creciente de los LUMO. En la Tabla 3.I se presentan los máximos de emisión de las tres drogas y los respectivos rendimientos cuánticos, obtenidos utilizando una referencia de bisulfato de quinina en ácido sulfúrico 1 N ($\Phi=0.546$). Las medidas de luminiscencia con resolución temporal indican que el paso al estado fundamental sigue una cinética monoexponencial, con tiempos de vida correspondientes a un singlete como estado excitado. Considerando los valores relativamente bajos de los respectivos rendimientos cuánticos, parece lógico suponer que existen vías de desactivación alternativas a la fluorescencia. De hecho, a baja temperatura (77 K) y en matriz sólida de etanol-metanol (4:1, V/V) aparecen tres nuevas bandas de emisión, tanto con dq2pyp como con dq3pyp, situadas a 585/540, 630/585 y 680/630 nm, respectivamente para dq2pyp/dq3pyp; los correspondientes tiempos de vida (0.8 ± 0.2 ms y 8 ± 1 ms) corresponden a una desexcitación por fosforescencia, indicando por tanto la existencia de un cruce intersistémico relativamente eficaz hacia un estado triplete. A temperatura ambiente la fosforescencia desaparece, debido a desactivación no radiativa del triplete, que compite muy eficazmente con la radiativa a esta temperatura. Considerando que el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete en D_2O es de 0.22 y 0.10, respectivamente para dq2pyp y dq3pyp (ver 3.5.3), la desactivación del singlete por cruce intersistémico se dará con probabilidades mínimas de 0.22 y 0.10.

3.3 Estabilidad y reactividad de las drogas

3.3.1 Estabilidad frente a pH, temperatura y luz

A pH neutros o básicos, dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp son inestables. Por ejemplo, en tampón fosfato a pH 8.5 y a temperatura ambiente, las bandas de absorción en el visible desaparecen en pocos segundos ($t_{1/2} < 1$ minuto en el caso del dq2pyp). A pH 7.0 la descomposición es más lenta ($t_{1/2} = 98$ minutos en el caso del dq2pyp), y finalmente a pH 5.5 no se observa descomposición alguna de ninguna de las drogas durante 48 horas. La "descomposición" a pHs neutros o básicos parece ser debida a un ataque nucleofílico a la posición 6 de la piridina, teniendo en cuenta los espectros de RMN. La especie generada sería monopositiva, y no aromática en el anillo de piridina (Figura 3.5). Similar reactividad se observa en 2,2'-bipiridinas, las cuales suelen ser también inestables a pHs básicos.³⁶

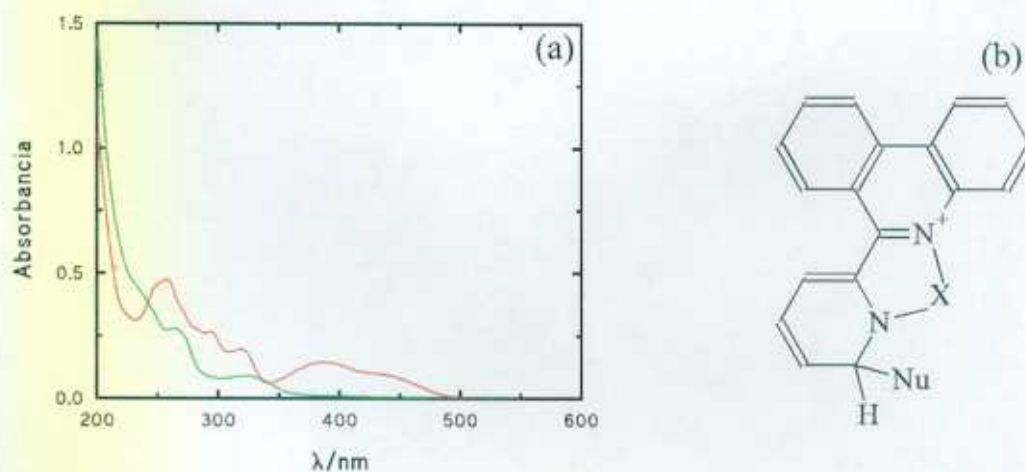


Figura 3.5. (a) Espectros de absorción del dq2pyp en agua (rojo) y a pH 8.5 (verde). (b) Estructura hipotética general de la especie generada tras ataque nucleofílico de los viológenos en la posición 6 de la piridina. Nu simboliza el nucleófilo; cuando éste es el OH, la especie generada se desplaza hacia la forma ceto, con liberación del hidrógeno en posición 6 de la piridina.

Por otra parte, existe también descomposición de las drogas a temperaturas relativamente altas. La Figura 3.6 muestra la evolución de la absorción relativa de los máximos de absorción en el visible del dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp con la temperatura, a una velocidad de barrido de 0.5 °C/minuto. A partir de esta figura se concluye que el orden de las drogas en relación a su estabilidad térmica es dq3pyp > dq2pyp > Me2pyp. Los espectros de absorción resultantes muestran una desaparición de la banda visible junto con un aumento de la centrada a 250 nm. En principio cabría esperar que el aumento de la descomposición a altas temperaturas sería debido a un incremento de la velocidad de ataque nucleofílico; sin embargo, al calentar en agua el dq2pyp se observan por RMN diversas modificaciones aparte de la de la posición 6 de la piridina. Podría

existir, por ejemplo, una pérdida de la cuaternización de la piridina y/o la fenantridina a estas temperaturas. De hecho, el espectro de absorción del dq2pyp tras incubarse a 90 °C durante 5 horas (Figura 3.6b) es bastante parecido al de la 6-(2-piridil)fenantridina.

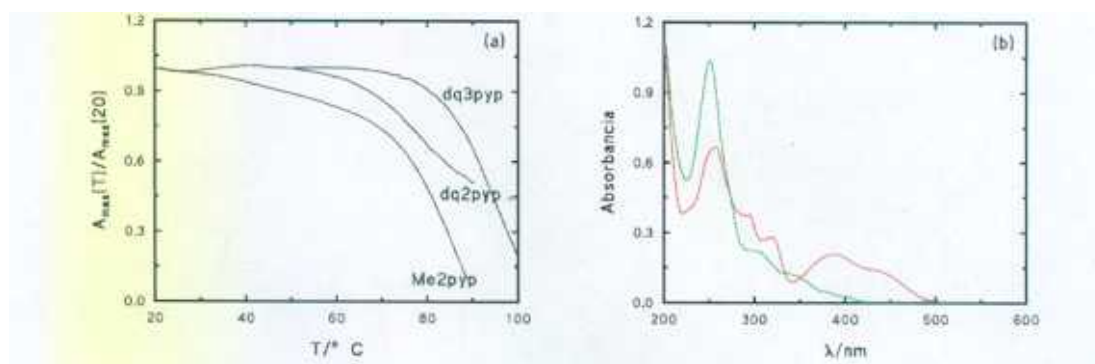


Figura 3.6. (a) Evolución con la temperatura de la absorción relativa de los máximos de absorción en el visible del dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp en agua. Se utilizó una velocidad de barrido de 0.5 °C/min. (b) Espectros de absorción del dq2pyp en agua (rojo) y de la especie generada tras incubarse a 90 °C durante 5 horas el dq2pyp en agua (verde).

Por último, las drogas también sufren fotodescomposición. La irradiación con luz visible de cualquiera de las drogas conduce a un fotoblanqueamiento de las correspondientes disoluciones, caracterizado por una desaparición de nuevo de las bandas de absorción en el visible (Figura 3.7), con mantenimiento de las existentes en el UV (no mostrado). Evidentemente, en este caso las modificaciones químicas pueden ser completamente diferentes que las observadas con nucleófilos y a altas temperaturas, puesto que ahora la reacción sería con el estado excitado de las drogas, cuya estructura electrónica es muy diferente que la del estado fundamental.

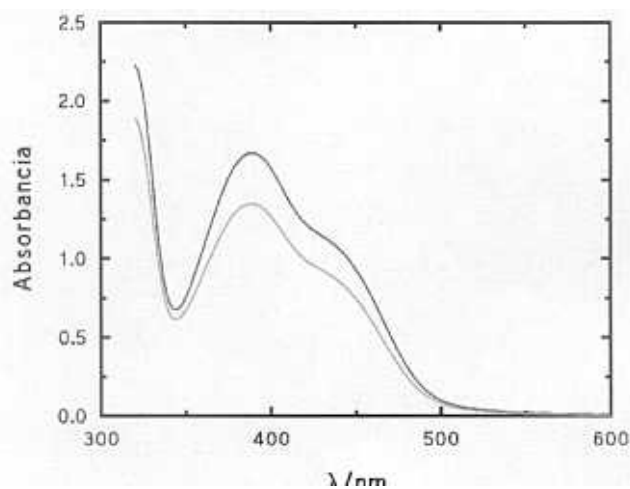


Figura 3.7. Fotoblanqueamiento del dq2pyp. Espectro de absorción del dq2pyp en agua (rojo) y de la especie generada tras irradiar durante 2 horas con una lámpara de Xe de 150 W utilizando un filtro de corte de 360 nm (verde).

Por todas estas razones, todo el trabajo posterior se realizó en tampón fosfato 10 mM a pH 5.5. Previamente a cada experimento, se prepararon muestras concentradas de droga en agua que se almacenaban a 1-5 °C fuera de la luz en recipientes de plástico, y que se utilizaban durante un máximo de 48 horas. Para los experimentos de dependencia con la sal de larga duración (isotermas de unión) se utilizó como sal NaPF_6 , que tiene un anión poco nucleofílico, y para los de corta duración (cinéticas de flujo detenido) NaCl .

3.3.2 Potenciales redox

Al igual que otros viológenos, tanto el dq2pyp como el dq3pyp son capaces de sufrir procesos de oxidorreducción reversibles. En la Tabla 3.II se muestran los potenciales redox del estado fundamental obtenidos por voltametría cíclica para las reducciones $2+ \rightarrow +$ y $+ \rightarrow 0$ de estas dos drogas. El Me2pyp, por el contrario, se reduce irreversiblemente por captura en un único paso de dos electrones.

TABLA 3.II. Potenciales redox de estado fundamental y excitado de los viológenos.

	dq2pyp	dq3pyp	Me2pyp
$E(D^{2+}/D^+)$	-0.07	-0.21	-0.41
$E(D^+/D)$	-0.31	-0.43	
$E(D^{2+}/D^+)$	+2.12	+2.15	+2.11

*Potenciales redox (± 20 mV, vs EEH) en disolución acuosa saturada de argón (sin tampón).

**Potencial de pico anódico de la única onda observada de voltametría cíclica.

Como puede verse en la Tabla 3.II, los potenciales disminuyen en el orden dq2pyp > dq3pyp > Me2pyp, lo cual de nuevo refleja el aumento de la energía de los correspondientes LUMO, posiblemente por disminución de la conjugación piridina-fenantridina. Una variación similar se observa en los correspondientes viológenos derivados de 2,2'-bipiridina: al pasar del diquat (análogo del dq2pyp) al triquat (análogo del dq3pyp) hay una disminución de -0.2 V, y al pasar de éste al correspondiente análogo del Me2pyp, una de -0.15 V.⁷⁹

Los correspondientes potenciales redox del estado excitado ($E(D^{2+}/D^+)$, Tabla 3.II) se pueden calcular sumando a los del estado fundamental $E(D^{2+}/D^+)$ la diferencia de energías entre ambos estados calculada a partir de la frecuencia ν_{00} del máximo de la banda de emisión:

$$E(D^{2+}/D^+)=E(D^{2+}/D^+)+h\nu_{00}$$

donde h es la constante de Plank, resultando un valor de aproximadamente +2.1 V vs. EEH para todos ellos, ya que las diferencias de potenciales de los estados fundamentales se contrarrestan con las diferentes energías de excitación. Este potencial es similar a los del dimetildiazapirenio y del dimetildiazaperopirenio.

3.3.3 Autoasociación

A diferencia de lo que ocurre con otras drogas planas aromáticas similares (etidio,⁸⁰ diazaperopirenio,⁴¹ azul de metileno,⁸¹ etc.), la tendencia a la autoasociación en disolución acuosa de los viológenos parece ser mínima, ya que en tampón P los coeficientes de extinción molar y las posiciones de los máximos de absorción no varían hasta concentraciones de 2×10^4 M. Aumentando la concentración de NaPF₆ hasta 100 mM sigue sin observarse autoasociación (datos no mostrados). Posiblemente sea debido a que son dicatiónicas y a que su superficie plana aromática es menor que la de las anteriores drogas. Sin embargo, en metanol se observa una importante autoasociación, que se traduce en un cambio en las propiedades espectroscópicas de la disolución. Pueden proponerse estructuras para los dímeros a partir de minimizaciones de energía (Figura 3.8). En una de ellas se observa que los ejes longitudinales de anillos de fenantridina son prácticamente paralelos, estando los anillos de piridina de cada molécula orientados en sentidos opuestos; otro dímero se caracteriza por la orientación paralela de los anillos de piridina.

3.4 Interacción de las drogas con ácidos nucleicos

3.4.1 Unión de alta afinidad al DNA

En presencia de DNA de timo de ternera, el máximo de absorción en el visible de los viológenos sufre un ligero desplazamiento hacia el rojo y un efecto hipocrómico, indicando la existencia de interacción con el polinucleótido (Figura 3.9). Este cambio espectral tiene un punto isobéptico que se localiza a 474 nm (dq2pyp), 447 nm (dq3pyp) y 425 nm (Me2pyp), lo cual apoya la existencia de únicamente dos especies en disolución: droga libre y droga unida al DNA. Los coeficientes de extinción molar de las formas unidas a DNA de timo de ternera son 5575, 6325 y 4150 \pm 100 M⁻¹cm⁻¹, respectivamente para dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp.

El cambio de absorción en el visible sirve para obtener isotermas de unión mediante

titulaciones espectrofotométricas. La Figura 3.10 muestra las representaciones de Scatchard correspondientes a la asociación de los viológenos con DNA de timo de ternera en tampón P (25.0 ± 0.1 °C), junto con el mejor ajuste de la ecuación no cooperativa de McGhee-von Hippel. Los parámetros resultantes de dicho ajuste se

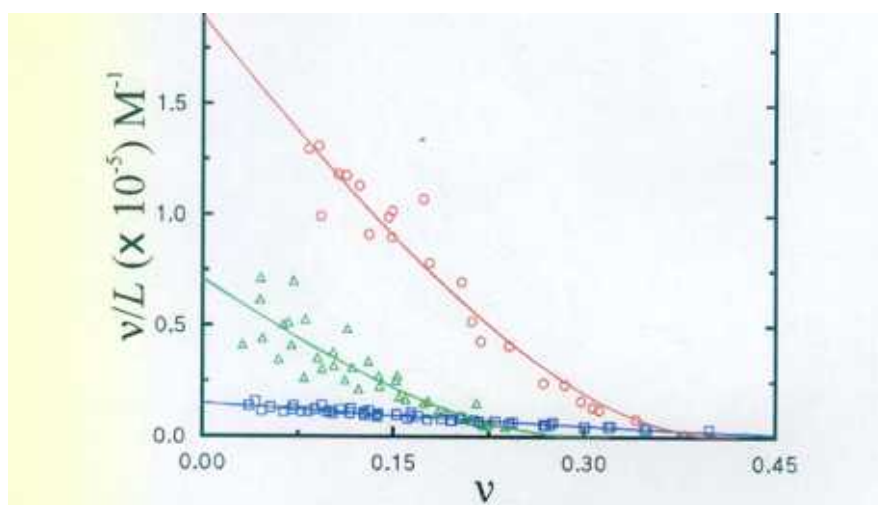


Figura 3.10. Representaciones de Scatchard para la interacción de dq2pyp (círculos, rojo), dq3pyp (triángulos, verde) y Me2pyp (cuadrados, azul) con DNA de timo de ternera en tampón P y a 25.0 ± 0.1 °C. Las líneas continuas corresponden a los mejores ajustes de la ecuación de McGhee-von Hippel.

muestran en la Tabla 3.IV, así como los del propidio y los enantiómeros Δ y Λ del $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ descritos por otros autores en condiciones similares de temperatura y concentración de Na^+ . Los tamaños de los sitios de unión vienen a ser de aproximadamente 2 pares de bases en el caso del dq2pyp y del Me2pyp (lo que cabría esperar de intercalantes que siguieran el modelo de exclusión vecina), y de 3 pares de bases en el caso del dq3pyp. Las constantes de asociación son relativamente altas (del orden de 10^5 M^{-1} en el caso del dq2pyp, y de 10^4 M^{-1} en el del dq3pyp y el Me2pyp), y se encuentran entre las del propidio (tres órdenes de magnitud mayor) y el $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ (un orden de magnitud menor o similar orden de magnitud). La razón de estas diferencias en las constantes de asociación se discutirá más detalladamente en el apartado 3.4.8.

TABLA 3.IV. Parámetros de unión de los viológenos. En todos los casos la unión se midió en tampón P a 25.0 ± 0.1 °C, y se ajustó la ecuación no cooperativa de McGhee-von Hippel a las representaciones de Scatchard experimentales.

Droga	$K_b \times 10^{-5}/\text{M}^{-1}$	n/pb
dq2pyp	1.90	2.4
dq3pyp	0.65	3.1
Me2pyp	0.15	1.8
propidio	2410.00	2.0

$\Delta\text{-Ru(phen)}_3^{2+}$	0.49	3.7
$\Lambda\text{-Ru(phen)}_3^{2+}$	0.28	3.4

*Obtenido por extrapolación a partir de la representación de $\log K_b$ vs. $\log[\text{Na}^+]$ de la referencia 61 (a 25 °C, en tampón PIPES 10 mM, 1mM EDTA y diferentes concentraciones de NaCl, a pH 7.0). En este caso se utilizó para el ajuste la ecuación cooperativa de McGhee-von Hippel, resultando una constante de cooperatividad $\omega=0.2$.

**Tomado de la referencia 82 (a 20 °C, en tampón 5 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl y pH 7.1). Para el ajuste se utilizó la ecuación no cooperativa de McGhee-von Hippel.

3.4.2 Intercalación en el DNA y rápida disociación

Las titulaciones viscosimétricas (Figura 3.11) indican que los tres viológenos se unen al DNA por intercalación: mientras que la netropsina (droga de surco menor) y el metil viológeno (droga de unión territorial) no incrementan e incluso disminuyen la viscosidad de la disolución, el etidio (intercalante) y los viológenos sí lo hacen. Las viscosidades relativas a saturación de éstos son inferiores a la del etidio, y a su vez disminuyen en el orden $\text{dq2pyp} > \text{dq3pyp} > \text{Me2pyp}$. Los correspondientes parámetros de extensión decrecen en el mismo orden (detalle de la Figura 3.11). Por tanto, parece que los viológenos se unen al DNA siguiendo un modelo de *intercalación parcial y/o asimétrica*,⁶³ⁱ en comparación con el etidio.

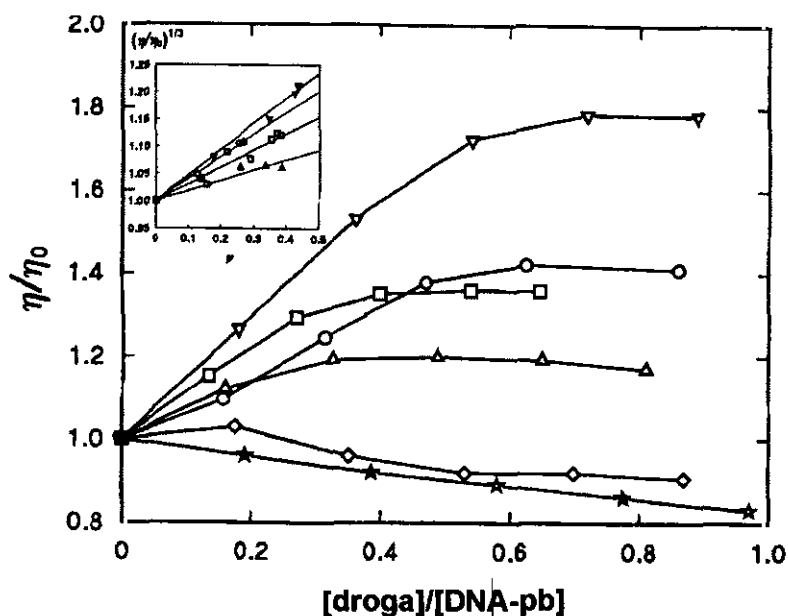


Figura 3.11. Titulaciones viscosimétricas de DNA de timo de ternera con diferentes drogas: etidio (triángulos hacia abajo), dq2pyp (cuadrados), dq3pyp (círculos), Me2pyp (triángulos hacia arriba), netropsina (rombos) y metil-viológeno (estrellas). En tampón P a 25.1 ± 0.05 °C. Detalle: representación de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. función de saturación, de acuerdo con la teoría de Cohen y Eisenberg.

Los espectros de difracción lineal en flujo demuestran también un modo intercalativo

de unión para el dq2pyp y el dq3pyp (Figura 3.12). En ambos casos, el DL^z en el visible es negativo y constante, y de magnitud similar al del UV. Teniendo en cuenta que los momentos dipolares de las transiciones de ambas drogas se sitúan en el plano de la fenantridina (ver 3.2.1), se concluye que dicho plano es perpendicular al eje longitudinal del DNA, de acuerdo con una unión por intercalación, y que además la droga se sitúa paralelamente a los pares de bases, y no inclinada respecto a éstas.

Por último, la dependencia a 25.0 ± 0.1 °C de las constantes cinéticas de disociación de los complejos DNA-dq2pyp con la concentración de ión Na^+ indica de nuevo que esta droga se une por intercalación.

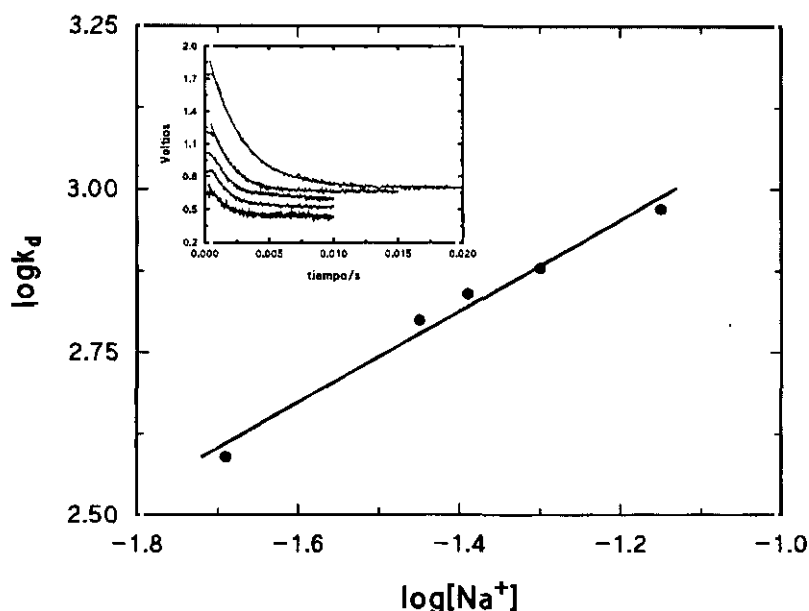


Figura 3.13. Representación doble logarítmica de la dependencia con la $[Na^+]$ de las constantes cinéticas de disociación del complejo dq2pyp DNAtt a 25.0 ± 0.1 °C. Se muestra también el mejor ajuste lineal a los puntos experimentales. Detalle: trazas promedio por ajuste a las cuales se obtuvieron las constantes cinéticas. De arriba a abajo, los tampones utilizados son P10, P25, P50 y P60. Los mejores ajustes monoexponenciales se muestran superpuestos a las trazas experimentales.

En la Figura 3.13 se muestra dicha dependencia en forma de una representación de $\log k_d$ vs. $\log[Na^+]$, junto con el mejor ajuste lineal a los puntos experimentales. En el detalle se muestran asimismo las trazas promedio, por ajuste a las cuales se estimaron las constantes cinéticas. A todas las concentraciones de sal las disociaciones fueron satisfactoriamente descritas por un modelo monoexponencial, no resultando el ajuste de un modelo biexponencial en una mejora significativa en el parámetro χ^2 y la distribución de desviaciones. Las constantes cinéticas resultantes (Tabla 3.V) van desde 389 hasta $942 s^{-1}$, correspondiendo a tiempos de vida del complejo entre 2.57 y 1.06 ms (Tabla

3.V).

TABLA 3.V. Dependencia con la concentración de sal de las constantes cinéticas monoexponenciales de disociación, junto con los correspondientes tiempos de vida, para la disociación inducida por SDS de los complejos formados con dq2pyp y DNA de timo de ternera.

Sal añadida/mM	k_d/s^{-1}	τ/ms
10	389	2.57
25	634	1.58
30	688	1.45
40	756	1.32
60	942	1.06

Todos los experimentos se realizaron en tampón P (con diferentes concentraciones de NaCl) y a 25.0 ± 0.1 °C. El mejor ajuste lineal a los datos experimentales es $\log k_d = 0.70 \log[Na^+] + 3.79$.

*Tiempos de vida del complejo ($\tau = 1/k_d$).

La ecuación de la recta resultante del ajuste a la representación doble-logarítmica es :

$$\log k_d = 0.70 \log[Na^+] + 3.79$$

El valor de la pendiente estimado se encuentra por tanto dentro de los predichos por la teoría de condensación de contraiones para un intercalante dicatiónico (0.6-0.8),^{13,14,61} por lo que se confirma una vez más el modo intercalativo de unión de esta droga.

El análisis de las cinéticas de disociación permite obtener información adicional acerca del tiempo de vida del complejo dq2pyp-DNA y del mecanismo de unión de esta droga. Las constantes de disociación del dq2pyp resultan ser aproximadamente dos órdenes de magnitud mayores que las del propidio existentes en la bibliografía a cualquier fuerza iónica (la recta obtenida para el propidio es $\log k_d = 0.85[\log Na^+] + 1.35$). Leupin et. al investigaron mediante ¹H-RMN la influencia de los grupos amino del etidio en las constantes de disociación de esta molécula.⁸³ Para derivados del etidio carentes del grupo amino en posición 8, pero no en posición 3, se observó a 35 °C y 100 mM NaCl que los complejos correspondientes mostraban intercambio rápido ($\tau < 1$ ms), mientras que tanto para el etidio como para derivados con grupo amino en posición 8 en estas condiciones el intercambio era intermedio ($2 < \tau < 3$ ms). Finalmente, a baja temperatura (< 17 °C para el etidio) este último grupo de moléculas mostraba intercambio lento ($\tau \geq 10$ ms).

El valor extrapolado a 100 mM NaCl del dq2pyp es de 0.8 ms (a 35 °C sería aún menor), mientras que el obtenido para el propidio a 20 °C en la referencia 61 es de 220

ms (a 17 °C sería aún mayor). Por tanto, parece que los grupos amino en fenantridinas *dicatiónicas* tienen un efecto similar en los tiempos de vida de los complejos que el observado en fenantridinas *monocatiónicas*. Podría además sugerirse que es la ausencia de un grupo amino en posición 8, y no en posición 3, la causa del intercambio rápido observado en el dq2pyp.

A partir de la dependencia con la concentración de ion sodio de las constantes de equilibrio de asociación (ver 3.4.8) y cinéticas de disociación descritas en este apartado, es posible determinar las correspondientes constantes cinéticas de *asociación* a cualquier fuerza iónica:

$$\log k_a = \log K_b + \log k_d = \left(\frac{\partial \log K_b}{\partial \log [Na^+]} \right) \log [Na^+] + \log K_b(0) + \left(\frac{\partial \log k_d}{\partial \log [Na^+]} \right) \log Na^+ + \log k_d(0)$$

donde sustituyendo los valores correspondientes a las distintas magnitudes proporciona la siguiente ecuación:

$$\log k_a = -1.06 \log [Na^+] + 5.53$$

En la Tabla 3.VI se comparan los valores experimentales de las pendientes de las constantes de disociación y asociación con los predichos a partir de diferentes modelos cinéticos⁶¹ (ver 2.2.4).

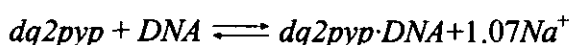
TABLA 3.VI Pendientes experimentales y teóricas de representaciones de $\log k_d$ vs. $\log [Na^+]$ y de $\log k_a$ vs. $\log [Na^+]$ para el dq2pyp.

Reacción	Experimento	Modelo 1	Modelo 2 con $n=m$	Modelo 2 con $n \neq m$
Disociación	0.70	1.05	0.13	0.52
Asociación	-1.06	-0.70	-1.63	-1.24

m =número de pares iónicos formados tras la intercalación de la droga en el DNA (1.85 para el dq2pyp, ver 3.4.8). n =número de pares iónicos en el complejo de condensación. $f=0.76$ =fracción de contraiones asociados por condensación en el DNA nativo.

El primer modelo al cual hace referencia la Tabla anterior lleva implícito un mecanismo de unión directa, en el que hay un paso rápido correspondiente a la apertura de la hélice, seguido de otro lento correspondiente a la intercalación directa de la droga, que es atraída por interacciones electrostáticas apantalladas con el DNA abierto. Al ser el segundo paso la etapa limitante del proceso, se puede considerar el primero en una situación de preequilibrio. Por el contrario, en el modelo 2 el paso rápido corresponde a

la condensación de la droga en el DNA (con la correspondiente liberación de contraiones sodio), que es seguido por un paso lento consistente en la apertura del DNA en el sitio de unión y la consiguiente intercalación. Mientras que el primer modelo predice una mayor dependencia con la $[Na^+]$ para la disociación que para la asociación, el segundo predice lo contrario, que es lo que de hecho se observa experimentalmente. El acuerdo con el modelo 2 aumenta si se considera que el número de pares iónicos formados en el complejo de condensación es igual a $f \cdot m$, es decir, el esperable si la unión fuera simple condensación, y no m simplemente, que corresponde a los pares iónicos *en el complejo de intercalación*. Por tanto, un mecanismo de intercalación bastante probable para el dq2pyp vendría descrito por las dos siguientes reacciones:



donde $dq2pyp \cdot DNA$ representa el complejo de condensación, y $[dq2pyp \cdot DNA]_{int}$ el complejo de intercalación. El número total de contraiones liberados es de 1.66, en buen acuerdo con el obtenido como pendiente de la representación de $\log K_b$ vs. $\log [Na^+]$.

Por otra parte, los valores extrapolados a 0.2 M y 0.5 M NaCl de la k_a del dq2pyp (respectivamente $1.8 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ y $7.1 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$) son del mismo orden de magnitud que los obtenidos experimentalmente para el propidio en esas condiciones (respectivamente $1.1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ y $3.1 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$).⁶¹ Sin embargo, los valores para el dq2pyp son aproximadamente dos veces mayores que los del propidio. Esta discrepancia dentro del mismo orden de magnitud podría indicar que si bien el mecanismo de intercalación en ambas drogas es el mismo, en el caso del dq2pyp existiría una mayor facilidad en la creación de un sitio de intercalación apropiado. A partir de las simulaciones de dinámica molecular de ambas drogas (ver 3.4.5) es posible observar que mientras que el dq2pyp es capaz de adoptar múltiples orientaciones dentro del sitio de intercalación, el propidio tiene un posicionamiento mucho más restringido, debido a que rellena completamente el sitio de intercalación. Por tanto, cabría esperar que la proporción de sitios abiertos en el DNA con la geometría apropiada para intercalar la droga fuera mayor en el caso del dq2pyp que en el caso del propidio, originando la diferencia observada en las constantes cinéticas de asociación.

Aparte de la unión por intercalación, no puede descartarse un modo territorial de asociación a muy bajas fuerzas iónicas, sobre todo teniendo en cuenta la naturaleza

dicatiónica de los viológenos. Para conciliar este modo adicional de unión con la existencia de un punto isobéptico en las titulaciones espectrofotométricas, habría que suponer que el espectro de la forma territorialmente unida es igual al de la intercalada.

3.4.3 Especificidad por pares de bases GC alternantes del DNA

La especificidad de base de los viológenos se estudió mediante isotermas de unión a polinucleótidos sintéticos. Considerando la máxima afinidad del dq2pyp por el DNA, se utilizó esta droga como modelo para toda la serie.

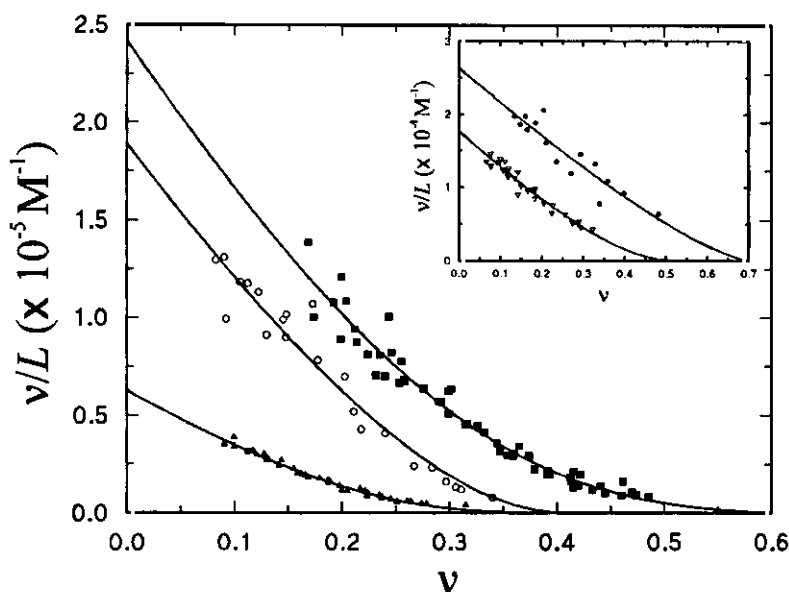


Figura 3.14. Isotermas de unión de la interacción de dq2pyp con poly[d(GC)]₂ (cuadrados), DNA de timo de ternera (círculos blancos), y poly[d(AT)]₂ (triángulos negros). Detalle: isotermas con poly(dG)-poly(dC) (círculos negros) y poly(dA)-poly(dT) (triángulos blancos). Todos los experimentos en tampón P y a 25.0 ± 0.1 °C. Superpuestos a los puntos experimentales se muestran en línea continua los mejores ajustes de las ecuaciones de McGhee-von Hippel.

La Figura 3.14 muestra las representaciones de Scatchard de la interacción del dq2pyp con los heteropolímeros alternantes poly[d(GC)]₂ y poly[d(AT)]₂, así como con DNA de timo de ternera (previamente descrita, ver 3.4.1 y Figura 3.10). En el detalle de dicha figura se muestran asimismo las isotermas con los homopolímeros poly(dA)-poly(dT) y poly(dG)-poly(dC). Junto con los puntos experimentales se muestran, en todos los casos y en línea continua, los mejores ajustes de las ecuaciones cooperativa o no cooperativa de McGhee-von Hippel, dependiendo del polímero. Los parámetros de unión estimados se presentan en la Tabla 3.VII.

TABLA 3.VII. Valor de los parámetros de asociación de dq2pyp con DNA de timo ternera y diferentes polinucleótidos sintéticos, en tampón P y a 25.0 ± 0.1 °C.

Polinucleótido	$k_b \times 10^{-5} / M^{-1}$	ω
----------------	-------------------------------	----------

poly[d(GC)] ₂	2.42	1.6	0.45
DNA de timo de ternera	1.90	2.4	1.00**
poly[d(AT)] ₂	0.63	2.1	0.40
poly(dG)·poly(dC)	0.26	1.4	1.00**
poly(dA)·poly(dT)	0.18	1.9	1.00**

*Tomado de la Tabla 3.IV.

** En estos casos se ajustó la ecuación no cooperativa de McGhee-von Hippel; la utilización de la cooperativa no resultó en una mejora significativa del ajuste.

A partir del análisis de esta tabla es posible concluir que el dq2pyp tiene una importante preferencia por pares de bases GC alternantes, ya que la constante de asociación a poly[d(GC)] ($2.42 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) es cuatro veces mayor que a poly[d(AT)] ($0.63 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). La constante de asociación a DNA de timo de ternera, que tiene una proporción de bases GC del 42 %, es intermedia entre los anteriores valores, tal y como cabría esperar. Las constantes de asociación a homopolinucleótidos son de aproximadamente un orden de magnitud menores en comparación con las de los correspondientes heteropolinucleótidos: $0.26 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para el poly(dG)·poly(dC), y $0.18 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para el poly(dA)·poly(dT). Por tanto, el orden de afinidades resultante es: poly[d(GC)]₂ > DNA de timo de ternera > poly[d(AT)]₂ > poly(dG)·poly(dC) > poly(dA)·poly(dT). En todos los casos el tamaño del sitio de unión es de aproximadamente dos pares de bases, tal y como se esperaría de un intercalante que siguiera un modelo de exclusión vecina. Las constantes de cooperatividad son 1 (unión no cooperativa) o ligeramente menores (unión ligeramente anticooperativa).

3.4.4 Intercalación parcial y asimétrica de las tres drogas en el DNA

Una vez demostrado experimentalmente el modo de unión por intercalación de los viológenos, es posible utilizar cálculos de campo de fuerzas para estudiar la estructura y dinámica de los correspondientes complejos droga-DNA.

Estudios de ensamblado ("docking") indican que existen para las tres drogas (dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp) múltiples posicionamientos de mínima energía no enlazante en el sitio de intercalación. Ello es debido a que la fenantridina (parte de la molécula que estaría intercalada), al no tener grupos amino como el etidio, no rellena completamente el espacio en dicho sitio. En las estructuras cristalográficas del etidio con dinucleótidos se observa que sus dos grupos amino interaccionan simultáneamente con los esqueletos azúcar-fosfato de sendas cadenas de DNA.⁷² Por el contrario, en los viológenos sólo es

posible la interacción con uno de los esqueletos azúcar-fosfato en el sitio de intercalación. Debido a ello, son factibles, hasta cierto punto, traslaciones y rotaciones de la droga, siempre con la fenantridina paralela a los pares de bases. Habida cuenta que estas moléculas no tienen grupos dadores o aceptores de enlaces de hidrógeno, los mejores posicionamientos son únicamente el resultado de interacciones electrostáticas y de van der Waals, que a su vez vienen determinadas por la distribución de cargas y la forma del sitio de intercalación en consideración.

Mediante estudios de ensamblado/minimización de energía en el paso CpG central de $d(\text{CGCGCG})_2$, es posible comparar las geometrías de intercalación de los viológenos entre sí y con el etidio (Figura 3.15). Asumiendo una intercalación de la fenantridina y con el anillo de piridina en el surco menor (por analogía con las estructuras cristalográficas de etidio intercalado en dinucleótidos⁷²), y minimizando a partir de los mejores ensamblados absolutos, se observa una menor inserción de los viológenos entre los pares de bases en comparación con el etidio (Figura 3.15).

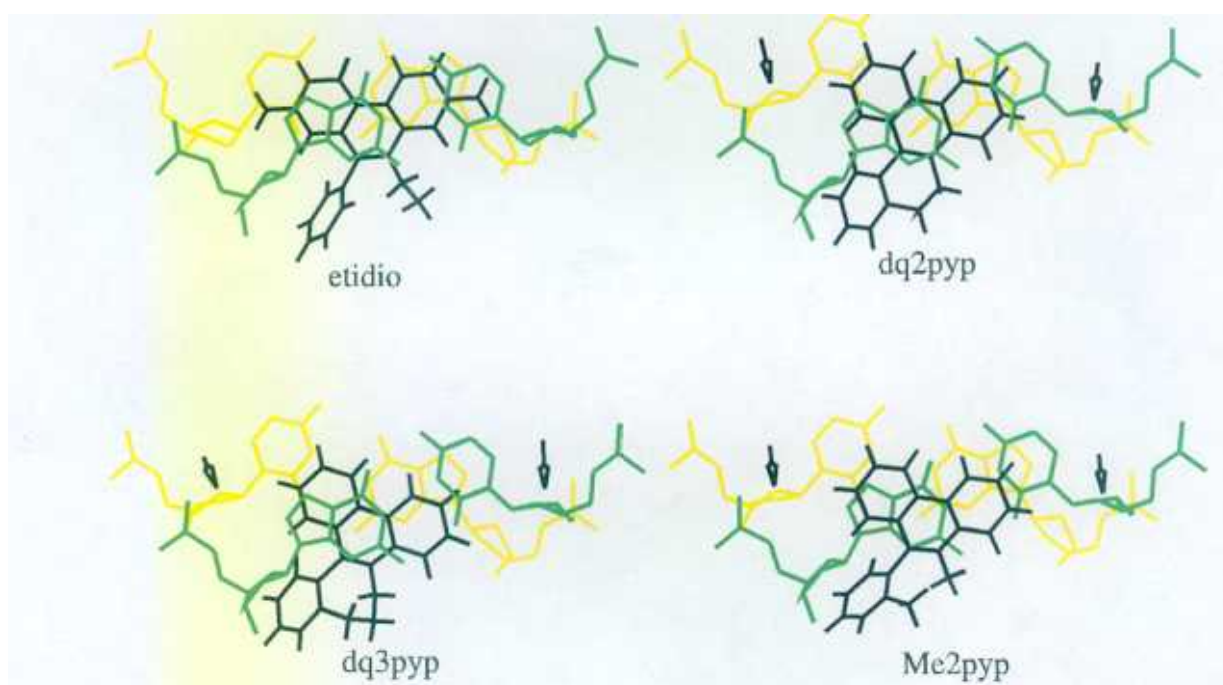


Figura 3.15. Vista superior de los complejos droga- $d(\text{CGCGCG})_2$ minimizados, en el sitio de intercalación (pares de bases centrales del oligonucleótido; G4-C9 en verde, y C3-G10 en amarillo; droga en negro). Se señalan con una flecha los azúcares con conformación ${}^{\circ}\text{E}$ o ${}_{4}\text{E}$.

El mayor solapamiento superficial fenantridina-pares de bases se da en el dq2pyp, donde el eje longitudinal de aquella es paralelo al del par de bases inferior (en el etidio este eje es paralelo al que conecta los fosfatos en el sitio de intercalación). El anillo de

piridina interacciona con la pared superior del surco menor, orientándose aproximadamente paralela a la misma. La cadena dialquilo choca con el grupo amino de la guanina superior, impidiendo una mayor inserción. Considerando el dq3pyp, el eje longitudinal de la fenantridina es paralelo al del par de bases inferior. La inserción es menor, debido a que la cadena dialquilo es más voluminosa. Se observan de nuevo interacciones de van der Waals entre la piridina y la pared superior del surco menor. Por último, el Me2pyp se orienta paralelamente al eje que conecta los fosfatos, pero el metilo de la piridina impide la penetración de la droga (en comparación con el etidio) en el sitio de intercalación, tanto si se orienta hacia arriba como hacia abajo (no mostrado). En definitiva, parece que por una parte la ausencia de grupos amino que rellenen completamente el sitio de intercalación y que interaccionen con los fosfatos permite orientaciones de las drogas no paralelas al eje que conecta los mismos, y por otra parte que las cadenas dialquilo o los metilos impiden una total inserción en el sitio.

Esta intercalación parcial y asimétrica de los viológenos podría explicar la menor viscosidad a saturación de estas drogas en comparación con la del etidio (ver 3.4.2, Figura 3.11). Al intercalarse provocarían una curvatura en la doble hélice, lo cual resultaría en un menor incremento del tamaño hidrodinámico del DNA tras la intercalación, en comparación con un intercalante "clásico".

Las minimizaciones de energía también predicen un menor desenrollamiento de la hélice por parte de los viológenos: mientras que los ángulos de desenrollamiento por intercalación del dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp son de respectivamente -19° , -18° y -19° , el del etidio es de -23° (el experimental para éste es de -26°).⁸⁴ Como consecuencia de este menor desenrollamiento, el plegamiento de los azúcares cambia: aunque se mantiene en general un modelo de plegamiento mixto (3E - $3'$, $5'$ - 2E), los azúcares de las citidinas se desvían hacia conformaciones 0E o ${}_4E$.

Si se comparan las energías de unión de los diferentes viológenos a esta secuencia (Tabla 3.VIII), se observa una buena correlación con las correspondientes energías libres de unión, sugiriendo que las diferencias entre éstas podrían explicarse en base principalmente a factores entálpicos.

3.4.5 Especificidad de base del dq2pyp desde el punto de vista molecular

Dado que se ha investigado detalladamente la especificidad de base del dq2pyp mediante

isotermas de unión a polinucleótidos sintéticos, se realizaron estudios paralelos de ensamblado/minimización de energía/dinámica molecular (cuyo protocolo se describe en 2.3.2.1) al objeto de obtener información sobre la estructura y dinámica de la intercalación de esta droga en las secuencias correspondientes. En la Tabla 3.IX se muestran las energías de unión (ΔE), de interacción (E_{int}), de desestabilización de la doble hélice (E_{dh}) y de desestabilización de la droga (E_{dd}) para la intercalación del dq2pyp en el paso central de diferentes decanucleótidos. Las secuencias modeladas son las presentes en los polinucleótidos sintéticos utilizados en las isotermas de unión, y los complejos resultantes se denotan por un código descrito en el pie de dicha Tabla. También se presenta, para cada complejo, el máximo MSD alcanzado durante las dinámicas moleculares obtenidas utilizando como coordenadas iniciales las estructuras minimizadas previamente. Este parámetro da idea de la movilidad de la droga en el sitio de intercalación. Asimismo, en la Tabla 3.IX se recogen los correspondientes valores para complejos equivalentes con propidio. Esta fenantridina dicatiónica se utilizó como control, al igual que en otros apartados. A continuación se describen los resultados correspondientes, agrupados según secuencias correspondientes a diferentes polinucleótidos.

Secuencias correspondientes a poly[d(GC)]₂. Para cada una de las dos secuencias correspondientes a poly[d(GC)]₂ existen dos orientaciones de mínima energía, caracterizadas por tener la piridina contactando la pared superior del surco menor (complejos smcgs y smgcs) o la pared inferior de dicho surco (complejos smcgi y smgci). La razón para estas dos orientaciones parece ser el surco menor relativamente abierto de estas secuencias (Figura 3.16), que sólo permitiría la interacción de la piridina con una de sus paredes. La interacción con la pared superior parece ser energéticamente preferida, tanto para el paso CpG como para el GpC (Tabla 3.IX). El intercambio entre dichas orientaciones sería relativamente fácil a 300 K, ya que en la dinámica molecular de smcgl la droga se encuentra en todo momento en orientación s, mientras que en una dinámica de smcgs sin fase de calentamiento (datos no mostrados) la droga se desplazó durante los primeros picosegundos hacia una orientación i, en la cual permaneció el resto de la simulación. Este fácil intercambio podría explicarse considerando que sólo es necesario un ligero cambio conformacional en el DNA para pasar de una orientación a otra, puesto que la RMSdev entre los sitios de intercalación de smcgs y smcgi es de sólo 0.48,

mientras que entre smgcs y smgci es de 0.44. La movilidad de la droga en el sitio de intercalación es moderada (máximo MSD entre 4.44 y 7.69, Tabla 3.IX), y mayor para los complejos de tipo s. Asimismo, la droga parece preferir energéticamente el paso CpG sobre el GpC (Tabla 3.IX), debido a una muy baja energía de desestabilización de la hélice, que compensa la menor energía de interacción de estas secuencias.

Secuencias correspondientes a poly[d(AT)]₂. En este caso sólo se obtiene un único complejo para cada secuencia (sma and smta, Figura 3.16), debido a que el surco menor es estrecho y sus dos paredes interactúan simultáneamente con la piridina, que se encuentra en posición central. La movilidad de la droga es de nuevo moderada (máximo MSD entre 4.66 y 5.69, Tabla 3.IX), a pesar de que durante las dinámicas moleculares el surco se abre (aunque en promedio sigue siendo más estrecho que el de las anteriores secuencias). La unión está favorecida energéticamente para el paso ApT sobre el TpA, debido principalmente a una mayor energía de interacción (Tabla 3.IX).

Secuencias correspondientes a poly(dG)·poly(dC). Otra vez se obtienen dos orientaciones de mínima energía para cada secuencia (smggs, smggi, smccs y smcci, Figura 3.17). Tanto smggs como smcci corresponden a estructuras donde la droga sólo se intercala completamente en la cadena de poly(dG), mientras que las dos citosinas de poly(dC) están sólo parcialmente desapiladas. Durante las correspondientes dinámicas moleculares la droga conserva este modo semiintercalado de unión, y presenta movilidad restringida (máximo MSD de 3.01 y 3.10, respectivamente para smcci y smggs). Los otros dos complejos (smggi y smccs, Figura 3.17) están desfavorecidos energéticamente (Tabla 3.IX), y presentan intercalación normal. Sin embargo, durante las dinámicas moleculares los complejos adoptan un modo semiintercalado de unión, similar al observado con smggs y smcci, y de nuevo la droga muestra movilidad restringida (máximo MSD de 3.50 y 3.25, respectivamente para smggi y smccs, Tabla IX). En todas las estructuras de mínima energía el surco menor es algo más estrecho que el observado en las secuencias alternantes, y el propeller twist es también más negativo.

Secuencias correspondientes a poly(dA)·poly(dT). Al igual que ocurría en las secuencias correspondientes a poly[d(AT)]₂, debido a que el surco menor es estrecho sólo se obtiene un único complejo de mínima energía para cada secuencia (smaa y smtt, Figura 3.16). La piridina se dispone centralmente, interactuando con ambas paredes del

surco. De los dos complejos, *smaa* es ligeramente preferido energéticamente sobre *smtt*, pero las diferencias en las energías de desestabilización de la hélice y de interacción son muy pequeñas. En estas estructuras se observa un propeller twist muy negativo, y la movilidad de la droga es mayor que en las demás secuencias.

3.4.6 La unión por surco mayor está desfavorecida

La inspección de la Tabla IX sugiere asimismo que la intercalación de la droga vía surco mayor (todos los anteriores complejos han sido intercalados por el menor) está desfavorecida energéticamente (complejos *sMcg* y *sMat*) en aproximadamente 10 kcal/mol. Analizando las interacciones droga-DNA se concluye que este efecto es debido principalmente a la ausencia de interacción piridina-surco, ya que en estos complejos la piridina queda expuesta al disolvente.

3.4.7 El modelado molecular predice una unión enantioespecífica del *dq2pyp* y del *dq3pyp* al B-DNA

Todos los estudios de minimización de energía y dinámica molecular descritos hasta el momento se han realizado con el enantiómero *S* de las drogas. Si estos estudios se extienden a los enantiómeros *R*, se concluye que la unión de éstos está desfavorecida energéticamente y posee una geometría de intercalación diferente.

Considerando el *dq2pyp*, las energías de unión obtenidas con el enantiómero *R* son 5-9 kcal/mol menos negativas que las de los correspondientes complejos con el enantiómero *S* (Tabla 3.IX). La razón de esta diferencia se encuentra en una menor energía de interacción, que a su vez es debida a que la piridina en este tipo de complejos está expuesta al disolvente y no interacciona con ninguna de las paredes del surco. Este efecto es particularmente importante en los complejos *rmta* y *rmat*, donde la disposición de la piridina no alineada con el surco provoca una apertura del mismo (Figura 3.17). En el caso del complejo *rmcg* adicionalmente se observa un aumento de la energía de desestabilización de la hélice (Tabla 3.IX).

Las dinámicas moleculares con complejos del *dq2pyp* de tipo *r* muestran (excepto en el caso del *rmat*) grandes valores de máximo MSD, y por tanto una alta movilidad en el sitio de intercalación. Durante las simulaciones, la droga rota alrededor de su normal y en ciertos momentos adopta una geometría donde el eje longitudinal de la fenantridina se dispone perpendicularmente al que conecta los fosfatos del sitio de intercalación, con el

plano de la piridina paralelo al suelo del surco menor (Figura 3.18a). Algunas de las estructuras con este tipo de disposición "perpendicular" muestran asimismo a la cadena dialquilo y parte de la piridina intercaladas entre los pares de bases (Figura 3.18b), sugiriendo un camino cinético por el cual el DNA podría catalizar la interconversión entre los enantiómeros mediante la estabilización de la conformación completamente plana del dq2pyp. Al objeto de estudiar la estabilidad de esta nueva geometría perpendicular de intercalación sugerida por las dinámicas moleculares, se realizaron estudios adicionales de la misma por ensamblado/minimización de energía. El complejo resultante (rpcg, Tabla 3.IX y Figura 3.17), está todavía desfavorecido energéticamente respecto a smcg, aunque es más estable que el correspondiente complejo de intercalación "paralela".

Por tanto, los estudios comparativos de modelado molecular con los dos enantiómeros del dq2pyp sugieren que la intercalación de *S*-dq2pyp en B-DNA está favorecida respecto a la de *R*-dq2pyp. El primer enantiómero tendría un modo de intercalación "paralelo", mientras que el segundo fluctuaría entre el anterior y un modo de intercalación "perpendicular". Asimismo, las secuencias con pares de bases AT discriminarían más entre ambos enantiómeros que las de pares de bases GC (ver diferencias de energías entre los correspondientes complejos de tipo r y de tipo s).

Considerando el dq3pyp, la energía de unión para la intercalación del enantiómero *S* por el surco menor del paso CpG central de la secuencia d(CGCGCGCGCG) es 1.8 kcal/mol más negativa que la del enantiómero *R*. En el paso TpA central de la secuencia d(CATATATATG) la diferencia de energías de unión es de 3.5 kcal/mol. Analizando las distintas contribuciones a la energía de unión, se concluye que en ambas secuencias la diferencia reside principalmente en el componente de van der Waals de la energía intermolecular, ya que el electrostático, así como la energía de desestabilización del DNA y de la droga son similares para ambos enantiómeros. La inspección de las estructuras de los complejos minimizados permite ver que mientras que la piridina del enantiómero *S* interacciona con la pared superior del surco menor, la del *R* está expuesta al disolvente. Es este contacto el que resulta en un componente de van der Waals más favorable para el enantiómero *S*. Estos resultados sugieren asimismo que la enantioespecificidad sería mayor con pares de bases AT que GC; la razón sería que mientras que en éstos el enantiómero *S* estaría parcialmente desfavorecido frente al *R* por choques estéricos de la

cadena dialquilo con los grupos amino protuberantes en el surco menor, no existiría tal problema con los pares AT.

Las energías de unión calculadas para ambos enantiómeros del Me2pyp son prácticamente iguales (Tabla 3.VIII), sugiriendo que no existe enantioespecificidad en la unión de esta droga al DNA. Según esto, su menor constante de asociación en relación con la del dq2pyp sería debida a los choques estéricos del grupo N-metilo con el par de bases superior o inferior del sitio de intercalación (dependiendo del enantiómero), impidiendo una mayor inserción en el mismo, y no a la existencia de un enantiómero estable desfavorecido en la unión.

TABLA 3.IX. Energías de unión y sus componentes para la interacción por intercalación del dq2pyp con diferentes decadesoxinucleótidos en conformación B, calculadas por mecánica molecular. También se muestra el máximo MSD de la droga de las simulaciones de dinámica molecular en vacío obtenidas utilizando como coordenadas iniciales los complejos refinados. Todas las energías en kcal/mol.

Complejo	$E_{in} = (E_{vdw} + E_{el})^{**}$	E_{hb}^{**}	E_{ed}^{**}	ΔE^{**}	Max. MSD ⁸⁹
smal	-87.52 -58.28 -29.24	43.00	0.94	-43.57	5.69
smaa	-83.19 -55.06 -28.13	39.55	1.03	-42.61	8.59
smta	-83.19 -54.32 -28.87	39.88	1.22	-42.08	4.66
smti	-83.33 -54.63 -28.70	39.67	0.38	-43.28	5.83
smgg	-76.73 -52.64 -24.09	36.02	0.90	-39.31	3.50
smggs	-80.64 -53.85 -26.79	35.24	0.77	-46.68	3.10
smgcs	-77.11 -52.50 -24.61	38.61	0.88	-37.61	7.09
smgci	-78.80 -53.86 -25.04	41.36	0.81	-36.64	6.85
smcgg	-74.06 -53.86 -20.2	40.50	1.01	-32.55	4.44
smcgs	-73.07 -50.56 -22.51	29.25	1.42	-42.40	7.69
smcc	-76.29 -53.20 -23.96	35.08	1.06	-40.10	3.25
smcca	-74.45 -49.85 -24.60	32.64	0.75	-41.07	3.01
rmgg	-71.69 -49.27 -22.41	32.06	1.87	-37.76	12.87
rmta	-73.77 -46.94 -26.83	37.65	2.62	-33.51	20.93
rmata	-75.53 -50.80 -24.73	39.42	1.09	-35.02	7.59
rpcc	-72.00 -52.01 -19.99	36.05	0.99	-34.96	26.25
sMgg	-67.45 -46.83 -20.62	31.02	0.39	-36.03	8.46
sMat	-63.14 -43.99 -19.15	34.57	0.27	-28.30	

*Las estructuras se designan como (s/r)(m/M)(xy)(u/l). La primera letra indica el enantiómero usado en el modelado (s corresponde a S, r a R). La segunda letra corresponde al surco desde el cual la droga se intercala (m para el surco menor, M para el mayor). Las dos siguientes hacen referencia a la secuencia del decadesoxinucleótido: gc para d(GCGCGCGCGC)₂, ta para d(TATATATATA)₂, gc para d(GGGGGGGGGG)d(CCCCCCCCCC), etc; la droga se intercala entre los pares de bases centrales de estas secuencias (nucleótidos subrayados). La quinta letra, en aquellos casos donde aparece, se refiere a la pared del surco menor que está en contacto con el anillo de piridina, para una disposición vertical del complejo visto por el surco menor y con la cadena alquilo delante del plano de la fenantridina: s indica la pared a la izquierda de la droga (complejo de pared superior), i indica la pared a la derecha de la droga (complejo de pared inferior), y cuando no aparece letra en esa posición significa una disposición central de la piridina.

**Ein = Energía de interacción no enlazante entre la droga y el polinucleotido en el complejo minimizado, que puede expresarse como la suma de las contribuciones de interacción de van der Waals (Evdw) y electrostática (Eel).

[†]Edh = Energía de desestabilización de la doble hélice, calculada como la diferencia entre las energías potenciales del oligonucleótido en el complejo y en conformación B minimizada.

^{††}Edd = Energía de desestabilización de la droga, calculada como la diferencia entre las energías potenciales de la droga en el complejo y minimizada aisladamente.

[§]ΔE = Energía de unión = Ein + Edh + Edd.

^{§§}Para su definición, ver 2.3.2.1.

3.4.7 Verificación experimental de la unión enantioespecífica a B-DNA de los viológenos

El espectro de DC del dializado de dq3pyp racémico unido a DNA de timo de ternera aparece representado en la Figura 3.20 (triángulos). Para este experimento, 2 ml de una disolución de dq3pyp racémico (0.8 mM) y DNA (0.8 mM) en tampón P se dializaron durante 48 horas a 4 °C frente a 3 ml del mismo tampón. El espectro resultante muestra máximos a 420 y 285 nm, y mínimos a 350 y 245 nm; considerando el espectro de absorción del dq3pyp (detalle), se aprecia que los mismos se corresponden con los máximos de absorción de la droga. Si se elimina el DNA presente dentro de la bolsa de diálisis mediante precipitación por adición de ácido perclórico seguida de centrifugación, el sobrenadante presenta un espectro igual pero cambiado de signo respecto del anterior (Figura 3.20, cuadrados). Estos resultados indican que *ha habido un enriquecimiento a ambos lados de la bolsa de diálisis de enantiómeros opuestos del dq3pyp, y que por tanto la droga se une enantioespecíficamente al DNA*. Experimentos control en los cuales el DNA se dializa sin droga no presentan absorción en el dializado, demostrando que no existe fuera de la bolsa de diálisis DNA que por interacción con la mezcla racémica pueda dar lugar al dicroísmo observado (que entonces sería dicroísmo inducido). Por otra parte, el dicroísmo inducido sobre la muestra racémica puede medirse previamente a la realización de la diálisis, y resulta ser completamente distinto a los de dentro y fuera de la bolsa de diálisis (Figura 3.20, círculos abiertos).

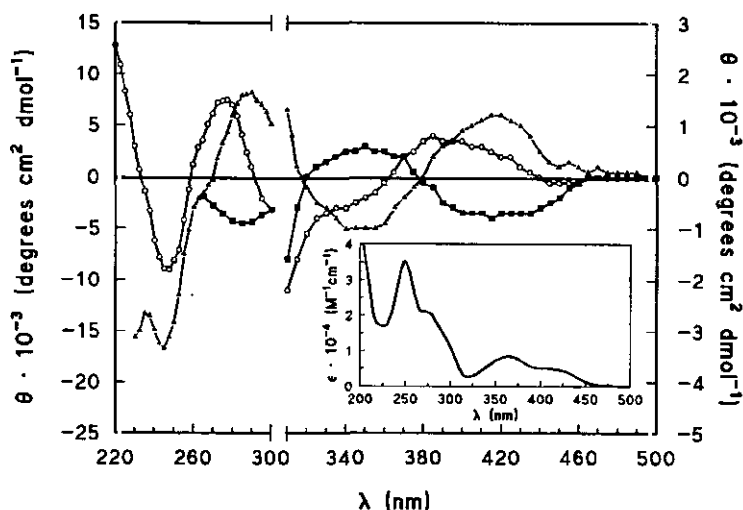


Figura 3.20. Espectro de DC del complejo DNA-dq3pyp antes de ser dializado (círculos blancos), del dializado de dicho complejo (triángulos) y del dq3pyp presente dentro de la bolsa de diálisis tras eliminar el DNA (cuadrados). Los datos se expresan en elipticidades molares referidas a concentración total de droga, calculada por medidas de absorbancia y utilizando $\epsilon_{366} = 9500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En el caso del complejo DNA-dq3pyp la elipticidad está referida a la concentración total (droga + DNA). Detalle: espectro de absorción del dq3pyp en tampón P.

Mediante cromatografía de afinidad en celulosa-DNA es posible separar ambos enantiómeros a escala preparativa. En la Figura 3.21 se muestra un cromatograma típico, en donde se registra la elución midiendo la absorción a 366 nm y el DC a 350 nm. La columna, de 13 cm de longitud y 1.6 cm de diámetro, se equilibra inicialmente con tampón P, 30 mM NaCl. A continuación se cargan 1.5-2 mg de mezcla racémica de dq3pyp disuelta en el mismo tampón. Con esta concentración de sal, el enantiómero de menor afinidad no es retenido en la columna y sale a un volumen de elución de aproximadamente 150 ml. En este momento se comienza a pasar por la columna tampón P, 100 mM NaCl, que provoca la elución del enantiómero de mayor afinidad a un volumen de elución de 300 ml. El hecho de que las elipticidades inicial y final sean iguales en valor absoluto pero de signo opuesto, y que las áreas bajo ambos picos de absorción sean similares, indican que los enantiómeros han sido bien resueltos y aislados con gran pureza. De hecho, los espectros de DC de los enantiómeros separados (Figura 3.21, detalle), aunque cualitativamente similares a los de la diálisis, presentan una considerablemente mayor elipticidad molar. A partir de los espectros de DC es posible estimar las elipticidades molares del (supuesto) enantiómero *S*: $\theta_{245} = 90000$, $\theta_{285} = -65000$, $\theta_{350} = 8500$ y $\theta_{420} = -6800 \text{ grad cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$.

En el caso del dq2pyp, el dializado del racémico en presencia de DNA en las mismas condiciones que el dq3pyp no muestra dicroísmo circular, ni tampoco el interior de la

bolsa de diálisis tras eliminar el DNA. Las cromatografías en celulosa-DNA del dq2pyp realizadas en las mismas condiciones que las descritas anteriormente para dq3pyp y a 4 °C presentan dos picos (Figura 3.22) : una primera forma de la droga es eluída directamente a 30 mM NaCl, quedando retenida una segunda forma, que para separarse de la columna requiere la adición de sal a una concentración de 100 mM. Sin embargo, las muestras obtenidas presentan un espectro de DC no reproducible y de escasa magnitud. Posiblemente la única explicación a estos resultados sería suponer que los dos enantiómeros de esta droga se unen de nuevo enantioespecíficamente al DNA (lo que explicaría la retención selectiva de los enantiómeros en la columna de DNA-celulosa), pero que el hecho de tener menor energía de interconversión daría lugar a una rápida racemización que impediría la obtención de los enantiómeros puros estables a temperatura ambiente. En el experimento de la bolsa de diálisis existiría un reequilibrado enantiomérico continuo de la droga a medida que saliera fuera de la bolsa de diálisis, de modo que en todo momento se tendría la mezcla racémica a ambos lados de la bolsa de diálisis.

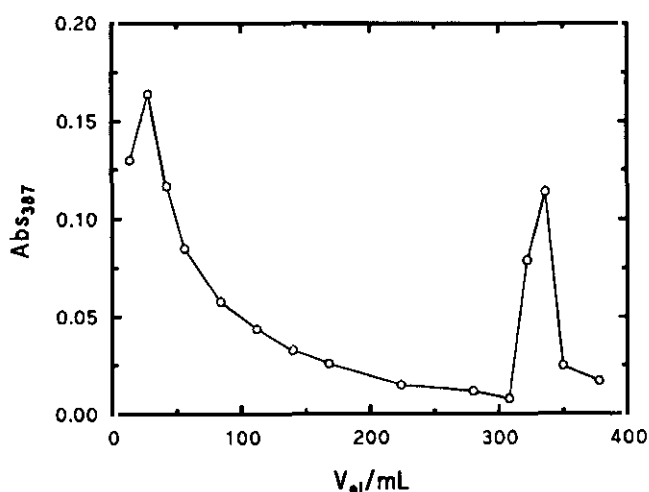


Figura 3.22. Perfil de elución de una cromatografía de dq2pyp racémico en celulosa-DNA.

Por tanto, una posible razón adicional de la menor constante de asociación del dq3pyp en comparación con la del dq2pyp podría ser el hecho de que sus enantiómeros son estables frente a la interconversión en el tiempo en que se realiza la isoterma, de modo que la constante de asociación medida sería menor que la del enantiómero de mayor afinidad. Por el contrario, en el caso del dq2pyp se produciría un enriquecimiento de la disolución en el enantiómero de unión fuerte a medida que se añadiera DNA a la misma.

Llegados a este punto, cabe discutir el modo de unión de cada uno de los enantiómeros de dq2pyp y dq3pyp por separado. Las minimizaciones de energía indican que ambos enantiómeros pueden intercalarse en el DNA, aunque el *S* esté favorecido. Los experimentos de dicroísmo lineal fueron realizados en condiciones en las cuales cabe suponer que toda la droga está unida al DNA, puesto que éste estaba en exceso y los experimentos cromatográficos indican que en ausencia de sal ambos enantiómeros interaccionan con el DNA (para eluir uno de los enantiómeros de la columna, donde el DNA está en exceso, fué necesario aumentar la concentración de NaCl hasta 30 mM). El espectro de dicroísmo lineal reducido del dq3pyp es negativo y constante en toda la región UV-visible. Esto significa que todos los momentos de transición se disponen perpendicularmente al eje de la hélice. Si uno de los enantiómeros no estuviera intercalado, considerando que los momentos de transición se encuentran en el plano de la fenantridina, algunos de ellos no serían perpendiculares al eje del DNA, y por tanto se observaría un dicroísmo lineal no constante, que podría en ciertas zonas ser incluso positivo. De modo que el espectro observado permite concluir que ambos enantiómeros de dq3pyp se unen por intercalación, al menos en estas condiciones de fuerza iónica. En cuanto al dq2pyp, caben dos interpretaciones. Si en las condiciones de exceso de DNA utilizadas toda la droga existe como enantiómero (supuestamente) *S*, lo único que se podrá concluir es que este enantiómero se une por intercalación. Si por el contrario permanece cierta proporción de enantiómero (supuestamente) *R*, la conclusión será que ambos enantiómeros se intercalan en el DNA. De todas formas, teniendo en cuenta la similitud estructural entre dq2pyp y dq3pyp, no cabe esperar que haya un enantiómero de dq2pyp que no se una por intercalación, cuando ambos enantiómeros del dq3pyp sí lo hacen.

La verificación experimental de la enantioespecificidad del Me2pyp no fue posible debido a la escasa cantidad disponible, y a su inestabilidad en experimentos de larga duración. De todas formas, el modelado molecular sugiere que dicha enantioespecificidad es muy pequeña o nula.

3.4.8 Efecto de polielectrolito. Disección de la energía libre de unión del dq2pyp al DNA

Dado que el dq2pyp es, de toda la serie, la droga que mayor constante de asociación

presenta, se ha utilizado como sistema modelo para analizar la contribución de diferentes fuerzas termodinámicas a la estabilización de su complejo con el DNA, en particular el efecto de polielectrolito.

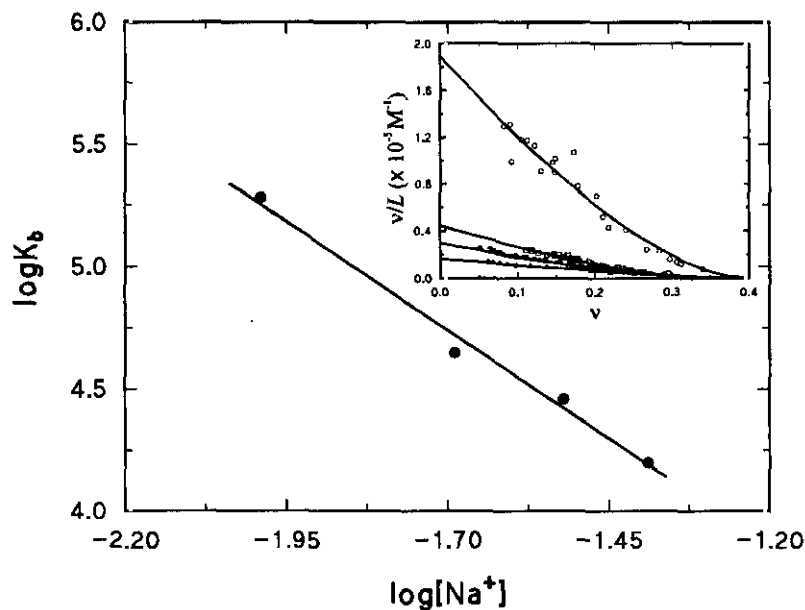


Figura 3.23. Representación doble logarítmica de la dependencia con la concentración de $[\text{Na}^+]$ de las constantes de asociación del dq2pyp con DNA de timo de ternera a 25.0 ± 0.1 °C. El mejor ajuste lineal se muestra superpuesto a los puntos experimentales. Detalle: representaciones de Scatchard de las cuales se ha obtenido la anterior representación. Los tampones de las isotermas son: P (círculos), P10 (cuadrados), P20 (semicírculos) y P30 (triángulos). Superpuesto a los puntos experimentales se muestran los mejores ajustes de la ecuación no cooperativa de McGhee-von Hippel (línea continua).

La Figura 3.23 muestra una representación doble-logarítmica de $\log K_b$ vs. $\log[\text{Na}^+]$ correspondiente a la interacción de dq2pyp con DNA de timo de ternera en tampón P a diferentes concentraciones de NaPF_6 . En línea continua se muestra el mejor ajuste lineal a los puntos experimentales. Las representaciones de Scatchard a las diferentes concentraciones de sal se muestran en el detalle de dicha figura, junto con los mejores ajustes (línea continua) de la ecuación no cooperativa de McGhee-von Hippel a los puntos experimentales. Los parámetros de unión estimados se recogen en la Tabla 3.X; en todos los casos, los tamaños de los sitios de unión son similares (2.4 ± 0.2 pb). La ecuación de la recta resultante del ajuste es:

$$\log K_b = -1.76 \log [\text{Na}^+] + 1.74$$

de donde se concluye que 1.76 iones Na^+ unidos al DNA se liberan al intercalarse una molécula de dq2pyp.

TABLA 3.X Dependencia con la concentración de Na^+ de los parámetros de unión del dq2pyp a DNA de timo de ternera en tampón P y diferentes concentraciones de NaPF_6 . Todas las isotermas a 25.0 ± 0.1 °C.

Tampón	$K_b \times 10^{-5}/M^{-1}$	n
P	1.90	2.4
P10	0.44	2.6
P20	0.29	2.6
P30	0.16	2.2

* Los tampones P10, P20 and P30 corresponden a tampón P con diferentes concentraciones de NaPF_6 añadido: 10, 20 y 30 mM, respectivamente. En todos los casos se utilizó para el ajuste la ecuación no cooperativa de McGhee y von Hippel. El mejor ajuste lineal a los puntos experimentales resulta ser $\log K_b = -1.76 \log[\text{Na}^+] + 1.74$.

Considerando que el dq2pyp se une al DNA por intercalación, estos contraiones se liberan tanto por formación de pares iónicos en el complejo, como por incremento del espaciado entre fosfatos como consecuencia de la intercalación. Estas dos contribuciones se pueden estimar a partir del primer y segundo término de (ver 2.2.2)⁶¹

$$\frac{\partial \log K_b}{\partial \log[\text{Na}^+]} = -4(\psi - \psi^*) - m\psi^*$$

donde ψ y ψ^* son las fracciones de contraiones asociadas por fosfato en las conformaciones B e intercalada del DNA (0.88 y 0.82, respectivamente), y donde m es el número de pares iónicos formados en el complejo. El valor resultante de pares iónicos es de $1.85 \approx 2$ (tal y como cabría esperar de una droga dicatiónica). Este valor ligeramente inferior a 2 podría deberse bien a la liberación simultánea a la intercalación de aniones unidos a la droga, o bien a cambios de hidratación en la droga y/o el DNA como consecuencia de la formación del complejo. Las contribuciones resultantes de liberación de contraiones por formación de pares iónicos e intercalación a partir de la anterior ecuación son de respectivamente 1.52 y 0.24.

La energía libre aportada al proceso de intercalación por esta liberación simultánea de contraiones (ΔG_{ep}) puede estimarse a cualquier concentración de sal (ver 2.2.2 ante la siguiente ecuación:¹⁷

$$\Delta G_{ep} = \left(\frac{\partial \log K_b}{\partial \log[\text{Na}^+]} \right) RT \ln[\text{Na}^+]$$

donde R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta. En la Tabla 3.XI

se muestra la energía libre de unión (ΔG) del dq2pyp a DNA a una concentración de Na^+ de 10.19 mM (tampón P), y las correspondientes contribuciones del efecto de polielectrolito y restantes (ΔG_{nep}). Esta última comprende asimismo las contribuciones de las interacciones de van der Waals, efecto hidrofóbico, enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas:

$$\Delta G_{\text{nep}} = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{efh}} + \Delta G_{\text{enh}} + \Delta G_{\text{ii}}$$

En la misma tabla se muestran como comparación las energías libres de diferentes dicaciones extrapoladas o interpoladas a la misma $[\text{Na}^+]$: la fenantridina dicatiónica propidio, y las fotonucleasas quirales Δ y Λ -Ru(phen)₃²⁺.

TABLA 3.XI. Energía libre de unión (ΔG), junto con la contribución a la misma del correspondiente efecto de polielectrolito (ΔG_{ep}), y las restantes contribuciones (ΔG_{nep}), de la interacción de diversos dicaciones con DNA de timo de ternera a $[\text{Na}^+]=10.19$ mM.

Compuesto	S*	ΔG [†]	ΔG_{ep} ^{**}	ΔG_{nep}
Propidio	2.20	-5.11	-5.97	-3.46
dq2pyp	-1.76	-2.71	-4.78	-2.37
Δ -Ru(phen) ₃ ²⁺	-1.37	-6.74	-3.66	-3.08
Λ -Ru(phen) ₃ ²⁺	-1.24	-6.64	-3.31	-3.33

*Pendiente de la recta de la representación de $\log K_b$ vs. $\log[\text{Na}^+]$.

** Todos los valores de energía libre se expresan en kcal/mol.

[†] Valor extrapolado a partir de la referencia 61, a 25 °C.

[§] Valor extraído de la referencia 82, a 20 °C.

Como puede verse, el dq2pyp es la droga para la cual el efecto de polielectrolito es proporcionalmente más importante, contribuyendo en aproximadamente el 67 % a la energía libre de unión total (en los demás casos está entre el 50-54 %). Sin embargo, en términos absolutos la ΔG_{ep} mayor es la del propidio (debido a su mayor pendiente), y para esta droga también la contribución restante ΔG_{nep} es la mayor. La menor unión de los dos enantiómeros del Ru(phen)₃²⁺ en comparación con el dq2pyp es debida a un efecto de polielectrolito más débil, ya que sus respectivas contribuciones restantes son mayores que la del viológeno.

Los estudios de mecánica molecular previamente descritos pueden ayudar a interpretar la $\Delta\Delta G_{\text{nep}}$ observada entre el propidio y el dq2pyp. El valor experimentalmente observado es de aproximadamente 3 kcal/mol. Considerando que en promedio las energías de desestabilización del DNA y de la droga (respectivamente E_{dh} y E_{da}) son similares para el propidio y el dq2pyp, la diferencia de energías de unión

obtenidas ($\Delta\Delta E \approx 9$ kcal/mol) es debida a una mayor energía de interacción no enlazante en el caso del propidio. Esta, a su vez, es debida principalmente al término de van der Waals: la parte electrostática es de nuevo en promedio similar para el dq2pyp y el propidio, y el término de enlaces de hidrógeno, inexistente en el dq2pyp, es muy pequeño. Los grupos amino del propidio, que permiten rellenar completamente el sitio de intercalación, así como la cadena alquilamino, que interacciona con la pared inferior del surco menor, aumentan la superficie de contacto favorable con el DNA, y en consecuencia, las interacciones de van der Waals.

Por otra parte, la extracción con butanol del dq2pyp en complejos con DNA de timo de ternera es despreciable, pero muy efectiva en el caso del propidio (resultados no mostrados). Este hecho indica que en el segundo caso el efecto hidrofóbico tiene un importante papel en la estabilización de la unión, mientras que en el caso del dq2pyp tendría una contribución pequeña o incluso desfavorable.

Es difícil estimar la importancia relativa de estas contribuciones a la ΔG_{nep} , sobre todo teniendo en cuenta que la energía libre del efecto hidrofóbico no ha sido cuantificada. Por otra parte, si se supone que $\Delta\Delta G_{vdw} = \Delta\Delta E_{vdw}$, resulta que la energía de van der Waals da cuenta en exceso de las 3 kcal/mol de $\Delta\Delta G_{nep}$, de donde se deduce que esta contribución está sobreestimada. Asimismo, es posible que ΔG_{enh} esté subestimada, ya que en la parametrización del campo de fuerzas parte de la correspondiente energía está implícitamente incluida en los términos electrostático y de van der Waals. Se podría concluir, de todas formas, que la mayor ΔG_{nep} del propidio es debida principalmente a un aumento de interacciones de van der Waals, aunque también contribuirían tanto la formación de enlaces de hidrógeno como un más favorable efecto hidrofóbico en la unión.

3.4.9 Interacción débil con RNA de doble hélice

A diferencia de lo que ocurre con el DNA, la unión del dq2pyp y dq3pyp con RNA de doble hélice (poly(A)·poly(U)) es de muy baja afinidad. La Figura 3.24 muestra titulaciones espectrofotométricas de dq2pyp y dq3pyp con poly(A)·poly(U) en tampón P a 25.0 ± 0.1 °C, así como de dq2pyp con DNA de timo de ternera como comparación. Puede verse que la variación de la absorbancia con la concentración de RNA es muy tendida en comparación con la variación con DNA, llegando en el caso del dq3pyp a ser

comparable al error de la corrección por dilución. En cualquier caso, este hecho hace que no se haya podido alcanzar la completa saturación de la droga por RNA, ya que se necesitarían concentraciones de RNA muy altas. Esto indica que la unión es muy débil, y de hecho no es posible la obtención de representaciones de Scatchard reproducibles. Las constantes de asociación son del orden de 10^3 M^{-1} .

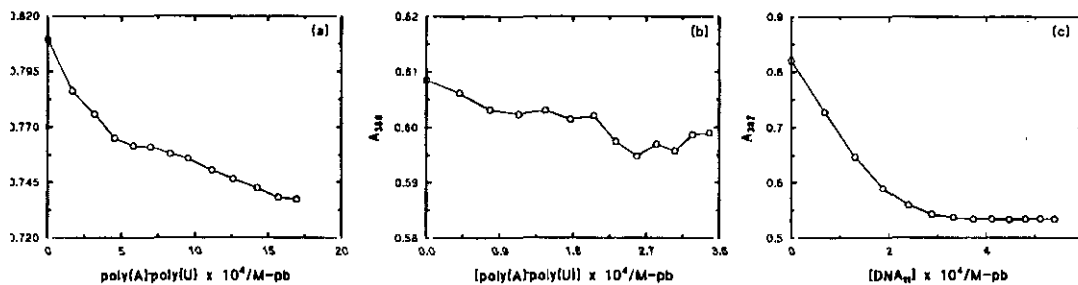


Figura 3.24. Titulaciones espectrofotométricas de (a) dq2pyp con poly(A)·poly(U), (b) dq3pyp con poly(A)·poly(U) y (c) dq2pyp con DNA de timo de ternera. Todas en tampón P.

La Figura 3.25 muestra titulaciones viscosimétricas de poly(A)·poly(U) con etidio y dq2pyp. Mientras que el etidio provoca un importante incremento de viscosidad de la disolución de RNA, en el caso del dq2pyp la viscosidad se incrementa sólo ligeramente. Esto puede explicarse suponiendo que el dq2pyp se une al RNA no intercalativamente, o que la unión fuera intercalativa pero no clásica, provocando una fuerte curvatura en la doble hélice.

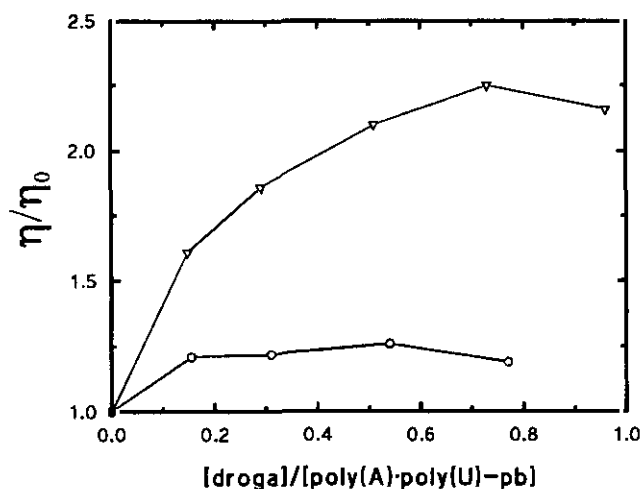


Figura 3.25. Titulaciones viscosimétricas de poly(A)·poly(U) con dq2pyp (círculos) y etidio (triángulos). En tampón P, a $25.1 \pm 0.05 \text{ }^\circ\text{C}$.

Este comportamiento, tanto de afinidad como de modo de unión, contrasta con el de

otros derivados de fenantridina, como por ejemplo el etidio, que muestra una afinidad similar por poly(dA)·poly(dT) que por poly(A)·poly(U), uniéndose en ambos casos por intercalación.⁴⁴

3.5 Fotoquímica con ácidos nucleicos de las drogas

3.5.1 Apagamiento de la luminiscencia y fotooxidación de las bases del DNA

La luminiscencia de los viológenos es apagada por DNA (Figura 3.26). Las correspondientes representaciones de intensidad relativa (I_0/I) vs. concentración de DNA muestran concavidad hacia arriba, sugiriendo la existencia de apagamiento estático. La concavidad disminuye en el orden dq2pyp > dq3pyp > Me2pyp, lo cual posiblemente refleje la diferente constante de asociación de las drogas. Diferentes polinucleótidos sintéticos muestran representaciones de Stern-Volmer con estas características, indicando, por una parte, que todos los pares de bases son capaces de apagar la luminiscencia, y por otra, que dicho apagamiento posiblemente sea igualmente estático.

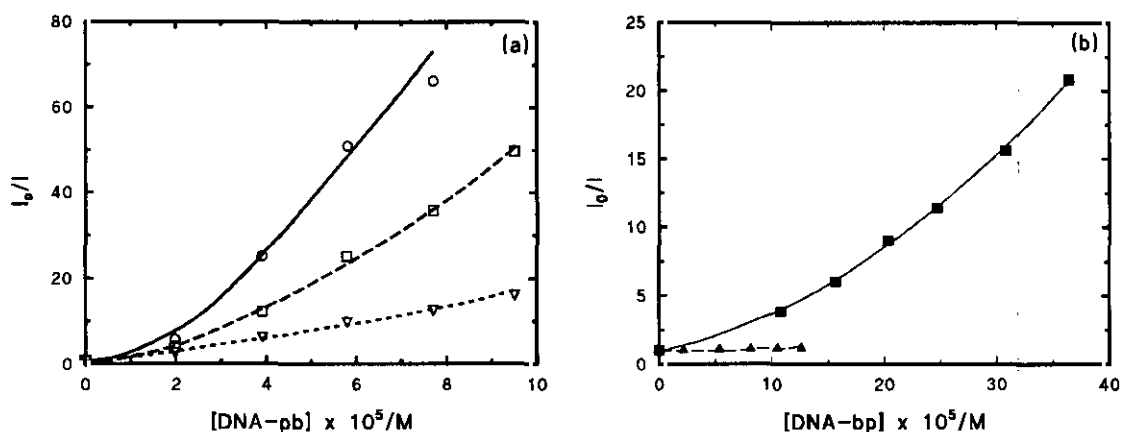


Figura 3.26. Apagamiento de la luminiscencia de los viológenos. (a) Intensidades relativas de disoluciones 5 μM de dq2pyp (a 556 nm, círculos), dq3pyp (a 512 nm, cuadrados) y Me2pyp (a 485 nm, triángulos) en tampón P y a diferentes concentraciones de DNAtt. (b) Intensidades relativas a 556 nm de disoluciones 15 μM de dq2pyp a diferentes concentraciones de poly[d(AT)]₂ (cuadrados) y poly(dG)·poly(dC) (triángulos) en tampón P.

Los nucleótidos GMP y AMP apagan también la fluorescencia de los viológenos. Las correspondientes representaciones de Stern-Volmer tanto de intensidades como de tiempos de vida relativos son lineales para concentraciones de nucleótido inferiores a 2 mM; las constantes de Stern-Volmer estimadas $K_{SV}^{(I)}$ y $K_{SV}^{(\tau)}$ se recogen en la Tabla 3.XII. Esta linealidad sugiere la existencia de apagamiento dinámico. Sin embargo, al ser diferentes las constantes obtenidas a partir de representaciones de intensidad que a partir de tiempos de vida, se concluye la existencia de apagamiento *estático* aparte del

dinámico. En ese caso, y suponiendo complejos 1:1 no fluorescentes, la representación de intensidad relativa vs. concentración de nucleótido vendría descrita por⁸⁵

$$\frac{I_0}{I} = 1 + (K_a + K_{SV}^{(\tau)})[XMP] + K_a K_{SV}^{(\tau)}[XMP]^2$$

donde K_a es la constante de asociación droga-nucleótido. Considerando que en el rango de concentraciones estudiadas las representaciones son lineales, se desprecia el término cuadrático, pudiéndose calcular las constantes de asociación (Tabla 3.XII) a partir de $K_a = K_{SV}^{(f)} - K_{SV}^{(\tau)}$.

TABLA 3.XII. Parámetros de Stern-Volmer (K_{SV}) y constantes de asociación (K_a) a GMP y AMP de los viológenos, obtenidos a partir de representaciones de I_0/I y τ_0/τ vs. concentración de mononucleótido.*

	GMP			AMP		
	$K_{SV}^{(f)**}$	$K_{SV}^{(\tau)**}$	K_a/M^{-1}	$K_{SV}^{(f)**}$	$K_{SV}^{(\tau)**}$	K_a/M^{-1}
dq2pyp	340	57	283	140	35	105
dq3pyp	290	106	184	179	58	121
Me2pyp	238	91	147	161	47	114

*En tampón P. Representaciones lineales en el rango de concentraciones de nucleótido de 0-2.0 mM ($r > 0.99$).

** En unidades de M^{-1} ; error estimado $\pm 5\%$.

Valores aproximados ($\pm 15\%$) calculados a partir de $K_{SV}^{(f)} - K_{SV}^{(\tau)}$.

Los valores resultantes son similares a los descritos para acridinio,⁸⁶ azul de metileno⁸¹ y diazapireno,⁴³ pero un orden de magnitud inferiores a las de diazaperopireno,⁴¹ lo cual podría deberse al mayor tamaño de estos últimos cationes. Asimismo, las constantes cinéticas colisionales se pueden calcular a partir de $k_q = K_{SV}^{(\tau)}/\tau_0$, resultando ser aproximadamente iguales para las tres drogas: $k_q^{GMP} = (1.2 \pm 0.1) \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$ y $k_q^{AMP} = (6.8 \pm 0.5) \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$. Estas constantes están cerca del valor teórico calculado a partir de la ecuación de Debye-Eigen-Smoluchowsky⁸⁷ aplicada a un dianión del tamaño de las drogas y un dicatión del tamaño de los nucleótidos: $1.5 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$. Por tanto, el apagamiento dinámico parece estar controlado por difusión.

Si bien la desoxirribosa no apaga la fluorescencia, la guanosina sí lo hace, estimándose una constante de Stern-Volmer de $120 M^{-1}$. Este hecho sugiere que el apagamiento de los viológenos por parte del DNA es causado por sus bases. Considerando los potenciales redox de las drogas en el estado excitado (+2.1 V. vs. EEH, ver 3.3.2), y el de las bases (-1.05, -1.15, -1.25 y -1.40 V. vs. EEH,

respectivamente para guanina, adenina, timina y citosina)⁸⁸ resulta termodinámicamente posible la oxidación de las aquéllas (principalmente la guanina) por parte de las drogas fotoexcitadas. Por tanto, el mecanismo de apagamiento de la fluorescencia podría ser una transferencia electrónica desde las bases hasta las drogas en el estado excitado. De hecho, recientemente se ha demostrado la formación del radical catiónico del dq2pyp cuando es excitado unido a GMP o DNA, al coincidir los espectros transitorios de absorción medidos en experimentos de fotólisis por pulso de laser con los de dq2pyp generado electroquímicamente.⁸⁹

3.5.2 Inexistencia de fotoaductos con DNA

La iluminación durante un periodo de 4 horas de los viológenos unidos a un exceso de DNA de timo de ternera en tampón P no provoca cambios apreciables en sus espectros de absorción en el visible (Figura 3.27), indicando la inexistencia de reacciones de fotoaducción con el DNA. Considerando que en ausencia de DNA se producía por irradiación un fotoblanqueamiento de las disoluciones (ver 3.3.1), se concluye que el DNA protege a las drogas frente a la fotodescomposición. Esta observación podría explicarse en base a los experimentos de modelado molecular, en los cuales el anillo de piridina, que es probablemente la parte de la molécula más susceptible al ataque nucleofílico, dejaba de estar expuesto al disolvente al interactuar con las paredes del surco menor.

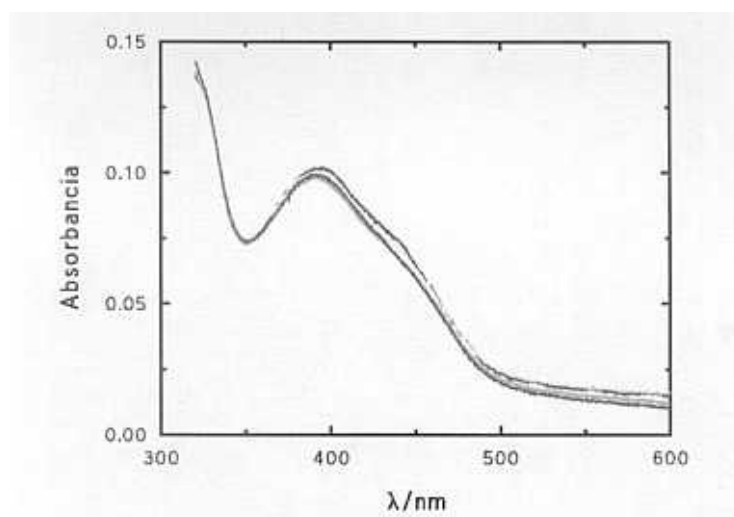


Figura 3.27. Espectros de absorción del dq2pyp en presencia de un exceso de DNAtt ($[DNAtt-pb]/[dq2pyp]=25$) e irradiado durante 0' (rojo), 30' (amarillo), 60' (verde) y 120' (azul) con una lámpara de Xe de 150 W utilizando un filtro de corte de 360 nm.

3.5.3 Actividad fotonucleásica de los viológenos

Los tres viológenos son capaces de fotosensibilizar el corte del DNA. La Figura 3.28a muestra el fotocorte del plásmido pBR322 por dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp: en las calles correspondientes a los complejos droga-plásmido irradiados (8, 9 y 10) se observa una disminución de la intensidad de las formas superenrollada (I) y dimérica (D), mientras que la de la forma relajada (II) aumenta, en comparación con el plásmido no irradiado (calle 3). Por el contrario, los controles de complejo no irradiado (calles 5, 6 y 7) y de plásmido irradiado (calle 4) no muestran diferencias con el plásmido no irradiado, indicando que el corte es fotoinducido y que la fotosensibilización del DNA está causada por las drogas. Si se irradia durante tiempos inversamente proporcionales a las áreas de los espectros de absorción para longitudes de onda mayores de 360 nm, tal y como se hizo en el experimento de la Figura xa, la cuantificación de la reacción de fotocorte resulta en valores similares para las tres drogas: 42 %, 42 % y 59 %, respectivamente para dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp. Por el contrario, si el tiempo de irradiación es el mismo para las tres drogas, la capacidad fononucleásica disminuye en el orden dq2pyp > dq3pyp > Me2pyp. Por esta razón, los estudios cinéticos y mecanísticos que posteriormente se describirán se realizaron con dq2pyp.

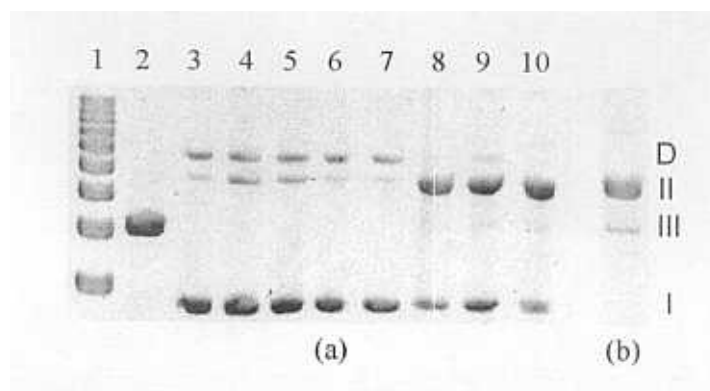


Figura 3.28. (a) Fotocorte del DNA por los viológenos. Plásmido pBR322 (6.94×10^{-5} M pb) irradiado en ausencia/presencia de dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp ($10 \mu\text{M}$). Calle 1: marcador de peso molecular X. Calle 2: pBR322 linealizado con EcoRI. Calle 3: pBR322 no irradiado. Calle 4: pBR322 irradiado durante 90'. Calles 5-7: pBR322 + dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp, respectivamente, sin irradiar. Calles 8-10: pBR322 + dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp irradiado respectivamente durante 30, 40 y 90'. (b) Linealización de pBR322 por fotocorte con dq2pyp. En estas condiciones (pBR322 4×10^{-5} M, dq2pyp $33 \mu\text{M}$, e irradiación durante 30') se produce forma III, y desaparecen totalmente D y la forma superenrollada.

Bajo las condiciones de irradiación de la Figura 3.28a sólo se producen cortes de cadena sencilla, puesto que no ha aparecido forma linealizada (III), identificable por la posición de la banda de plásmido digerida por EcoRI (calle 2). Para llegar a linealizar el plásmido es necesario irradiar durante más tiempo y/o con mayores concentraciones de

droga (Figura 3.28b) Esta observación sugiere que el corte de doble cadena es debido a la acumulación estadística de cortes de cadena sencilla, y que por tanto durante el tiempo de residencia de la droga en el sitio de intercalación se produce como mucho una única reacción de fotosensibilización. Analizando la cinética de fotocorte por dq2pyp mediante el modelo de corte de cadena sencilla (Figura 3.29) descrito en Técnicas se obtienen las siguientes constantes cinéticas cuando se cuantifica el corte en función de la concentración de droga: $k_{I \rightarrow II} = 1600 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$, y $k_{II \rightarrow III} = 65 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$. $k_{I \rightarrow II}$ se calculó adicionalmente en experimentos en los que se variaba el tiempo de irradiación antes de aparecer forma III (Figura 3.29, detalle); los valores estimados ($1100 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ y $2000 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$) son similares al anterior, dando apoyo adicional al procedimiento. La relación de constantes cinéticas, 25, se corresponde con los valores que cabría esperar si el paso $II \rightarrow III$ se da por acumulación estadística de cortes de cadena sencilla, considerando el tamaño del plásmido. Por otra parte, del ajuste del modelo de corte de doble cadena resultan constantes absurdas (por ejemplo, negativas), de donde se concluye la inexistencia de una reacción específica conducente al corte de cadenas opuestas en el sitio de intercalación.

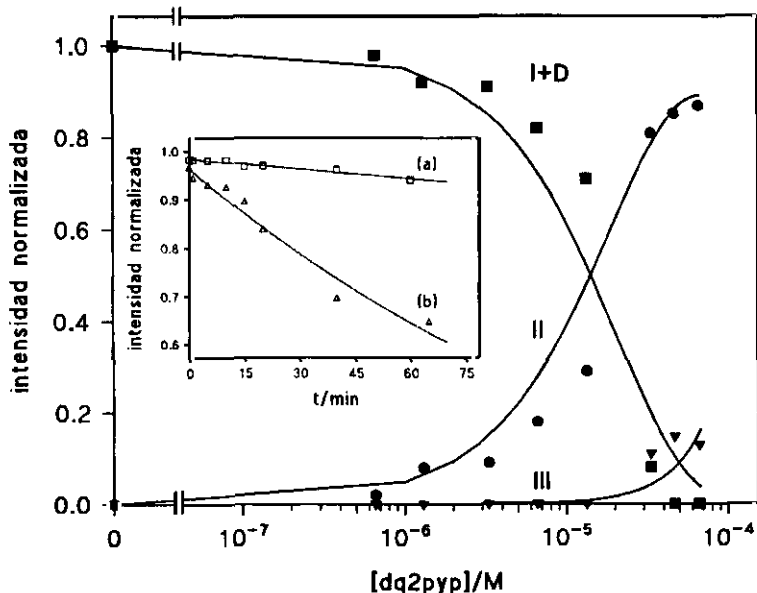


Figura 3.29. Representación de intensidades de forma I+D, II y III vs. concentración de dq2pyp tras irradiación durante 30' en tampón P. Los ajustes corresponden al modelo de corte de cadena sencilla de Kishikawa et al, resultando en $k_{I \rightarrow II} = 1600 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ y $k_{II \rightarrow III} = 65 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$. Detalle: evolución de intensidades de forma Y con el tiempo antes de que se haya producido forma III. Las $k_{I \rightarrow II}$ obtenidas por ajuste son (a) $1100 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$, y (b) $2000 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$, muy similares a las estimadas a partir de la representación de intensidad vs. concentración de droga.

Al objeto de estudiar el mecanismo de fotosensibilización del corte del DNA se

irradiaron complejos dq2pyp/pBR322 en presencia de diversos agentes (Figura 3.30) : azida sódica 10^{-3} M (“quencher” de oxígeno singlete), superóxido dismutasa o SOD (que cataliza la reacción $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), catalasa (que cataliza la reacción $H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2O_2$) y una mezcla de catalasa y superóxido dismutasa. En todos los casos (excepto con catalasa, donde el corte no varió) se observa una ligera disminución de la actividad nucleásica. La SOD produce la mayor inhibición del corte, pero en experimentos adicionales se observa que ésta no aumenta incluso hasta concentraciones de 3.5 mg/mL, indicando que el efecto debido a anion superóxido ya ha sido completamente suprimido en la Figura z. Por tanto, parece que el O_2^- tiene un papel secundario en el mecanismo de fotosensibilización. La menor inhibición por azida sódica, en comparación con la producida por SOD, indica que el 1O_2 también es responsable sólo de forma secundaria del corte del DNA. Los bajos rendimientos cuánticos de formación de 1O_2 en D_2O (0.22 y 0.10, respectivamente para dq2pyp y dq3pyp) apoyan esta interpretación, sobre todo si se considera que este rendimiento será aún menor cuando la droga está intercalada, pues entonces el oxígeno molecular tendrá menor acceso a aquélla.

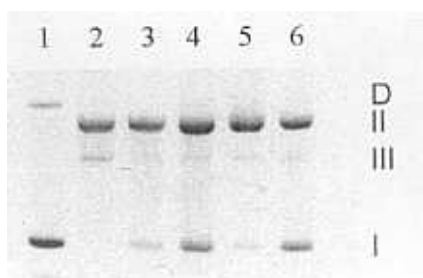


Figura 3.30. Efecto de distintos agentes en el fotocorte del dq2pyp. Calle (1): plásmido no irradiado. Calle (2) plásmido irradiado en presencia de dq2pyp. Calle (3) plásmido irradiado con dq2pyp en presencia de azida sódica (10^{-3} M). Calle (4) plásmido irradiado con dq2pyp en presencia de SOD (0.53 mg/mL). Calle (5) plásmido irradiado en presencia de SOD (0.53 mg/mL) y catalasa (0.6 mg/mL). Calle (6) plásmido irradiado con dq2pyp en presencia de catalasa (0.6 mg/mL). Todas las irradiaciones durante 30' y en las mismas condiciones que en la Figura 3.28

Teniendo en cuenta la formación demostrada del radical catiónico del dq2pyp cuando éste es excitado por luz visible estando intercalado en el DNA, el mecanismo más plausible se iniciaría por una fotooxidación de las bases del DNA (preferiblemente guanina) por el singlete excitado de las drogas. Recordando que el potencial redox del singlete excitado de las tres drogas es el mismo, la observación en la Figura 3.28 de una misma cantidad de corte para las tres drogas sería consistente con este mecanismo si,

como ocurre en este experimento, la saturación de las tres drogas es similar. El radical catiónico de la base podría entonces evolucionar de la forma descrita previamente hacia una ruptura en el esqueleto azúcar-fosfato (ver Introducción). El mecanismo de fotosensibilización por azul de metileno parece ser el mismo, considerando que el potencial redox de su singlete excitado ($E(^*D^+/D^0) = + 1.8$ vs. EEH) permite también la oxidación de las bases, aunque no se puede descartar una intervención del oxígeno singlete.⁹⁰ Para el MDAP²⁺ Blacker et al. ha propuesto un mecanismo consistente en la fotooxidación de los azúcares del DNA por la droga excitada,³⁹ aunque Brun y Harriman sostienen que el fotocorte es mediado únicamente por oxígeno singlete.⁴³

3.5.4 Fotoquímica con RNA de doble hélice

Al igual que el DNA, el RNA (poly(A)poly(U)) apaga la fluorescencia de los viológenos. La Figura 3.31 muestra la correspondiente representación de Stern-Volmer de intensidades, junto con la obtenida con DNA de timo de ternera. Como puede verse, la concavidad de la curva con RNA es mucho menor que con DNA, lo cual posiblemente refleje la muy inferior afinidad del dq2pyp por aquel polinucleótido (ver 3.4.9).

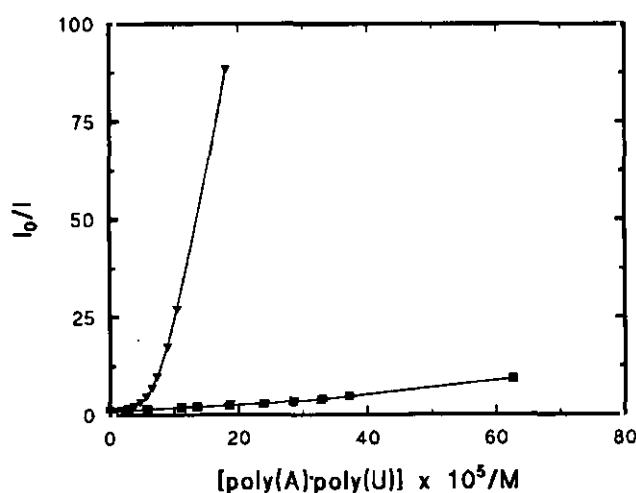


Figura 3.31. Representación de Stern-Volmer de intensidades para el apagamiento de la fluorescencia del DNA de timo de ternera (triángulos) y el poly(A)·poly(U). Realizado en las mismas condiciones que la Figura 3.26a.

Asimismo, la irradiación con luz visible de complejos dq2pyp/RNA o dq3pyp/RNA provoca un cambio espectral, con un punto isobéptico localizado respectivamente a 360 y 400 nm. En la Figura 3.32 se muestran los diferentes espectros de absorción obtenidos para estos complejos tras diferentes tiempos de irradiación. Este

comportamiento es radicalmente diferente al observado cuando se irradia la droga sola (fotoblanqueamiento a todas las longitudes de onda mayores de 300 nm, ver 3.3.1) o en presencia de un exceso de DNA (invarianza del espectro, ver 3.5.2), e indica la generación de un nuevo fotoproducto. Si se somete a diálisis exhaustiva el complejo dq2pyp/RNA irradiado, y se compara con un complejo no irradiado, se detecta en el primero al cabo de varios días una absorción visible residual, mientras que en el segundo únicamente se observa el espectro del RNA (Figura 3.32 (a) y (b), respectivamente). Este resultado se puede explicar suponiendo que *el fotoproducto se trata de un fotoaducto unido covalentemente al RNA, o que tiene bastante mayor afinidad por RNA que el dq2pyp no tratado.*

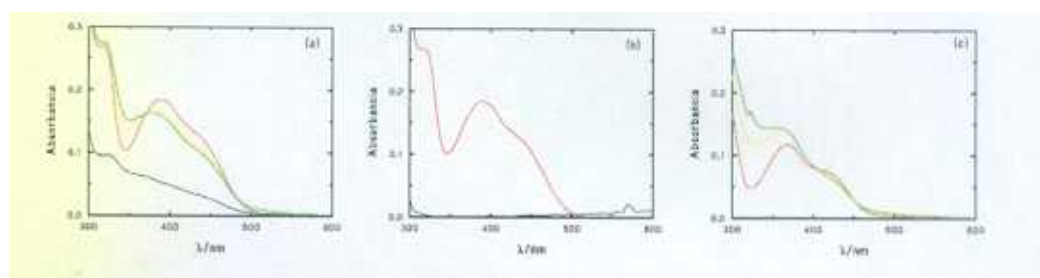


Figura 3.32. Espectros de complejos droga-poly(A)-poly(U) irradiados en el visible (> 360 nm). (a) y (b) complejos de dq2pyp (4.14×10^{-5} M) y polinucleótido (4.75×10^{-4} M). Rojo: complejo no irradiado. Amarillo: complejo irradiado 15'. Verde: complejo irradiado 60'. Negro: complejo irradiado tras diálisis de 3 días. (c) complejos de dq3pyp (2×10^{-5} M) y polinucleótido (5.26×10^{-4} M). Rojo: complejo no irradiado. Amarillo: complejo irradiado 30'. Verde: complejo irradiado 60'.

Es posible que esta diferente fotoquímica sea debida a la diferente unión al RNA, tanto en afinidad como (posiblemente) en modo de unión (ver 3.4.9). En este caso se tendría una fotoquímica específica de estructura. También cabe la posibilidad de que el diferente comportamiento sea debido a la presencia en el RNA de grupos químicos diferentes al DNA (uracilo y/o ribosa).

3.6 Discusión

Tal y como en un principio se esperaba, los viológenos derivados de 6-(2-piridil)fenantridina presentan absorción en el visible, al igual que ocurre con el DAP^{2+} y el $ADIQ^{2+}$. Esta absorción cambia como consecuencia de la unión a polinucleótidos, lo cual es enormemente útil para la detección de la interacción con los mismos; de hecho, las isotermas de unión en este trabajo se han realizado mediante titulaciones espectrofotométricas en el visible.

Como previamente se señaló, ni las bupiridinas *N,N'*-dialquiladas ni la 6-(2-piridil)fenantridina absorben luz en la región visible. La razón de esta observación para el primer grupo de moléculas podría ser el menor tamaño de su sistema aromático en comparación tanto con los viológenos *pyp*, como con el DAP²⁺ y el ADIQ²⁺. De hecho, en los viológenos *pyp* un aumento del ángulo diedro φ entre la piridina y la fenantridina resulta en un desplazamiento al azul de la banda visible/UVp, lo cual puede ser explicado por la disminución de la conjugación entre ambos sistemas aromáticos (y por tanto, en definitiva, por una disminución del sistema aromático). Esta propiedad es enormemente interesante de cara al diseño de nuevos viológenos, puesto que dentro de una familia hace posible controlar la posición del máximo de absorción visible mediante la selección de una cadena dialquilo de longitud adecuada.

La razón de la aparición absorción en el visible al cuaternizar los nitrógenos de la 6-(2-piridil)fenantridina podría deberse a un cambio en las correspondientes integrales de Coulomb y/o de resonancia de los nitrógenos. Cálculos ZINDO realizados con la 6-(2-piridil)fenantridina y el Me₂pyp (datos no mostrados) reproducen las absorciones observadas experimentalmente. El análisis de las contribuciones de configuraciones al primer estado excitado, y de las composiciones de OAs del HOMO y LUMO, indican que en la primera droga la transición electrónica de más baja energía involucra casi exclusivamente a la fenantridina, mientras que en el Me₂pyp se produce (al igual que ocurría con el dq₂pyp y el dq₃pyp, aunque en menor medida) un desplazamiento de la densidad electrónica de la fenantridina a la piridina. Es posible, por tanto, que la cuaternización de la piridina (con la consiguiente introducción de una carga positiva) facilite dicho desplazamiento de carga, y por tanto provoque una disminución de la energía del LUMO por aumento de su deslocalización por toda la molécula.

Otra propiedad en común de los viológenos *pyp* con el DAP²⁺ y el ADIQ²⁺ es su luminiscencia. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Tabla 3.I) son relativamente altos, aunque inferiores a los de estas dos últimas drogas (0.63 y 0.79, respectivamente para DAP²⁺ y ADIQ²⁺)⁴³. Parte del singlete excitado que se desactiva no radiativamente lo hace por cruce intersistémico al triplete de la droga, con un rendimiento cuántico mínimo de respectivamente 0.22 y 0.10 para el dq₂pyp y el dq₃pyp (rendimientos cuánticos de formación de ¹O₂). Estos valores son similares a los rendimientos cuánticos de formación de tripletes del DAP²⁺ y ADIQ²⁺ (0.17 y 0.12, respectivamente)⁴³.

La fluorescencia es apagada completamente por bases, nucleótidos y DNA. Al igual que ocurre con el ADIQ²⁺ y el DAP²⁺,⁴³ el apagamiento parece deberse a una transferencia electrónica de las bases al singlete excitado de la droga, altamente oxidante. Esta transferencia electrónica es termodinámicamente posible con todas las bases, lo cual se refleja en el apagamiento observado tanto con GMP como con AMP, así como con poly[d(AT)]₂ y poly(dG)-poly(dC). En el caso del ADIQ²⁺, sin embargo, se ha observado con el poly[d(AT)]₂ que a altas relaciones polinucleótido/droga (> 30) existe un exaltamiento de la fluorescencia, no presente en el dq2pyp.⁴² Los autores no sugieren ninguna explicación de este fenómeno.

Por otra parte, los viológenos pyp son capaces de fotocortar el DNA. Dado que no se ha estimado el rendimiento cuántico de fotocorte de las correspondientes drogas, no es posible comparar esta actividad fotonucleásica con la del MDAP²⁺ y el ADIQ²⁺. El mecanismo más posible de fotocorte de los viológenos pyp sería iniciado por una fotooxidación de las bases, considerando que de hecho el apagamiento de la fluorescencia de las drogas se produce de esta manera.⁸⁹ Por otra parte, el casi despreciable efecto ejercido en el corte del dq2pyp por la azida sódica y la superóxido dismutasa indica que tanto el oxígeno singlete como el anión radical superóxido dan cuenta de sólo una muy pequeña parte del fotocorte, de acuerdo con la anterior conclusión.

Asímismo, un mecanismo de fotocorte iniciado por transferencia electrónica de las bases al singlete excitado de las drogas previsiblemente daría lugar a un corte específico de guaninas, dado que estas bases tienen el potencial de ionización más bajo.⁸⁸ Resultados recientes de fotocorte de oligonucleótidos y posterior análisis de los productos resultantes por electroforesis en gel de poliacrilamida (datos no mostrados) confirman que los viológenos pyp son fotonucleasas altamente específicas de tramos ricos en estas bases. El radical catiónico de la guanina formado tras transferencia electrónica evolucionaría, de acuerdo con uno de los dos mecanismos descritos en la introducción, hacia los productos 8, 10, 11 o 12. Estos productos, asímismo, evolucionarían hasta la producción de un corte en la cadena del DNA, o bien podrían formarse nucleótidos modificados que por posterior tratamiento básico a alta temperatura darían lugar al corte de la cadena. De hecho, en los experimentos anteriormente mencionados se observa que el corte aumenta tras tratar las muestras

irradiadas con piperidina 1 M a 90 °C, demostrando la generación de sitios lábiles al álcali.

En el caso del dq3pyp, estudios recientes muestran que el O₂ acelera el decaimiento del radical catiónico dq3pyp⁺ formado por transferencia electrónica.⁸⁹ Considerando el potencial O₂/O₂⁻ (-0.284 V vs. EEH en disolución acuosa a pH = 7)⁹¹, se concluye que este efecto es debido a la reducción del O₂ por el radical catiónico, generándose O₂⁻. Por tanto, en presencia de Fe(II) cabría esperar la formación de OH[·], y por tanto la existencia de una vía de fotocorte diferente a la fotooxidativa.

Los experimentos de irradiación de complejos con poly(A)-poly(U) indican que la fotoquímica con este polirribonucleótido es radicalmente diferente a la del DNA. Esta diferencia podría deberse a un diferente modo de unión a este ácido nucleico, o bien a la reacción con la ribosa o con el uracilo, ausentes en el DNA.

La interacción de los viológenos pyp con B-DNA es de alta afinidad, al igual que ocurre con el MDAP²⁺ y el ADIQ²⁺ (K_b = O(10⁵) M⁻¹, a una [Na⁺] ≈ 10 mM)⁴³. El modo intercalativo de unión ha sido claramente demostrado, mediante muy diferentes técnicas: viscosimetría, dicroísmo lineal en flujo y dependencia con la [Na⁺] de las constantes cinéticas de disociación. Existen evidencias adicionales de la intercalación a partir de medidas por RMN de los tiempos de relajación del Na-23.⁹³ En el caso del MDAP²⁺ la unión por intercalación únicamente ha sido sugerida a partir del retraso en la migración electroforética de plásmidos en presencia de la droga.³⁹ Sin embargo, titulaciones viscosimétricas realizadas en nuestro laboratorio indican que no existe tal intercalación. Por su parte, la unión del ADIQ²⁺ por intercalación viene apoyada por estudios de transferencia de energía y de dicroísmo lineal eléctrico.⁴²

Las titulaciones viscosimétricas sugieren que la intercalación de los viológenos pyp es parcial y/o asimétrica, ya que el incremento de viscosidad a saturación provocado por estas drogas es inferior al del etidio. Los estudios de modelado molecular permiten racionalizar esta observación, puesto que muestran que los viológenos pyp pueden insertarse entre dos pares de bases con muy diferentes posicionamientos, caracterizados muchos de ellos por apilamientos incompletos entre la fenantridina y las bases, así como un fácil intercambio entre los mismos. Por el contrario, tanto el etidio como el propidio muestran prácticamente un único posicionamiento en el sitio de intercalación, con total

solapamiento superficial con los pares de bases, así como una movilidad restringida en dicho sitio. Esta diferencia entre derivados de la fenantridida es debida a la ausencia/presencia de grupos amino; el tener dichos grupos determina (a) el rellenado completo del sitio de intercalación, y (b) la orientación de la droga, mediante la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals con los esqueletos azúcar-fosfato de *ambas* cadenas de la doble hélice. Por lo tanto, cabe esperar que viológenos *pyp* con grupos amino presenten intercalación clásica, puesto que entonces su posicionamiento dentro del sitio de intercalación estaría restringido, y el apilamiento con los pares de bases sería completo.

La comparación de los datos cinéticos de Leupin et. al,⁸³ y de Wilson et al.,⁶¹ con los descritos en este trabajo indican asimismo un papel crucial de los grupos amino en la cinética de disociación de los viológenos. Si bien el mecanismo de intercalación parece ser esencialmente el mismo en el caso del dq2pyp y el propidio, la disociación es dos órdenes de magnitud más rápida en el primero en comparación con el segundo, mientras que la asociación es dos veces más rápida. De nuevo el modelado molecular permite racionalizar estas observaciones. Considerando que el paso limitante de la asociación es la formación del sitio de intercalación, la diferencia de velocidades de asociación podría explicarse en base a la proporción de sitios abiertos con la geometría adecuada para formar un complejo de intercalación. Dado el posicionamiento menos restringido del dq2pyp, esta proporción será mayor con esta droga, y de ahí la mayor constante de asociación. Por el contrario, el propidio establece más interacciones no enlazantes con el sitio de intercalación, principalmente de van der Waals y enlaces de hidrógeno. En consecuencia, la energía de activación necesaria para salir del DNA será necesariamente mayor en esta droga, y en consecuencia su disociación mucho más lenta.

A partir de estos resultados es por tanto lógico prever que viológenos *pyp* con grupos amino presentarán cinéticas de disociación lentas en comparación con el dq2pyp, y con constantes de velocidad más parecidas a las del propidio.

Las isotermas de unión realizadas con polinucleótidos sintéticos muestran que el dq2pyp interacciona preferentemente con pares de bases GC alternantes. Esta selectividad de secuencia, combinada con el corte preferente en guaninas, hace de esta droga una fotonucleasa altamente específica de secuencias ricas en estas bases. La

similitud estructural, así como de potenciales redox en el estado excitado del dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp, permite suponer que estas dos últimas drogas mostrarán similar especificidad, tanto de unión como fotoquímica.

La unión débil a polinucleótidos homopoliméricos (poly(dG)-poly(dC) y poly(dA)-poly(dT)) observada con el dq2pyp ha sido descrita previamente con otros intercalantes.⁹³⁻⁹⁶ Por ejemplo, la unión del propidio a poly(dA)-poly(dT) es también un orden de magnitud menor que a poly[d(AT)]₂.⁹⁶ En este y otros casos el fenómeno es explicado, en base a diferentes pruebas espectroscópicas y termodinámicas, por las conformaciones inusuales adoptadas por estos polinucleótidos.⁹⁷⁻⁹⁹ El poly(dA)-poly(dT) parece tener una estructura de tipo B no canónica y altamente hidratada, que correspondería a una estructura con pares de bases con gran propeller twist y enlaces de hidrógeno bifurcados.¹⁰⁰ Por su parte, el poly(dG)-poly(dC) parece tener una estructura de tipo A, con un surco menor muy hidratado.¹⁰¹ La intercalación en estos polinucleótidos estaría desfavorecida y requeriría un cambio conformacional (probablemente involucrando múltiples pares de bases) hacia una conformación de tipo B con sitio de intercalación estándar.

Si se asume una similar liberación de moléculas de agua en las diferentes secuencias correspondientes a un mismo polinucleótido (una aproximación probablemente más aceptable que entre diferentes polinucleótidos) es posible obtener un patrón de especificidad de secuencia más detallado a partir de las energías de unión obtenidas por mecánica molecular. Según esto, el paso CpG estaría favorecido sobre el GpC, el ApT sobre el TpA, el GpG sobre el CpC, y el ApA ligeramente sobre el TpT.

En el caso de secuencias correspondientes a poly(dG)-poly(dC), el dq2pyp prefiere en todos los casos una geometría de unión donde la fenantridina está competentemente intercalada sólo en la cadena de poly(dG). Este modo de intercalación parece ser una consecuencia conjunta de la incapacidad de esta droga de rellenar completamente el sitio de intercalación y de la ausencia de apilamiento intercatenario observado en estas secuencias.¹⁰¹

La energía libre de la interacción del dq2pyp con DNA viene en gran medida del efecto de polielectrolito. Al objeto de incrementar la afinidad de esta droga por DNA a cualquier fuerza iónica, sería necesario aumentar la contribución restante a la energía

libre de unión. El propidio es un modelo acerca de cómo incrementar dicha contribución, puesto que es un dicatión y está estructuralmente relacionado con los viológenos *pyp*. Su ΔG_{ncp} es aproximadamente 3 kcal/mol mayor que la del dq2pyp, resultando en constantes de asociación 2-3 órdenes de magnitud mayores dependiendo de la $[Na^+]$. El análisis comparativo de las energías de unión del propidio y el dq2pyp a diferentes secuencias ha mostrado que la mayor energía de interacción de la primera droga viene principalmente de las interacciones de van der Waals de sus grupos amino (que probablemente engloben a las interacciones por enlace de hidrógeno), así como de su cadena polialquilamino con el DNA. La conservación de las propiedades de viológeno restringe hasta cierto punto las modificaciones realizables para incrementar la afinidad. Por ejemplo, la sustitución de la cadena dialquilo por un metilo en la piridina y una cadena polialquilamino como la presente en el propidio, probablemente no resultaría en un notable incremento de la ΔG_{ncp} (aunque sí de la ΔG_{cp}), puesto que las más favorables interacciones de van der Waals proporcionadas por dicha cadena vendrían acompañadas de una disminución de las interacciones de apilamiento con las bases como consecuencia de la menor inserción provocada por el metilo (análogamente al Me2pyp). Por tanto, la opción más razonable sería (al menos en un primer momento) la introducción de grupos amino. Cálculos de mecánica molecular preliminares muestran que la energía de unión de los viológenos con grupos amino se incrementa en 5-7 kcal/mol. Este valor es algo inferior a la $\Delta\Delta E$ entre el propidio y el dq2pyp, pero supone de todas formas un notable incremento en la afinidad de la droga.

Finalmente, la enantioespecificidad demostrada en la asociación al DNA del dq2pyp y dq3pyp añade una muy interesante especificidad estructural a los viológenos *pyp*, no presente en otros viológenos como el MDAP²⁺ y el ADIQ²⁺. Esto hace a los viológenos *pyp* equiparables a los complejos metálicos quirales, en donde a una actividad fotonucleásica (en muchos casos mediada por fotooxidación de las bases) se une la diferente unión a B-DNA de sus dos enantiómeros.

Existen diferentes ejemplos en la bibliografía donde se describe la unión enantioespecífica de drogas a DNA. Dichos ejemplos podrían clasificarse en dos grandes grupos: (a) drogas con uno o más carbonos asimétricos (normalmente en cadenas laterales);¹⁰²⁻¹⁰⁴ (b) drogas con (pseudo)simetría octaédrica. En el primer caso, no existe una esquema sencillo que permita predecir cuál de los dos enantiómeros se unirá mejor a

la doble hélice, requiriendo en principio el conocimiento de la geometría molecular de ambos enantiómeros. El segundo grupo (complejos de metales de transición) comprende moléculas con tres anillos heteroaromáticos (ligandos) helicoidalmente quelados a un ion metálico central. El esquema comúnmente aceptado para explicar la unión enantioespecífica de dichos compuestos es que mientras que uno de los ligandos está (parcialmente) intercalado entre un par de bases, los otros dos se orientan perpendicularmente entre sí, bien paralelamente al surco (enantiómero Δ) o perpendicularmente al mismo (enantiómero Λ).^{21,28} Mientras que los ligandos no intercalados del enantiómero Δ interaccionan favorablemente con el surco, en el Λ chocan con sus paredes. Como ha sido previamente resaltado, el patrón de unión de los enantiómeros Δ aparece en la estructura cristalográfica de la actinomicina D intercalada en mitad de un oligonucleótido: el anillo de fenoxazona está intercalado, mientras que los dos depsipéptidos se orientan en sentidos opuestos y paralelamente al surco.¹⁰⁵

Los estudios de modelado molecular realizados en este trabajo sugieren un diferente esquema de unión enantioespecífica en los intercalantes *pyp*. Un viológeno *pyp* puede considerarse que posee aproximadamente pseudosimetría tetraédrica: dos anillos heteroaromáticos dispuestos más o menos perpendicularmente. Mientras que uno de dichos anillos (la fenantridina) está intercalado, el otro (la piridina) puede orientarse paralelamente (enantiómero *S*) o perpendicularmente (enantiómero *R*) a las paredes del surco menor. En el primer caso, el anillo de piridina interacciona favorablemente con una o ambas paredes del surco; en el otro, la piridina está o bien expuesta al disolvente (no interaccionando con el surco), o para hipotéticos anillos heterocíclicos mayores, chocando con las mismas.

Se ha propuesto un esquema similar de unión intercalante para el complejo de cobre aquiral $(OP)_2Cu^+$, donde OP simboliza un anillo de fenantrolina.¹⁰⁶ En este complejo tetracoordinado de cobre, los anillos de fenantrolina definen un ángulo diedro de 49.9° ,¹⁰⁷ y el modelo igualmente propone que uno de los ligandos está intercalado mientras que el otro está alineado con el surco menor.¹⁰⁶ La orientación opuesta del anillo de fenantridina intercalado de los viológenos en comparación con la fenantrolina del complejo de cobre, permitiría mayores interacciones de apilamiento en el sitio de intercalación. Este hecho, junto con el carácter de monocatión del complejo metálico frente al dicatiónico de los viológenos, permitiría una mejor interacción con el DNA, lo

que de hecho se refleja en la menor constante de asociación del $(OP)_2Cu^+$ ($5 \times 10^4 M$).¹⁰⁸

4: dadq2pyp y dadq3pyp

4.1 Análisis conformacional de los viológenos

Los ángulos ϱ de las estructuras de los viológenos aminados optimizadas con AM-1 varían muy poco respecto de los de los no aminados: 33.5°, 56.3° y 93.9°, respectivamente para dadq2pyp, dadq3pyp y daMe2pyp (Lámina 4.I). Las pequeñas RMSdev entre los átomos equivalentes del dadq2pyp, dadq3pyp y Me2pyp y los correspondientes viológenos no aminados (0.025, 0.033 y 0.02) indican que los grupos amino no influyen en la estructura de mínima energía de las drogas. La razón sería que estos grupos, para ningún valor de ϱ chocan con la piridina, de modo que el ángulo observado sería de nuevo el resultado del efecto conjunto de la cadena dialquilo y los hidrógenos en peri. En consecuencia, a la hora de parametrizar en los cálculos de mecánica molecular, para el resto de la molécula se utilizaron los mismos tipos de átomo y parámetros del campo de fuerzas que en los viológenos no aminados (ver 2.3.2.2). Como resultado, energías de interconversión estimadas por mecánica molecular resultan ser iguales a las de éstos, así como las varianzas de los ángulos ϱ en las dinámicas moleculares.

Por tanto, y en ausencia de datos experimentales, cabe esperar que en los viológenos aminados se den las mismas diferencias de velocidades de interconversión que en los no aminados. El dadq2pyp tendría interconversión rápida a temperatura ambiente, mientras que los enantiómeros separados del dadq3pyp serían estables a dicha temperatura, siendo factible su resolución.

4.2 Caracterización de la estructura electrónica de los viológenos

4.2.1 Espectros electrónicos y momentos de transiciones electrónicas

Al igual que los compuestos no aminados, tanto el dadq2pyp como el dadq3pyp presentan una banda de absorción en el visible muy ancha (Figura 4.1 y Tabla 4.I), que en este caso está más desplazada hacia el rojo (máximos a 647 y 592 nm, respectivamente para el dadq2pyp y el dadq3pyp) y no tiene hombros. Acompañando a esta banda hay ahora otras dos, una muy intensa y con un hombro del lado de menor energía en el UV próximo (a 315 y 303 nm respectivamente), y otra centrada a aproximadamente 220 nm. Tal y como ocurría en el caso de los viológenos no aminados, el espectro se desplaza hacia el azul al pasar del dadq2pyp al dadq3pyp.

TABLA 4.I. Propiedades espectroscópicas de los viológenos aminados en tampón P*.

	dadq2pyp	dadq3pyp
$\lambda_{\max}^{\text{abs}}/\text{nm} (\epsilon/M^{-1}\text{cm}^{-1})^{**}$	647(5450)	592(3900)
	315(35100)	303(36500)
	220(20300)	219(24000)

* Disoluciones equilibradas en aire a 25 ± 1 °C.

** Máximos de absorción ± 1 nm (coeficientes de absorción ± 2 %).

Los cálculos cuánticos (Figura 4.2) parecen reproducir bastante bien el espectro de los viológenos tanto en intensidades como en longitudes de onda, y predicen en el visible una transición de gran fuerza de oscilador aislada (660 y 604 nm, respectivamente para dadq2pyp y dadq3pyp), además de otra de muy pequeña fuerza de oscilador (a 430 y 440 nm).

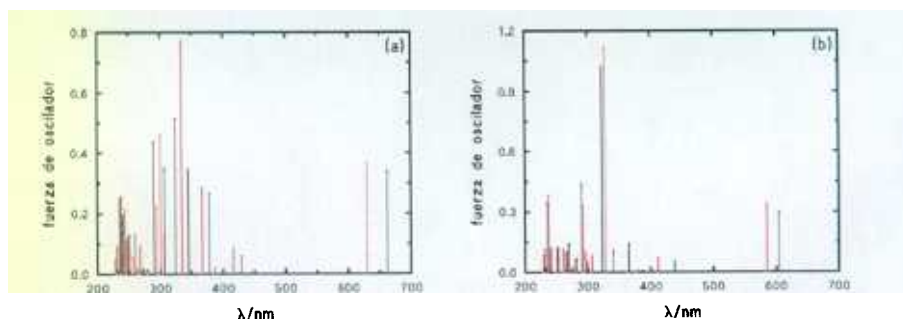


Figura 4.2. Espectros del (a) dadq2pyp y (b) dadq3pyp obtenidos mediante cálculos de interacción de configuraciones utilizando el programa ZINDO. En rojo se muestran los cálculos SCRF/CI.

Según esto, la banda situada más al rojo en el espectro de absorción sería debida a una única transición electrónica, a diferencia de lo que se observaba en los viológenos no aminados, donde dos transiciones daban cuenta de la banda visible. La otra transición de baja intensidad en el visible podría dar cuenta de la no total desaparición de absorción entre las bandas visible y UV de menor energía. Para esta banda, y en el caso del

dadq2pyp, son predichas cinco transiciones de gran fuerza de oscilador (IV-VIII). En el caso del dadq3pyp, parece que la banda a 303 nm se debería principalmente a la transición VI y menormente a la VIII. Dado el gran número de transiciones predichas, el hombro observado en esta banda en ambos viológenos podría corresponder a una diferente transición electrónica y no a estructura vibracional. Finalmente, los cálculos sitúan también un gran número de transiciones electrónicas entre 200 y 250 nm, que serían responsables de la banda a 220 nm.

Considerando las polarizaciones de las transiciones calculadas, todos los momentos son casi perfectamente paralelos al plano de la fenantridina, con múltiples direcciones (Figura 4.3).

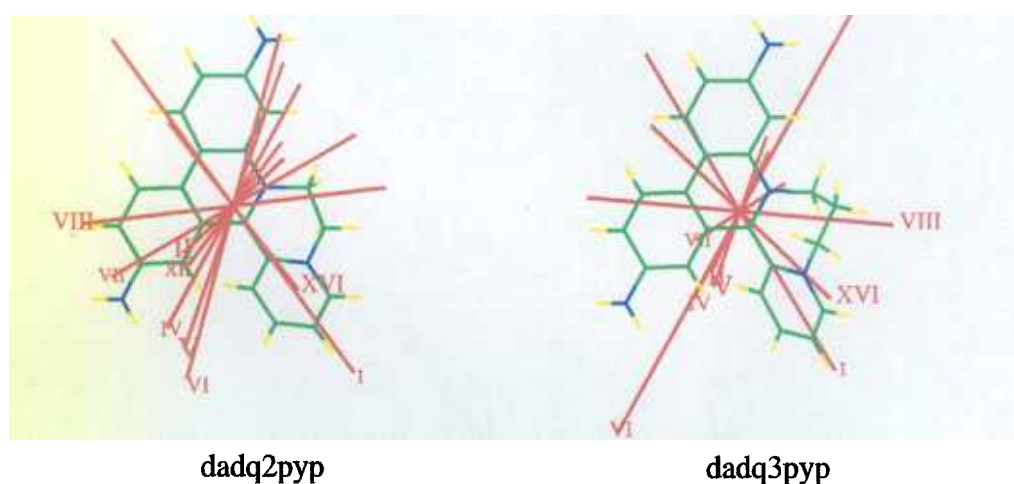


Figura 4.3. Direcciones de los momentos de transiciones electrónicas del dadq2pyp y el dadq3pyp predichas por cálculos de interacción de configuraciones utilizando el programa ZINDO. La longitud de las barras es proporcional a la fuerza de oscilador.

Por ejemplo, el momento correspondiente a la transición de más baja energía (I) está dirigido hacia la piridina, tal y como ocurría en los viológenos no aminados. Excepto la VIII, todas las transiciones que darían cuenta de las bandas a 315 y 303 nm, respectivamente para el dadq2pyp y el dadq3pyp, están polarizadas aproximadamente paralelas al eje que conecta los grupos amino. Es posible, por tanto, que un análisis experimental de la polarización de estas bandas resultara en que la visible lo estaría hacia el anillo de la piridina, mientras que la UV de menor energía paralelamente al eje que conecta los grupos amino. Algo similar ha sido descrito experimentalmente para la molécula de etidio, donde la absorción a 535 nm está polarizada hacia el anillo de fenilo, mientras que la de 320 nm lo está paralelamente al eje que conecta los grupos amino.⁷⁸

Por analogía podría entonces sugerirse que esta última banda del etidio correspondería a múltiples transiciones polarizadas en direcciones casi paralelas. Analizando las contribuciones de configuraciones a los distintos estados excitados, se concluye que el primero de ellos corresponde casi exclusivamente a la generada por el paso de un electrón del HOMO al LUMO, como ocurría con dq2pyp, dq3pyp y Me2pyp. De nuevo aquí los contornos de orbitales moleculares muestran que el HOMO está centrado principalmente en la fenantridina (particularmente en los nitrógenos de los grupos amino), mientras que el LUMO se desplaza hacia la piridina, y en menor medida al pasar de dadq2pyp a dadq3pyp, y de éste a daMe2pyp. Por tanto, la transición al primer estado excitado supone un aumento de la densidad electrónica en el anillo de piridina, así como su disminución en el de fenantridina, sobre todo en los nitrógenos de los grupos amino. El desplazamiento espectral hacia el azul al aumentar la longitud de la cadena dialquilante se explicaría de nuevo por un aumento de la energía del LUMO al disminuir la conjugación por la de la coplanaridad de los anillos.

Los cálculos SCRF/CI son cualitativamente similares (Figura 4.2, líneas rojas), si bien las transiciones de más baja energía resultan desplazadas hacia el azul (628 y 583 nm, respectivamente para el dadq2pyp y el dadq3pyp), en mejor acuerdo con los datos experimentales.

4.2.2 Luminiscencia

Los viológenos diaminados no presentan luminiscencia a temperatura ambiente, a diferencia de lo que ocurría con los no aminados. Sin embargo, a 273 K en agua se observa una banda de fluorescencia, con máximos a 750 y 720 nm, respectivamente para dadq2pyp y dadq3pyp. Una posible explicación al apagamiento de la fluorescencia a temperatura ambiente sería la desactivación del estado excitado por una transferencia de carga intramolecular desde los grupos amino. La especie generada tendría los grupos amino perpendiculares al plano de la fenantridina (sería un caso de TICT o “twisted intramolecular charge transfer”), y por ello sólo a baja temperatura se observaría fluorescencia, ya que entonces estaría impedida la rotación de los mismos.

4.3 Estabilidad y reactividad de las drogas

4.3.1 Estabilidad frente a pH y temperatura

Al igual que ocurría con los compuesto no aminados, el dadq2pyp y el dadq3pyp son inestables a pHs básicos. El espectro resultante muestra una disminución de la absorción tanto en la banda visible como en la centrada a 315 o 303 nm (Figura 4.4).

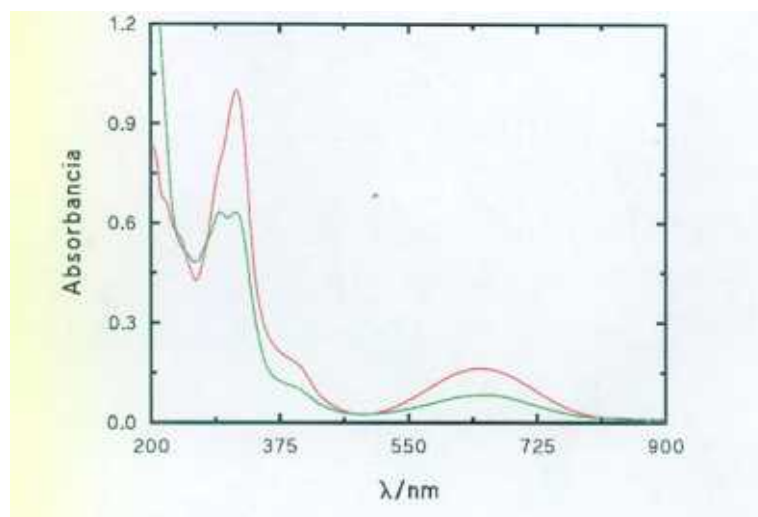


Figura 4.4. Espectro de absorción del dadq2pyp en agua (rojo) y de la especie generada tras subir el pH a 9.0 (verde).

También se observa descomposición de las drogas a altas temperaturas, siendo de nuevo más estable el dq3pyp. El espectro del dadq2pyp obtenido tras someter la muestra a 90 °C se muestra en la Figura 4.5, donde se puede observar que es similar de nuevo al de la 6-(piridil)fenantridina. Es posible, por tanto, que a altas temperaturas exista también en los viológenos diaminados una pérdida de la cuaternización por parte de los nitrógenos.

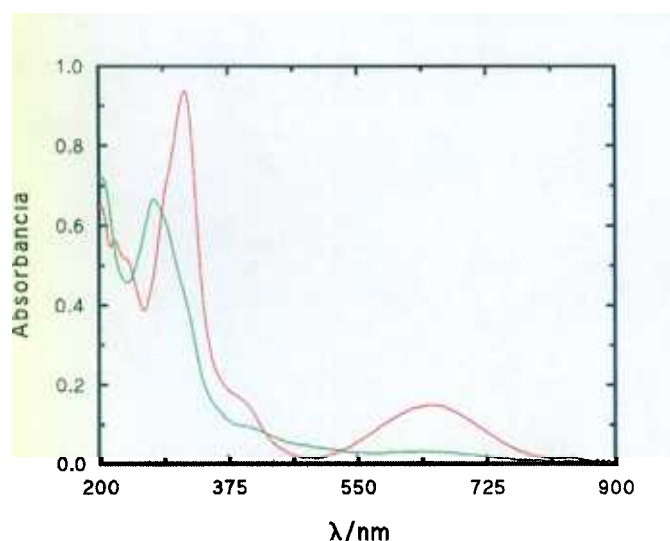


Figura 4.5. Espectro de absorción del dadq2pyp en agua, y de la especie generada tras incubar la muestra a 90 °C durante 4 horas.

Similares precauciones que las adoptadas con los viológenos no aminados en cuanto a preparación y almacenamiento de muestras concentradas para experimentos se tuvieron con los viológenos aminados.

4.3.2 Potenciales rédox

Debido a la facilidad con que las aminas aromáticas se oxidan irreversiblemente, no fue posible utilizar medidas de voltametría cíclica para medir el potencial rédox de los viológenos no aminados.

4.4 Interacción de las drogas con ácidos nucleicos

4.4.1 Incremento de la afinidad de unión por el DNA

La adición de DNA a una disolución de dadq2pyp o dadq3pyp provoca un fuerte desplazamiento hacia el rojo del espectro de absorción en el visible/UVp junto con una disminución de la absorción, indicando la existencia de interacción con el polinucleótido.

Este cambio se utilizó para realizar isotermas de unión del dadq2pyp a DNA de timo de ternera mediante titulaciones espectrofotométricas monitorizadas a 647 o a 317 nm. Inicialmente se intentó realizar los experimentos en tampón P, pero debido a la alta constante de asociación de esta droga a la correspondiente $[Na^+]$ (ver 4.4.3), fue imposible obtener representaciones de Scatchard fiables (todos los puntos obtenidos se concentraban en la zona de alta saturación, existiendo por tanto una gran incertidumbre en las constantes de asociación). Por ello, fue necesario realizar las isotermas en tampón P a concentraciones de NaCl relativamente altas (ver 4.4.3). La constante de asociación extrapolada a una $[Na^+]=10.19$ mM a partir de la representación de $\log K_b$ vs. $\log [Na^+]$ es de $3.4 \times 10^7 M^{-1}$. Por tanto, la introducción de grupos amino resulta en un incremento de dos órdenes de magnitud de la constante de asociación a esta $[Na^+]$.

4.4.2 Intercalación clásica en el DNA y disociación lenta

Las titulaciones viscosimétricas de DNA de timo de ternera con las drogas (Figura 4.6) indican que ambas interaccionan con el polinucleótido por intercalación, ya que incrementan en gran medida la viscosidad de la disolución. A diferencia de lo que ocurría con los viológenos no aminados, ahora las viscosidades a saturación son incluso superiores que las del etidio, de donde se concluye que los viológenos aminados se comportan como *intercalantes clásicos* en comparación con esta droga y con los

viológenos no aminados. Por otra parte, la viscosidad a saturación es mayor en el dadq2pyp que en el dadq3pyp, similarmente a lo observado con dq2pyp y dq3pyp. Una posible explicación al hecho de alcanzar mayor viscosidad que el etidio se sugerirá, a partir de los cálculos de mecánica molecular, en el apartado 4.4.4.

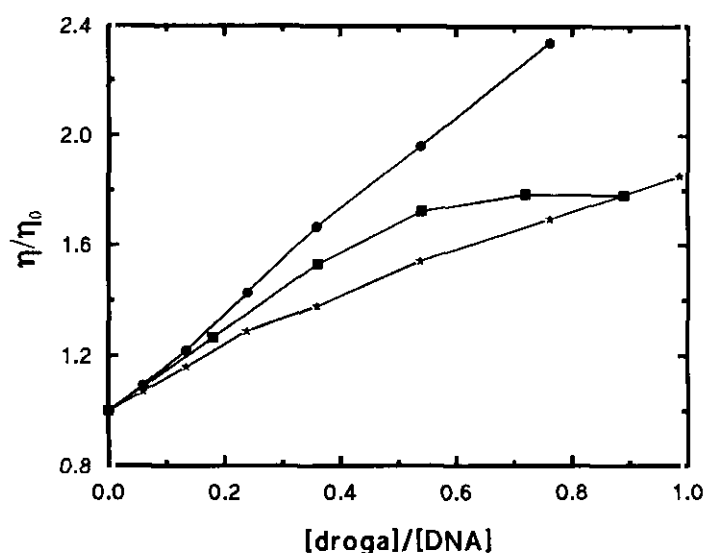


Figura 4.6. Viscosidad relativa de disoluciones de DNA en función de la relación de concentraciones de droga a DNA (en pares de bases), en tampón P y a 25.0 °C: dadq2pyp (círculos), etidio (cuadrados) y dadq3pyp (estrellas).

La dependencia con la concentración de $[Na^+]$ de las constantes de disociación de los complejos DNA-dadq2pyp está de nuevo de acuerdo con el modo intercalativo de unión para esta droga. En la Figura 4.7 se muestra la correspondiente representación doble-logarítmica, junto con el mejor ajuste lineal a los puntos experimentales.

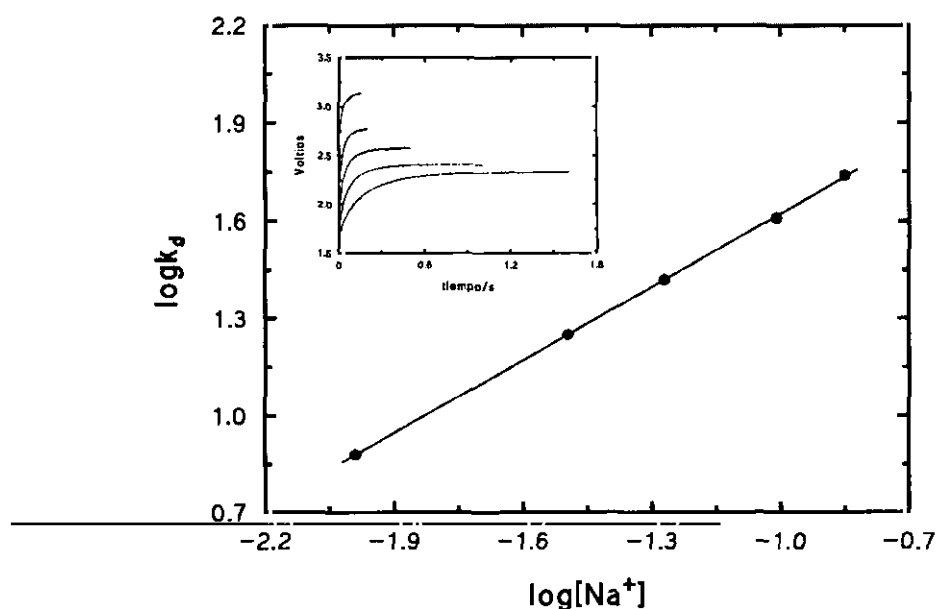


Figura 4.7. Representación doble logarítmica de la dependencia con la $[Na^+]$ de las constantes cinéticas de disociación del complejo daq2pyp DNAtt a 25.0 ± 0.1 °C. Se muestra también el mejor ajuste lineal a los puntos experimentales. Detalle: trazas promedio por ajuste a las cuales se obtuvieron las constantes cinéticas.

A todas las concentraciones de sal, la utilización de un modelo biexponencial mejoró significativamente los ajustes obtenidos. Este comportamiento contrasta con el observado con el dq2pyp (ver 3.4.2), así como con el propidio,⁶¹ donde los ajustes monoexponenciales son satisfactorios. Al objeto de analizar la dependencia en forma doble-logarítmica, de acuerdo con Denny et al.¹⁰⁹ se calcularon a cada $[Na^+]$ constantes de disociación aparentes ($k_{ap} = 1/\tau$) utilizando

$$\tau = 1 / (A_1 k_1 + A_2 k_2) \quad (4.1)$$

donde A_1 y A_2 son las amplitudes de los dos procesos del modelo biexponencial, y k_1 y k_2 son las respectivas constantes cinéticas. En la Tabla 4.II se muestran las constantes cinéticas de disociación (reales y aparentes), así como los correspondientes tiempos de vida aparentes.

TABLA 4.II. Dependencia con la concentración de $[Na^+]$ de las constantes cinéticas biexponenciales y aparentes, junto con los correspondientes tiempos de vida, para la disociación inducida por SDS de los complejos daq2pyp-DNAtt. También se muestran las amplitudes de los dos procesos del modelo biexponencial.

$[Na^+]/mM$	A_1	k_1/s	A_2	k_2/s	k_{ap}	τ/s
0.19	0.33	14.9	0.67	4.01	7.60	0.130
31.93	0.48	28.3	0.52	8.01	17.8	0.056
53.67	0.52	40.0	0.48	11.70	26.4	0.038
97.14	0.36	73.3	0.64	22.11	40.5	0.025
140.62	0.42	93.8	0.58	26.7	54.88	0.018

Todos los experimentos se realizaron en tampón P, con diferentes concentraciones de NaCl añadido. El mejor ajuste lineal a la representación doble logarítmica es $\log k_d = 0.75 \log [Na^+] + 2.37$

El mejor ajuste lineal resulta ser $\log k_d = 0.75 [Na^+] + 2.37$. Por lo tanto, la pendiente resultante está de nuevo dentro de los valores predichos por la teoría de condensación de contraiones para un intercalante dicatiónico (0.6-0.8),^{13,14,61} añadiendo evidencia adicional a la de las viscosimetrías sobre el modo intercalativo de unión de esta droga.

Los valores de las constantes cinéticas obtenidos son aproximadamente intermedios entre los del dq2pyp y el propidio:⁶¹ un orden de magnitud menor que los del primero, y un orden de magnitud mayor que los del segundo. Es posible que este valor intermedio

sea explicable asimismo por el valor intermedio de las energías de interacción droga-DNA obtenidas por modelado molecular (ver 3.4.5 y 4.4.4), que resultarían en energías de activación intermedias para el proceso de salida del sitio de intercalación.

El valor interpolado a 100 mM NaCl del tiempo de vida aparente del dadq2pyp es de 24 ms (a 17 °C sería aún mayor), correspondiendo a un intercambio lento ($\tau \geq 10$ ms). En consecuencia, parece cumplirse la conjetura hecha en el apartado 3.4.3 sobre el efecto en los tiempos de vida de fenantridinas *dicatiónicas* de los grupos amino: *la introducción de estos grupos en los viológenos cambia la disociación de rápida a lenta*, al igual que ocurre con las fenantridinas monocatiónicas.⁸³

De nuevo se puede obtener la dependencia con la $[\text{Na}^+]$ de las constantes cinéticas de asociación, utilizando la de las constantes cinéticas de disociación así como las de equilibrio de asociación (apartado 4.4.3). La recta resultante es $\log k_a = -1.41 \log[\text{Na}^+] + 5.53$. Por tanto, otra vez la pendiente de las constantes de asociación es mayor que la de las constantes de disociación, en mejor acuerdo con el modelo II de Wilson et al. (unión mediada por condensación).⁶¹ Las constantes cinéticas de asociación obtenidas por extrapolación a 0.2 M NaCl y a 0.5 M NaCl son de nuevo mayores que las del propidio ($3.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)⁶¹ aunque dentro del mismo orden de magnitud. A diferencia de lo que ocurría con el dq2pyp, donde la geometría de intercalación estaba menos restringida, en este caso debe acudir a argumentos de otro tipo para racionalizar esta mayor constante de asociación. Es posible que sea debida a que las medidas de este trabajo están realizadas a 25 °C, donde la probabilidad de choque entre el DNA y la droga son mayores que a 15 °C, temperatura a la cual se realizaron los experimentos con propidio de la referencia 61.

4.4.3 Efecto de polielectrolito. Diseción de la energía libre de unión del dadq2pyp al DNA

En la Figura 4.8 se muestra una representación doble-logarítmica de $\log K_b$ vs. $\log[\text{Na}^+]$ para la asociación de dadq2pyp con DNA de timo de ternera en tampón P y a 25.0 ± 0.1 °C. En línea continua se muestra el mejor ajuste lineal a los puntos experimentales: $\log K_b = -2.15[\text{Na}^+] + 3.25$. Por tanto, un total de 2.15 contraiones se liberan por cada molécula de dadq2pyp que se une al DNA. Este valor corresponde a un total de $2.3 \approx 2$ pares iónicos en el complejo droga-DNA.

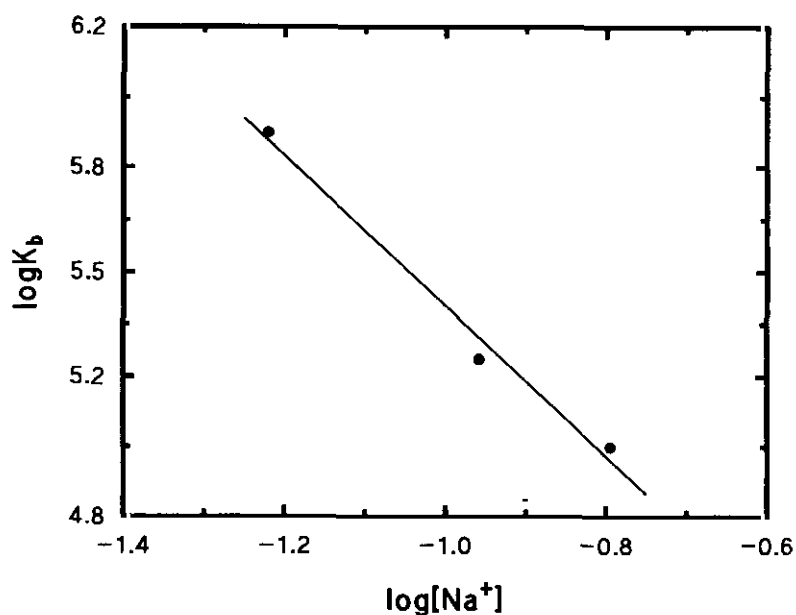


Figura 4.8. Representación doble logarítmica de $\log K_b$ vs. $\log[Na^+]$ para la asociación de dadq2pyp con DNA de timo de ternera en tampón P y a 25.0 ± 0.1 °C. En línea continua se muestra el mejor ajuste lineal a los datos experimentales.

En la Tabla 4.III se comparan las contribuciones por efecto de polielectrolito y restantes a la energía libre de unión del dadq2pyp, propidio y dq2pyp a una $[Na^+] = 10.19$ mM.

Tabla 4.III. Energía libre de unión (ΔG), junto con las contribuciones por efecto de polielectrolito (ΔG_{ep}) y restante (ΔG_{nep}) de la interacción de los viológenos pyp y el propidio con DNA de timo de ternera a $[Na^+] = 10.19$ mM y 25.0 ± 0.1 °C.

Compuesto	S [†]	ΔG ^{**}	ΔG_{ep} ^{**}	ΔG_{nep} ^{**}
Propidio	-2.20	-10.43	-5.97	-5.46
dadq2pyp	-2.15	-10.27	-5.84	-4.43
dq2pyp	-1.76	-7.15	-4.78	-2.37

[†]Pendiente de la recta de $\log K_b$ vs. $\log[Na^+]$.

^{**}Todos los valores de energía libre expresados en kcal/mol.

^{††}Valor extraído de la referencia 61, a 25 °C.

Por tanto, la introducción de grupos amino en los viológenos resulta en un incremento de la energía libre de unión a esta $[Na^+]$ de aproximadamente 3 kcal/mol. De este incremento, aproximadamente 1 kcal/mol viene del efecto de polielectrolito, que es mayor en el viológeno aminado debido a una mayor pendiente en la representación doble logarítmica. El resto (aproximadamente 2 kcal/mol) resulta de la contribución restante. En conclusión, *la introducción de grupos amino en los viológenos pyp añade 2 kcal/mol de ΔG_{nep} a la energía libre de unión total a cualquier $[Na^+]$.*

Recordando que la $\Delta\Delta G_{nep}$ entre el dq2pyp y el propidio es de aproximadamente 3 kcal/mol, resultan congruentes los datos comparados de mecánica molecular y termodinámicos del dq2pyp, dadq2pyp y propidio. La diferencia de energías de interacción entre el primero y el segundo es de aproximadamente 5 kcal/mol (ver 4.4.4), y entre el primero y el tercero de 9 kcal/mol (ver 3.4.5). La diferencia de ΔG_{nep} entre el primero y el segundo es de 2 kcal/mol, y entre el primero y el tercero de 3 kcal/mol. La mayor contribución restante del propidio vendría principalmente de las interacciones de van der Waals establecidas por su cadena polialquilamino y la pared del surco menor. Las 2 kcal/mol obtenidas como incremento de ΔG_{nep} entre el dq2pyp y el dadq2pyp podrían ser extrapolables a otras fenantridinas, permitiendo diseccionar la contribución que los grupos amino proporcionan a la estabilidad del etidio y propidio a cualquier $[Na^+]$.

4.4.4 El modelado molecular predice una unión enantioespecífica del dadq2pyp y el dadq3pyp

Los estudios de modelado molecular acerca de la unión intercalativa del dadq2pyp y el dadq3pyp a decadesoxinucleótidos muestran que, al igual que ocurría con el etidio y el propidio, el posicionamiento de estas drogas en el sitio de intercalación está restringido. Los grupos amino interaccionan con los esqueletos azúcar-fosfato de ambas cadenas de DNA, y la droga rellena completamente el sitio de intercalación. Por tanto, son altamente desfavorecidos ensamblados con el eje longitudinal de la fenantridina perpendicular al que conecta los fosfatos en el sitio de intercalación, a diferencia de lo que ocurría con los complejos del enantiómero *R* del dq2pyp (ver 3.4.7).

Asímismo, la presencia de la cadena dialquilo fuerza al par de bases superior a aumentar su parámetro de “buckle”. Este efecto no se daba con los viológenos no aminados, ya que al carecer de grupos amino la droga podía evitar este contacto desfavorable “saliendo” parcialmente del sitio de intercalación. Los incrementos de viscosidad a saturación observados para el dadq2pyp y el dadq3pyp en comparación con el etidio podrían explicarse en base a este movimiento de los pares de bases superiores. La cadena dialquilo actuaría aumentando el grosor efectivo de la droga, y por tanto provocando una mayor separación de los pares de bases del sitio de intercalación.

La Tabla 4.IV recoge las energías de unión del dadq2pyp y el dadq3pyp con diferentes dodecanucleótidos.

Tabla 4.IV. Energías de unión y sus componentes para la interacción intercalativa del dadq2pyp y el dadq3pyp con diferentes decadesoxinucleótidos en conformación B, calculadas por mecánica molecular. Todas las energías en kcal/mol. Todos los complejos intercalados desde el surco menor.

Complejo	$E_{in} = (E_{vdw} + E_{el} + E_{eh})^{**}$	E_{dn}^{\dagger}	E_{dd}^{\ddagger}	ΔE
s2cg	-84.31 -56.20 -27.67 -0.44	35.33	1.69	-47.29
r2cg	-81.76 -54.55 -27.11 -0.10	38.14	3.09	-40.53
s2ta	-83.31 -56.55 -26.71 -0.05	32.07	1.84	-49.30
r2ta	-76.62 -51.00 -25.59 -0.03	33.05	1.97	-41.60
s3cg	-82.33 -55.36 -26.91 -0.06	36.62	1.44	-44.27
r3cg	-80.76 -54.30 -26.37 -0.09	37.91	2.48	-40.37
s3ta	-81.62 -55.41 -26.18 -0.03	33.44	1.43	-46.75
r3ta	-78.34 -52.21 -26.04 -0.09	34.58	0.81	-42.95

*Estructuras designadas como (s/r)(2/3)(xy). La primera letra indica el enantiómero usado en el modelado (s corresponde a S, r corresponde a R). La segunda letra corresponde a la droga modelada (2 corresponde a dadq2pyp, 3 corresponde a dadq3pyp). Las dos últimas letras hacen referencia a la secuencia de bases del decadesoxinucleótido: cg para d(CGCGCGCGCG)₂, ta para d(TATATATATA)₂.

** E_{in} = energía de interacción no enlazante entre la droga y el polinucleótido en el complejo minimizado, expresable como la suma de las contribuciones de interacción de van der Waals (E_{vdw}), electrostática (E_{el}) y de enlaces de hidrógeno (E_{eh}).

E_{dn}^{\dagger} = Energía de desestabilización de la hélice, calculada como la diferencia entre las energías potenciales del oligonucleótido en el complejo y en conformación B minimizada.

E_{dd}^{\ddagger} = Energía de desestabilización de la droga, calculada como la diferencia entre las energías potenciales de la droga en el complejo y minimizada aisladamente.

Los datos presentes en la Tabla 4.IV sugieren que también el dadq2pyp y el dadq3pyp interaccionan enantioespecíficamente con el B-DNA. Las energías de unión son 2-8 kcal/mol más negativas para los enantiómeros S en comparación con los R. En general estas diferencias son debidas principalmente a diferencias en las correspondientes energías de unión, particularmente el componente de van der Waals. Analizando las distintas componentes de la energía de interacción de las diferentes partes de la droga (fenantridina, piridina, cadena dialquilo, grupos amino) con el DNA, se concluye que en general el origen de la enantioespecificidad es de nuevo la interacción de la piridina con la pared del surco menor. En el caso de los enantiómeros S, dicho anillo establece interacciones de van der Waals con el surco menor, mientras que en el caso de los enantiómeros R está expuesto al disolvente y no interacciona con dicho surco.

La Tabla 4.IV también sugiere que la diferencia de constantes de asociación entre los enantiómeros del dadq2pyp sería mayor que la de los enantiómeros del dadq3pyp, ya que en el primer caso las ΔE son mayores que en el segundo. Asimismo, y a diferencia de lo observado con los viológenos no aminados, la selectividad de las secuencias AT parece ser bastante similar que la de las secuencias GC.

Por otra parte, el análisis de las geometrías de los complejos resultantes de la minimización muestra que el esquema de plegamiento de los azúcares en los pares de bases en el sitio de intercalación es el observado en el cristal de CpG-etidio,⁷² es decir, el clásico ³E-3',5'-²E. Los ángulos de desenrollamiento por intercalación son asimismo mayores (20-23°). Por último, las orientaciones de ambas drogas en los sitios de intercalación son similares en todos los complejos, y caracterizadas por tener el eje longitudinal de la fenantridina paralelo al que conecta los fosfatos.

4.5 Fotoquímica de las drogas con ácidos nucleicos

4.5.1 Ausencia de exaltamiento de la luminiscencia con ácidos nucleicos

Los viológenos aminados no presentan tampoco luminiscencia cuando están unidos a DNA. Este comportamiento contrasta con el observado para el etidio, el cual incrementa enormemente su fluorescencia cuando se intercala en DNA/RNA.¹¹⁰

Es posible que esta diferencia de comportamiento sea debida al poder oxidante de los estados excitados de estas drogas. En ausencia de DNA los estados excitados se desactivarían por transferencia electrónica intramolecular desde los grupos amino (ver 4.2.2), mientras que al intercalarse en el DNA la transferencia electrónica sería desde las bases del polinucleótido, al igual que ocurre con el dq2pyp y el dq3pyp.

4.5.2 Actividad fotonucleásica de los viológenos

El dadq2pyp presenta actividad fotonucleásica. La Figura 4.9 muestra el corte ejercido tras irradiación (> 360 nm) de complejos de DNA plasmídico superenrollado (pBR322) con esta droga.

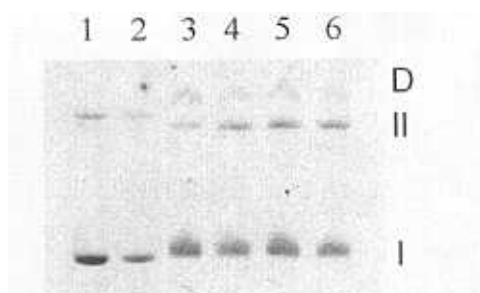


Figura 4.9. Fotocorte de pBR322 por dadq2pyp. Muestras con 4×10^{-5} M de DNA y diferentes concentraciones de dadq2pyp: (1) y (2) sin droga; (3) 13.3 μ M; (4) 33.3 μ M; (5) 46.6 μ M; (6) 66.6 μ M. (1) no fue irradiado; el resto de calles corresponde a muestras irradiadas durante 30' con luz proveniente de una lámpara de xe de 150 W, utilizando un filtro de corte de 360 nm.

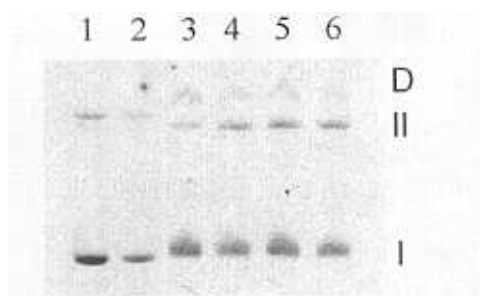


Figura 4.9. Fotocorte de pBR322 por dadq2pyp. Muestras con 4×10^{-5} M de DNA y diferentes concentraciones de dadq2pyp: (1) y (2) sin droga; (3) 13.3 μ M; (4) 33.3 μ M; (5) 46.6 μ M; (6) 66.6 μ M. (1) no fue irradiado; el resto de calles corresponde a muestras irradiadas durante 30' con luz proveniente de una lámpara de xe de 150 W, utilizando un filtro de corte de 360 nm.

(aproximadamente 200 nm). En consecuencia, la banda en el visible parece deberse únicamente a una transición electrónica, paralela al plano de la fenantridina y dirigida hacia el anillo de piridina. Asimismo, la menor conjugación piridina-fenantridina del dadq3pyp, resultado de un mayor ángulo diedro ρ , en comparación con el dadq2pyp, provoca un desplazamiento de la banda de absorción visible hacia el azul, tal y como se predijo en la discusión anterior.

Otro efecto de los grupos amino es la desaparición completa de la luminiscencia. La explicación más plausible a este fenómeno es la desactivación del estado excitado por transferencia electrónica intramolecular desde los grupos amino hasta el “núcleo” original de dqnpyp. Por otra parte, en presencia de DNA tampoco se observa luminiscencia. En este caso el estado excitado también podría desactivarse por fotooxidación de las bases del DNA. La falta de luminiscencia tanto en ausencia como en presencia de DNA podría resultar un inconveniente a la hora de utilizar los grupos diamino como sondas moleculares de ácidos nucleicos, ya que no sería posible utilizar esta propiedad para detectar la unión. De todas formas, el drástico hipocromismo y desplazamiento hacia el rojo observado por absorción al unirse las drogas al DNA resulta un método bastante sensible para monitorizar la unión.

La actividad fotonucleásica (evaluada a partir de la cinética de desaparición de formas I+D de plásmido superenrollado) es diez veces menor que la observada con el dq2pyp. Futuros experimentos dirigidos a estimar los rendimientos cuánticos de los viológenos pyp permitirán discernir si esta menor actividad es el resultado de diferentes propiedades de absorción de las drogas, o si por el contrario es debida a una menor capacidad de fotooxidación de las bases del DNA. Por ejemplo, los grupos amino podrían disminuir el potencial rédox de los estados excitados de las drogas, resultando en una menor proporción de radicales catiónicos de las bases generados tras irradiación.

El análisis comparativo de la unión del dq2pyp y el propidio, tanto desde un punto de vista estructural como termodinámico, permitió en la anterior discusión sugerir el efecto que los grupos amino tendrían sobre el modo de intercalación, cinética y componentes de la energía libre de unión. Básicamente todas las “predicciones” realizadas se han cumplido en el dadq2pyp.

En primer lugar, la introducción de grupos amino ha resultado en el cambio del modo de intercalación, de parcial y/o asimétrica a clásica. Parece, por tanto, que los grupos amino en fenantridinas (dicatiónicas) cambian drásticamente la geometría del complejo droga-DNA resultante. Los estudios de modelado molecular sugieren que en las drogas carentes de grupos amino el plegamiento de los azúcares en el sitio de intercalación no es el clásico 3E - $3'$, $5'$ - 2E observado con el etidio⁷², sino que por el contrario existe un desplazamiento hacia conformaciones oE o ${}_4E$ que resulta en un menor ángulo de desenrollamiento por intercalación. El efecto parece ser principalmente estérico, y causado por las interacciones de van der Waals azúcar-grupos amino. En ausencia de éstos, el sitio de intercalación es rellenado en menor medida, de forma que se “comprime” por sus los correspondientes esqueletos azúcar-fosfato. Asimismo, la droga puede intercalarse con posicionamientos en los cuales la fenantridina únicamente interacciona con uno de los esqueletos azúcar-fosfato, o bien en los cuales está parcialmente intercalada (complejos con intercalación “perpendicular”) o sólo completamente intercalada en una cadena (complejos con secuencias correspondientes a poly(dG)-poly(dC)). Como resultado, cabe esperar en dichas drogas una curvatura promedio en la doble hélice en la zona del sitio de intercalación, observándose macroscópicamente como un menor incremento de viscosidad.

Es posible que un efecto similar exista en otras fenantridinas mono- y dicatiónicas sin grupos amino. Debido a la inexistencia de titulaciones viscosimétricas en la bibliografía para este tipo de drogas, no es posible confirmar experimentalmente la hipótesis establecida en este trabajo por el momento, si bien futuros experimentos podrían ir encaminados en esta dirección.

Por otra parte, la introducción de grupos amino ha resultado en un incremento de los tiempos de vida droga-DNA en un orden de magnitud. El mecanismo de asociación (unión mediada por condensación) es el mismo en el dq2pyp, el dadq2pyp y el propidio. Las constantes de asociación a cualquier $[Na^+]$ son del mismo orden de magnitud para todas ellas, aunque las constantes de disociación difieren en el orden de magnitud, en el orden $dq2pyp > dadq2pyp > propidio$. Existe una buena correlación entre las energías intermoleculares droga-DNA obtenidas por modelado molecular y las constantes de disociación. Esta observación sugiere que los diferentes órdenes de magnitud de las constantes de disociación son el reflejo de la energía de activación necesaria para salir del

sitio de intercalación. De la misma forma se podrían por tanto explicar los también observados diferentes órdenes de magnitud en los tiempos de vida de los complejos droga-DNA de fenantridinas monocatiónicas.⁸³

Finalmente, la introducción de grupos amino resulta en el incremento en 2 kcal/mol de la contribución no de polielectrolito a la energía libre de unión de los viológenos *pyp*. Debido a que las estructuras químicas del etidio y del propidio son diferentes (el primero posee una cadena de etilo mientras que el segundo una de polialquilamino) no es posible realizar una comparación directa de sus ΔG_{nep} , y en particular estimar la contribución relativa a la estabilidad de los respectivos complejos de las distintas partes de la molécula (*fenilo, fenantridina, grupos amino, etc*). La razón es que las cadenas pueden establecer diferentes interacciones de van der Waals con el surco menor del DNA. El estudio comparativo de la energía libre de unión del *dq2pyp* y *dadq2pyp* (moléculas que sólo difieren en la ausencia/presencia de grupos amino) presentado en este trabajo constituye por tanto un modelo para diseccionar la contribución de los grupos amino a la energía libre de unión de fenantridinas como el etidio y el propidio. Asumiendo una diferencia despreciable en los efectos hidrofóbicos e interacciones iónicas de diferentes fenantridinas dentro de una misma familia, sería posible generalizar esta observación y concluir que la introducción de grupos amino estabilizaría en 2 kcal/mol la interacción. De esta forma, la mayor energía libre de unión del propidio en comparación con el *dadq2pyp* vendría de la cadena polialquilamino; concretamente, la sustitución de una cadena dialquilo por una polialquilamino resultaría en un incremento de la ΔG_{neo} de aproximadamente 1 kcal/mol.

5: Conclusiones

Las principales conclusiones de este trabajo se enumeran a continuación:

- *Los viológenos pyp se unen fuertemente al DNA.* A una concentración de Na^+ de 10.19 mM, los viológenos no aminados presentan constantes de asociación entre 10^4 y 10^5 M^{-1} , mientras que el viológeno con grupos amino dadq2pyp muestra una constante dos órdenes de magnitud mayor ($K_b = \text{O}(10^7) \text{ M}^{-1}$).
- *El modo de unión es por intercalación.* En el caso de los viológenos no aminados, esta intercalación es parcial y/o asimétrica. La introducción de grupos amino resulta en drogas con intercalación clásica, debido probablemente a la fijación de la molécula en el sitio de intercalación por interacción de sus grupos amino con *ambos* esqueletos azúcar-fosfato del DNA.
- *La introducción de dos grupos amino en los viológenos aporta 2 kcal/mol adicionales a la ΔG_{nep} .* A una $[\text{Na}^+] = 10.19 \text{ mM}$, el efecto de polielectrolito (ΔG_{ep}) es la contribución más importante (67%) a la energía libre de unión del viológeno no aminado dq2pyp. En el viológeno con grupos amino dadq2pyp el aumento de ΔG_{nep} provoca que esta contribución se vuelva comparable a la de polielectrolito (aproximadamente un 50%). La introducción de grupos amino provoca asimismo un incremento de la ΔG_{ep} , de cuantía variable dependiendo de la $[\text{Na}^+]$.
- *La introducción de grupos amino aumenta en un orden de magnitud las constantes de disociación a cualquier $[\text{Na}^+]$, pero no modifica el orden de magnitud de las constantes de asociación.* De esta forma, se pasa del régimen de intercambio rápido observado en el dq2pyp, al lento observado en el dadq2pyp. Similar comportamiento ha sido previamente observado en fenantridinas monocatiónicas.

- *La unión es específica de pares de bases GC alternantes.* La unión a homopolinucleótidos de doble hélice resulta en constantes de asociación un orden de magnitud menor.
- *Las drogas presentan absorción en el visible.* En el caso de los viológenos no aminados la banda visible/UVp es debida a dos transiciones electrónicas, la primera dirigida al anillo de piridina, y la segunda paralela al eje longitudinal de la fenantridina. En los aminados, sólo una transición electrónica, polarizada hacia el anillo de piridina, parece contribuir a la banda en el visible. La banda centrada a aproximadamente 300 nm estaría compuesta por varias transiciones electrónicas, polarizadas según el eje longitudinal de la fenantridina, que resultarían en una polarización macroscópica en la misma dirección.
- *Las drogas no aminadas presentan fluorescencia relativamente intensa, mientras que las aminadas no son luminiscentes.* En este último caso, la razón podría ser una transferencia electrónica intramolecular de los grupos amino al “núcleo” no aminado.
- *Las drogas presentan actividad fotonucleásica.* El mecanismo más posible se iniciaría por la transferencia electrónica demostrada de las bases al singlete excitado de las drogas y que de hecho es responsable del apagamiento de la fluorescencia por DNA. La especificidad de unión a secuencias GC alternantes, junto con la fotooxidación preferente en guaninas (debido a que esta droga tiene el potencial de ionización más bajo) hacen de estas drogas fotonucleasas altamente específicas de tramos ricos en pares GC.
- *Los viológenos dq2pyp y dq3pyp se unen enantioespecíficamente al B-DNA.* El modelado molecular predice una enantioespecificidad aún mayor para el dadq2pyp y el dadq3pyp. El modelado molecular permite proponer un esquema de unión enantioespecífica basada en la pseudosimetría tetraédrica aproximada de los viológenos pyp: en el enantiómero *S* (preferido) el anillo de piridina se sitúa paralelamente a las paredes del surco menor, estableciendo interacciones de van der Waals; en el enantiómero *R*, la piridina se sitúa perpendicularmente y esta expuesta al disolvente.

En definitiva, a partir de este trabajo se ha podido demostrar que *los viológenos pyp constituyen un nuevo grupo de fotonucleasas quirales con unión enantioespecífica a*

DNA. Estas capacidades son similares a las mostradas por los complejos de metales de transición, ampliamente estudiados y utilizados como sondas moleculares y agentes para la fotomanipulación de ácidos nucleicos. De hecho, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, los viológenos pyp son el primer grupo de drogas diferentes a los complejos metálicos que presentan estas propiedades. Por tanto, constituyen una nueva vía alternativa de diseño de drogas fotoactivas dirigidas a ácidos nucleicos con propiedades de reconocimiento molecular y fotomanipulación de ácidos nucleicos.

6: Bibliografía

1. *Nucleic Acid Targeted Drug Design*. Eds. Propst, C.L., Perun, T.J. Marcel Dekker, New York (1990).
2. Krugh, T.R. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 351-364.
The Design of Drugs to Macromolecular Targets. Ed. Bedell, C.R. John Wiley & Sons (1992).
3. Perun, T.J, Propst, C.L. (1992) en *Nucleic Acid Targeted Drug Design*. Eds. Propst, C.L., Perun, T.J. pp. 1-13.
4. Tullius, T.D. (1989) *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 213-237.
5. Kopka, M.L., Yoon, C., Goodsell, D., Pjura, P., Dickerson, R.E. (1985) *J. Mol. Biol.* **183**, 553-556.
6. Kopka, M.L., Larsen, T.A. (1992) en *Nucleic Acid Targeted Drug Design*. Eds.
7. Propst, C.L., Perun, T.J. pp. 303-374. Marcel Dekker, New York.
8. Waring, M.J., Bailly, C. (1994) *J. Mol. Recognit.* **7**, 109-122.
9. Uhlmann, E., Peyman, A. (1990) *Chem. Rev.* **90**, 544-584.
10. He, G.-X., Browne, K.A., Groppe, J.C., Blaskó, A., Mei, H.-Y., Bruice, T.C. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7061-7071.
11. Wang, A.H.-J., Ughetto, G., Quigley, G.J., Rich, A. (1987) *Biochemistry* **26**, 1152-1163.
12. Bourdouxhe, C., Colson, P., Houssier, C., Sun, J.-S., Montenay-Garestier, T., Hélène, C., Rivalle, C., Bisagni, E., Waring, M.J., Hénichart, J.P., Bailly, C. (1992) *Biochemistry* **31**, 12385-12396.
13. Wilson, W.D., Tanious, F.A., Barton, H.J., Jones, R.L., Fox, K., Wydra, R.L. y Streckowski, L. (1990) *Biochemistry* **29**, 8452-8463.
14. Tanious, F.A., Veal, J.M., Buczak, H., Ratmeyer, L.S., Wilson, W.D. (1992) *Biochemistry* **31**, 3103-3112.
15. Wang, A.H.J. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 361-368.
16. Patel, D.J. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 345-353.
17. Record, T. Jr., y Spolar, R.S. (1990) en *The Biology of Nonspecific DNA-Protein Interactions*. Ed. Revzin, A., pp 33-69, CRC Press, Boston.
18. Dickerson, R.E. (1983) *Sci. Am.* **249**, 94-111.
19. Dervan (1986) *Science* **232**, 464-471.
20. Hélène, C. (1991) *Anti-Cancer Drug Design* **6**, 569-584.

21. Barton (1986) *Science* **233**, 727-734.
22. Dickerson (1992) *Methods Enzymol.* **211**, 67-111.
23. Dickerson, R.E., Goodsell, D.S. y Neidle, S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3579-3583.
24. *Unusual DNA Structures* Eds. Wells, R.D., Harvey, S.C. Springer-Verlag, New York (1988).
25. Pilet, A.M. y Green, J.B. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 303-310.
26. Westhof, E., Jaeger, L. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 327-333.
27. Symons, R.H. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.*
28. Nordén, B., Lincoln, P., Akerman, B., Tuite, E. (1996) en *Metal Ions in Biological Systems*. Eds. Siegel & Sielgel. VCH, Berlin.
29. Mei, H.-Y., Barton, J.K. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7414-7416.
30. Friedman, A.E., Kumar, C.V., Turro, N.J., Barton, J.K. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2595.
31. Muller, B.C., Raphael, A.L., Barton, J.K. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1764-1768.
32. Lilley, D.M.J. (1992) *Methods Enzymol* **212**, 5-10.
33. Dunn, D.A., Lin, V.H. y Kochevar, I.E. (1992) *Biochemistry* **31**, 11620-11625.
34. Kochevar, I.E. y Dunn, D.A. (1990) en *Bioorganic Chemistry*. Ed. Morrison, H. pp. 273-315. Wiley Press, New York.
35. Cadet, J., Berger, M., Morin, B., Ravanat, J.-L. y Raoul, S. (1994) *The Spectrum*, 21-24.
36. Summers, L. A. (1980) *The bipyridinium herbicides*. Academic Press, New York.
37. Greenstock, C.L., Chapman, J.D., Raleigh, J.A., Shierman, E., Reuvers, A.P. (1974) *Radiation Res.* **59**, 556-561.
38. Fromherz, P. y Rieger, B., (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5361-5362.
39. Blacker, A.J., Jazwinski, J., Lehn, J.-M., Wilhelm, F.X. (1986) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1035-1037.
40. Blacker, A.J., Jazwinski, J, Lehn, J.M. (1987) *Helv. Chim. Acta* **70**, 4-9.
41. Slama-Schwok, A., Jazwinski, J., Beré, A., Montenay-Garestier, T., Rouge, M., Hélène, C., y Lehn, J.-M. (1989) *Biochemistry*, **28**, 3227-3234.
42. Slama-Schwok, A., Rouge, M., Ibanez, V., Geacintov, N. E., Montenay-Garestier, T., Lehn, J.-M., y Hélène, C. (1989b) *Biochemistry*, **28**, 3234-3242.
43. Brun, A. M., y Harriman, A. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 8153-8159.
44. Wilson, W.D., Ratmeyer, L., Zhao, M., Strekowski, L., Boykin, D. (1993) *Biochemistry* **32**, 4098-4104.
45. Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F. y Stewart, J. J. P. (1985) *J. Am. Chem Soc.* **107**, 3902-3909.

46. Weiner, S. J., Kollman, P. A., Nguyen, D. T., Case, D. A. (1986) *J. Comput. Chem.* **7**, 230-252.
47. Ridley, J.E., Zerner, M.C. (1973) *Theoret. Chim. Acta.* **32**, 111-121.
48. Gilbert, A. y Baggott, J. *Essentials of Molecular Photochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1991).
49. IUPAC (1988) *Pure Appl. Chem.* **60**, 1107-1114.
50. O'Connor, D.V., Phillips, D. *Time-correlated single photoncounting*. Academic Press, London (1984).
51. Cantor, R.C., Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry*, Vol.II. pp. 409-480. W.H. Freeman, San Francisco.
52. Nordén, B., Kubista, M. y Kurucsev, T. (1992) *Quart. Rev. Biophys.* **25**, 51-170.
53. Michl, J. y Thulstrup, E.W. (1986) *Spectroscopy with Polarized Light*, VCH Publishers, New York.
54. McCaffery, A.J., Stephens, P.J. y Schatz, P.N. (1967) *Inorg. Chem.* **6**, 1614-1625.
55. Scatchard, G. (1949) **51**, 660-672.
56. McGhee, J. D. y von Hippel, P. H. (1974) *J. Mol. Biol.* **86**, 469-489.
57. Manning, G.S. (1978) *Quart. Rev. Biophys.* **11**, 179-246.
58. Friedman, R.A.G., Manning, G.S., Shahin, M.A. (1990) en *Chemistry & Physics of DNA-Ligand Interactions*. Ed. Kallenbach, N.R. pp. 37-64. Adenine Press, New York.
59. Record, M.T.Jr., Anderson, C.F. y Lohman, T.M. (1978) *Q. Rev. Biophys.* **11**, 103-178.
60. Wilson, W.D., Lopp, I.G. (1979) *Biopolymers* **18**, 3025-3041.
61. Wilson, W.D., Krisnamoorthy, C.R., Wang, Y.H., Smith, J.C. (1985) *Biopolymers* **27**, 1941-1961.
62. Cohen, G., Eisenberg, H. (1969) *Biopolymers* **8**, 45-55.
63. Gabbay, E. J., Scofield, R. E. Baxter, C. S. (1973) *J. Am. Chem.Soc.* **95**, 7850-7857.
64. Lohman, T.M., DeHaseth, P.L., Record, T.M. (1978) *Biophys. Chem.* **8**, 281-294.
65. Lohman, T.M. (1985) *CRC Crit. Rev. Biochem.* **19**, 191-245.
66. Levine, I. *Molecular Spectroscopy*.
67. Baker, J. (1986) *J. Comp. Chem.* **7**, 385.
68. Dewar, M.J.S., Thiel, W. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 4899.
69. Besler, B.H, Merz, K. M. y Kollman, P. A. (1990) *J. Comp. Chem.* **11**, 431-439.
70. Nishimoto, K., Mataga, Z. (1957) *Physik. Chem.* **12**, 335-338.
71. Verlet, L. (1967) *Phys. Rev.* **159**, 98-103.
72. Jain, S.C., Sobell, H.M. (1984) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1**, 1179-1194.

73. Summers, L.A. (1980) *The bipyridinium herbicides*. p. 50. Academic Press, New York.
74. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Edition. pp 6.1-6.35. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
75. Kishikawa, H., Jiang, Y.-P., Goodisman, J. and Dabrowiak, J.C. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5434-5440.
76. Kay, E.R., Simmons, N.S. y Dounce, A.L. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1724-1728.
77. Xodo, L. E., Manzini, G., Ruggiero, J., Quadrioglio, F. (1988) *Biopolymers* **27**, 1839-1857.
78. Houssier, C., Hardy, B., Fredericq, E. (1974) *Biopolymers* **13**, 1141-1160.
79. Amouyal, E., Zidler, B. (1982) *Isr. J. Chem.* **22**, 117-124.
80. Nordmeier, E. (1992) *J. Phys. Chem.* **96**, 6045-6055.
81. Dunn, D.A., Lin, V.H., Kochevar, I.E. (1991) *Photochem. Photobiol.* **53**, 47-56.
82. Satyanarayana, S., Dabrowiak, J. C., & Chaires J. B. (1992) *Biochemistry* **31**, 9319-9324.
83. Leupin, W., Feigon, J., Denny, W.A., Kearns, D.R. (1985) *Biophys. Chem.* **22**, 299-305.
84. Waring, M.J. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 152-192.
85. Demas J. N. (1983) en *Excited State Lifetime Measurements*, pp. 35-56, Academic Press, New York.
86. Kubota, Y., Motoda, Y., Shigemune, Y., Fujisaki, Y. (1979) **29**, 1099-1106.
87. Rau, H., Frank, R., Greiner, G. (1986) *J. Phys. Chem.* **90**, 2476-2481.
88. Kittler, L., Lober, G., Gollmick, F.A., Berg, H. (1980) *Bioelectrochem. Bioenerg.* **7**, 503-511.
89. Knapp, C., Lecomte, J.P., Kirsch-De Mesmaeker, A., Orellana, G. (1996) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* en prensa.
90. Kelly, J.M., van der Putten, W.J.H.M., McCommel, D.J. (1987) *Photochem. Photobiol.* **45**, 167-175.
91. Kinoshita, K. (1992) *Electrochemical oxygen technology*. p. 4. Wiley, New York.
92. Casu, M., Puligheddu, S., Saba, G., Gutiérrez-Alonso, M.C., Orellana, G., Lai, A., enviado para publicación.
93. Båguley, B.C., Falkenhang, E.M. (1978) *Nucleic Acids Res.* **5**, 60-171.
94. Bresloff, J.L., Crothers, D.M. (1981) *Biochemistry* **20**, 3537-3553.
95. Chaires, J. (1983) *Biochemistry* **22**, 4204-4211.
96. Wilson, W.D., Wang, Y.-H., Krisnamoorthy, C.R., Smith, J.C. (1985) *Biochemistry* **24**, 3991-3999.
97. Klug, A., Rhodes, D., Smith, J., Finch, J.T., Thomas, J. (1980) *Nature* **287**, 509-

516.

98. Thomas, G.A., Peticolas, W.L. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 993-996.
 99. Chalikian, T.V., Plum, G.E., Sarvazyan, A.P., Breslauer, K.J. (1994) *Biochemistry* **33**, 8629-8640.
 100. Nelson, H.C.M., Finch, J.T., Luisi, B.F., Klug, A. (1987) **330**, 221-226.
 101. McCall, M., Brown, T., Kennard, O. (1985) *J. Mol. Biol.* **183**, 385-396.
 102. Meehan, T., Straub, K. (1979) *Nature* **277**, 410-412.
 103. Scaria, P.V., Craig, J.C., Shafer, R.H. (1993) *Biopolymers* **33**, 887-895.
 104. Aiyar, J., Hitchcock, S.A., Denhart, D., Liu, K.K.C., Danishefsky, S.J., Crothers, D.M. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 855-858.
 105. Kamitori, S., Takusagawa, F. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 4154-4165.
 106. Stockert, J.C. (1989) *J. Theor. Biol.* 107-111.
 107. Healy, P.C., Engelhardt, L.M., Patrick, V.A., White, A.J. (1985) *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.* 2541-2545.
 108. Sigman, D.S., Mazumder, A., Perrin, D.M. (1993) *Chem. Rev.* **93**, 2295-2316.
 109. Denny, W.A., Atwell, G.J., Baguley, B.C., Wakelin, L.P.G. (1985) *J. Med. Chem.* **28**, 1568-1574.
 110. LePecq, J.-B., Paoletti, C. (1967) *J. Mol. Biol.* **27**, 87-106
-