



EMPLEO DE FÁRMACOS DERIVADOS DE LAS
ANTRACICLINAS COMO AGENTES
ANTICANCERÍGENOS

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

CURSO 2016-2017

AUTORA: INMACULADA GONZÁLEZ DOMÍNGUEZ





UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA

**EMPLEO DE FÁRMACOS DERIVADOS DE LAS
ANTRACICLINAS COMO AGENTES ANTICANCERÍGENOS**

Memoria presentada como Trabajo Fin de Grado en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla por Inmaculada González Domínguez.

Tutora: Elia María Grueso Molina

Departamento de Química Física

TFG de carácter bibliográfico

ÍNDICE

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Introducción.....	3
3.1. Antraciclinas: estructuras y aplicaciones terapéuticas.....	3
3.1.1. Estructuras de las antraciclinas	3
3.1.2. Aplicaciones terapéuticas de las antraciclinas	3
3.2. Ácidos nucleicos: estructuras, interacciones y diferentes conformaciones	6
3.2.1. Estructura de los ácidos nucleicos	6
3.2.2. Tipos de enlace en el ADN	9
3.2.3. Tipos de conformaciones en el ADN	10
3.3. Modos de unión	12
a) Intercalación.....	12
b) Unión externa.....	14
c) Unión a los surcos mayor y menor.....	14
d) Unión electrostática	15
4. Objetivos	15
5. Metodología	16
6. Resultados y discusión	17
6.1. Antraciclinas: toxicidad e interacción con el ADN	17
6.2. Toxicidad de doxorubicina, daunorubicina y epirubicina.....	17
6.2.1. Doxorubicina	19
6.2.2. Daunorubicina	20
6.2.3. Epirubicina	22
6.3. Interacción antraciclinas/ADN: modos de unión, energética de interacción y daño inducido en la doble hebra	22
6.3.1. Daño al ADN por interacción de antraciclinas con TOP-II.....	29
6.3.2. Daño en el ADN inducido por la formación de radicales libres	30
7. Conclusiones	31
8. Referencias bibliográficas.....	33

1. Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol

DOX: Doxorubicina

DNR: Daunorubicina

EPI: Epirubicina

IDA: Idarubicina

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Ca²⁺: Calcio

ICC: Insuficiencia cardiaca congestiva

TOP-II: Enzima topoisomerasa II

MDA: Malondialdehído

Tm: Temperatura de fusión

Tto: Tratamiento

Pb: Pares de bases

2. Resumen

Dentro de los compuestos con amplio interés en terapia anticancerosa se encuentran las antraciclinas, destacando la doxorubicina, la daunorubicina y la epirubicina. Estos fármacos son ampliamente usados en la clínica, ya que poseen propiedades anticancerígenas que ayudan a combatir diferentes tipos de cánceres, entre los que se incluyen tumores hematológicos y tumores sólidos. Se ha comprobado que la capacidad anticancerosa de las antraciclinas está íntimamente relacionada a la interacción de estos fármacos con la doble hélice de ADN, donde la estructura de las antraciclinas juega un papel fundamental. Así pues, la posterior inhibición de la enzima topoisomera-II, así como la formación de radicales libres constituyen algunos de los efectos anticancerígenos más importantes asociados a estos fármacos. No obstante, a pesar de su capacidad anticancerígena, el uso de las antraciclinas en terapia antineoplásica se encuentra limitado debido a sus efectos adversos, entre los que se destaca fundamentalmente la cardiotoxicidad.

Esta revisión bibliográfica resume la capacidad anticancerígena de estos fármacos, así como sus aplicaciones en terapia anticancerosa y sus posibles efectos adversos.

Palabras clave: Antraciclinas, doxorubicina, intercalación, ADN, cardiotoxicidad.

3. Introducción

3.1. Antraciclinas: estructuras y aplicaciones terapéuticas

3.1.1. Estructuras de las antraciclinas

Las antraciclinas son fármacos anticancerígenos que actúan atacando una gran variedad de tumores, por lo que se usan en diversas terapias anticancerosas.

La estructura básica de las antraciclinas consta de una aglicona tetracíclica y un aminoazúcar (daunosamina), conectados por un enlace glicosídico en el carbono 7 y una pequeña cadena lateral con un grupo carbonilo en el carbono 13 (véase figura 1).

La interacción de estos fármacos con el ADN depende fundamentalmente de la estructura de los mismos. Así, los anillos B, C y D actúan como intercaladores del ADN, la función de anclaje a la doble hebra se asocia al anillo A y el aminoazúcar se une al surco menor del ADN (Rabbani y cols., 2004).

Para mejorar las propiedades terapéuticas y farmacológicas de estos compuestos, se realizaron diversas modificaciones en la estructura básica, como cambios o sustituciones en el carbono 9 o en la fracción cíclica. Estas modificaciones estructurales son clave en relación con la actividad antitumoral de estas moléculas. Hasta la fecha, ningún derivado ha mostrado una actividad superior a la de doxorubicina, que continúa siendo la antraciclina que presenta mayor eficacia en las terapias contra el cáncer (Menna y cols., 2007).

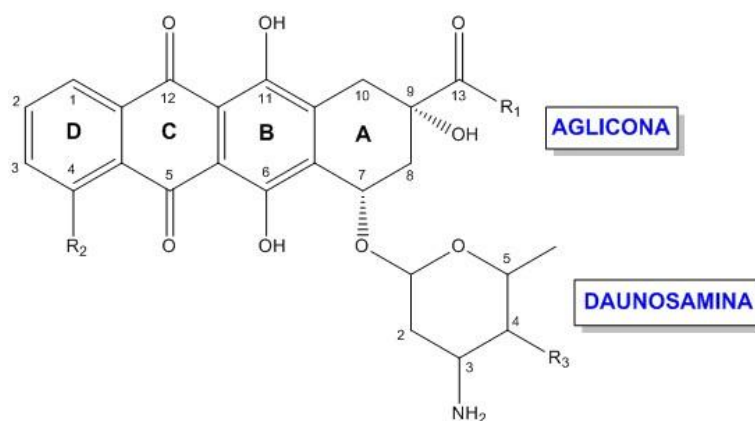


Figura 1. Estructura general de antraciclinas.

3.1.2. Aplicaciones terapéuticas de las antraciclinas

La actividad antitumoral de las antraciclinas, así como las aplicaciones terapéuticas, dependerá de la estructura que presenten cada uno de estos fármacos. Así, aquellas antraciclinas que presentan un alcohol primario en su cadena lateral, como la doxorubicina o la epirubicina, son efectivas fundamentalmente en el tratamiento de cánceres sólidos y diversos tumores hematológicos. Por otro lado, aquellas que poseen en la cadena lateral grupos metilos, como la

daunorubicina o la idarubicina, se utilizan para tratar neoplasias hematológicas, como leucemia mieloblástica o sarcoma de Kaposi derivado del SIDA (Menna y cols., 2007). En la tabla 1, se recogen las diferentes aplicaciones terapéuticas de las antraciclinas en función de la estructura que presente cada uno de los fármacos.

ANTRACICLINAS	R1	R2	R3	USOS
DOX	CH ₂ OH	OCH ₃	OH	Carcinomas, sarcomas
DNR	CH ₃	OCH ₃	OH	Leucemia mieloblástica y linfoblástica
EPI	CH ₂ OH	OCH ₃	OH	Diversos linfomas y tumores sólidos
IDA	CH ₃	H	OH	Leucemias, S. de Kaposi

Tabla 1. Principales aplicaciones terapéuticas de los diferentes tipos de antraciclinas (Menna y cols., 2007).

Las estructuras y propiedades más importantes de los fármacos anteriormente expuestos se describen a continuación:

a) Daunorubicina (DNR): se usa habitualmente para tratar tumores hematológicos, siendo uno de los antitumorales más eficaces en el tratamiento de leucemias linfocíticas y leucemias mieloides agudas (Beretta y Zunino, 2007). Este fármaco usado en monoterapia produce la completa remisión de la enfermedad en el 50% de los casos; no obstante, presenta poca actividad frente a tumores sólidos (Hortobagyi G, 1997). Su estructura puede observarse en la figura 2.

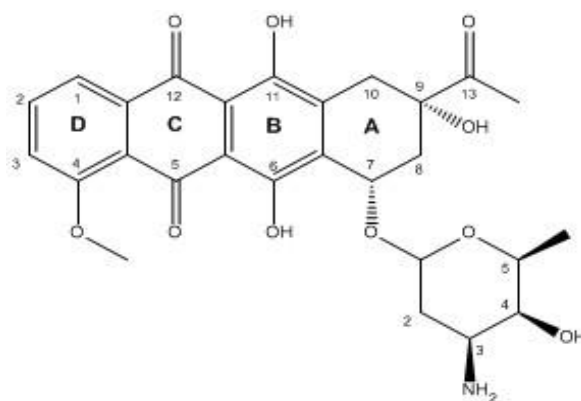


Figura 2. Estructura de la daunorubicina.

b) Doxorubicina (DOX): presenta un amplio espectro de acción y continúa siendo uno de los agentes antitumorales más efectivos para el tratamiento de sarcomas y de tumores sólidos tales como cáncer de mama, pulmón, ovario o hueso (Beretta y Zunino, 2007). Además, presenta elevada eficacia en el tratamiento de cánceres avanzados, así como de cánceres en estadio temprano (Hortobagyi G, 1997). Su estructura se observa en la figura 3.

Es habitual administrar doxorubicina en combinación con otros fármacos para tratar diferentes tipos de tumores. Así pues, la administración conjunta de doxorubicina con ciclofosfamida, vincristina y prednisona se aplica para tratar pacientes con linfoma no Hodgkin. Por otro lado, en pacientes con linfoma de Hodgkin se administrará doxorubicina conjuntamente con bleomicina, vincristina y decarbacina (Hortobagyi G, 1997).

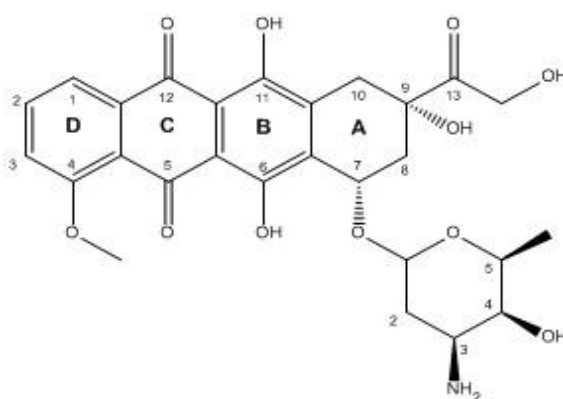


Figura 3. Estructura de la doxorubicina.

c) Epirubicina (EPI): se caracteriza por la epimerización del grupo hidroxilo en posición 4 del amino azúcar (véase figura 4), manifiesta una disminución de la cardiotoxicidad, a la vez que mantiene la eficacia antitumoral. No obstante, sólo presenta efectividad frente a determinados tumores (Beretta y Zunino, 2007). Al igual que la doxorubicina, la epirubicina es muy efectiva en el tratamiento de determinados tipos de cánceres en su etapa temprana y cánceres avanzados.

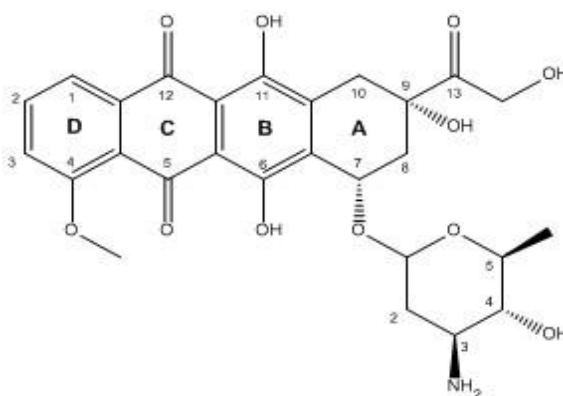


Figura 4. Estructura de la epirubicina.

d) Idarubicina (IDA): carece del grupo metoxi en posición 4 del cromóforo (véase figura 5), muestra un aumento de la lipofilia y un cambio del perfil farmacológico. La eliminación del grupo metoxi potencia la actividad antitumoral como consecuencia de la acumulación intracelular de la antraciclina. La elevada lipofilia de la idarubicina permite su absorción oral y le otorga capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica, lo que supone una gran ventaja de la idarubicina frente a otras antraciclinas (daunorubicina), que resultan inactivas al administrarse por vía oral. La idarubicina está restringida únicamente al tratamiento de leucemias (Beretta y Zunino, 2007).

Por último, la idarubicina en administración concomitante con citarabina (fármaco anticanceroso usado en el tratamiento de leucemia mieloide aguda y linfomas) es más efectiva que la daunorubicina administrada junto con citarabina en pacientes con esta enfermedad (Hortobagyi G, 1997).

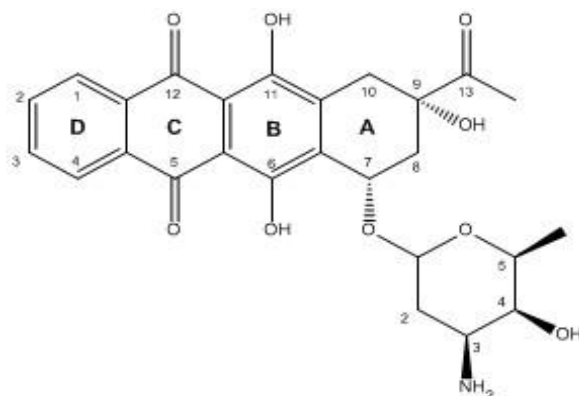


Figura 5. Estructura de la idarubicina.

3.2. Ácidos nucleicos: estructuras, interacciones y diferentes conformaciones

Los ácidos nucleicos son macromoléculas biológicas presentes en todos los organismos vivos, cuya función principal consiste en almacenar y transmitir la información genética a las diferentes generaciones celulares.

3.2.1. Estructura de los ácidos nucleicos

En 1953, James Watson y Francis Crick establecieron la estructura tridimensional de doble hélice del ADN mediante estudios de difracción de rayos X (Watson y Crick, 1953). Así se descubrió que en el ADN pueden distinguirse dos niveles, estructuralmente hablando:

a) Estructura primaria

Los ácidos nucleicos son **polinucleótidos**, es decir, moléculas formadas por la unión sucesiva de monómeros llamados nucleótidos. Los nucleótidos presentan tres componentes básicos: una molécula de azúcar pentosa, una molécula de ácido fosfórico y una base orgánica

nitrogenada (véase figura 6). La base nitrogenada se une covalentemente al carbono uno del azúcar pentosa (ribosa o desoxirribosa) mediante un enlace glucosídico, lo que dará lugar a un nucleósido.

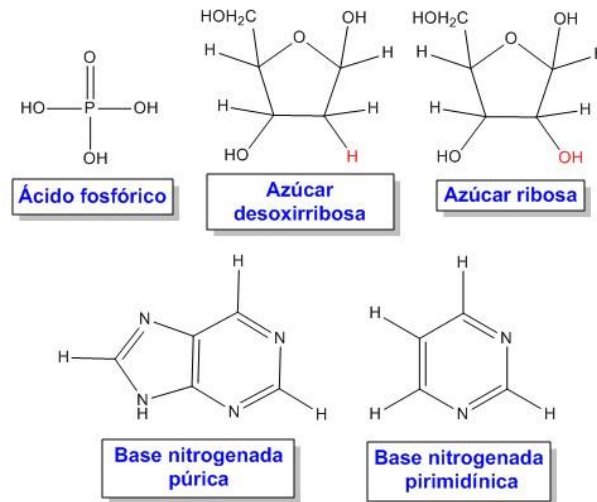


Figura 6. Componentes básicos de los nucleótidos.

Los azúcares de los ácidos nucleicos son responsables de las características estructurales de la molécula; por otra lado, las bases juegan un papel fundamental en la conservación y transmisión de la información genética (Bloomfield y cols., 2000).

En el ADN pueden observarse dos bases nitrogenadas púricas: adenina (A) y guanina (G); y dos bases nitrogenadas pirimidínicas: citosina (C) y timina (T), cuya estructura química puede observarse en la figura 7. El ARN posee las mismas bases a excepción del uracilo (U), que sustituye a la timina (Bloomfield y cols., 2000).

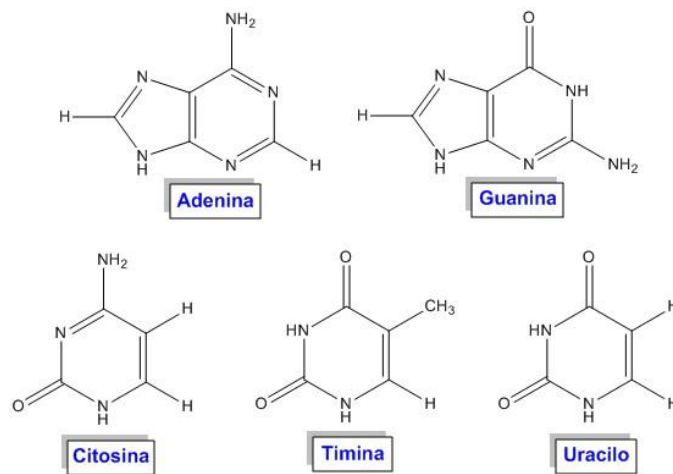


Figura 7. Bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos: Bases púricas (Adenina y guanina) y bases pirimidínicas (Citosina, timina y uracilo).

b) Estructura secundaria

La conexión entre nucleótidos se realiza mediante la unión del hidroxilo del C5' de una unidad y el hidroxilo del C3' de la siguiente, lo que crea un enlace 3'-5'-fosfodiéster (véase figura 8).

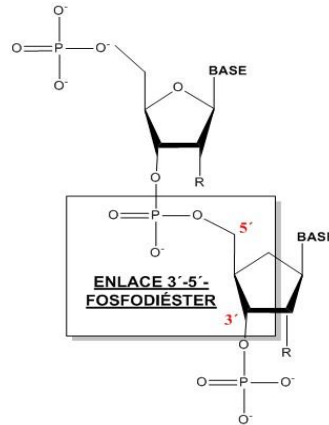


Figura 8. Ácidos nucleicos unidos por enlaces fosfodiéster.

De esta manera, las sucesivas uniones de nucleótidos forman un esqueleto de uniones azúcar-fosfato al que se unen las bases nitrogenadas.

Debido a que los dos esqueletos hidrofílicos de azúcar-fosfato se enrollan en torno al exterior de la hélice, quedan expuestos al ambiente acuoso. Por otro lado, las bases apiladas, relativamente hidrofóbicas, están en el interior de la hélice, donde son más inaccesibles para el agua (Horton y cols., 2008).

Watson y Crick establecieron la estructura del ADN a partir de la cual se asentaron las características de dicha molécula (Watson y Crick, 1953). En este modelo, el ADN es una estructura de doble hélice, formada por dos cadenas polinucleótidas independientes enrolladas una alrededor de la otra, con una orientación 5' a 3' antiparalela u opuesta. En el esqueleto se observan también dos surcos externos, el surco principal y el surco secundario, como puede apreciarse en la figura 9.

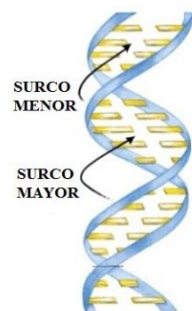


Figura 9. Estructura del ADN (Nelson y Cox, 2009).

Fundamentalmente, existen dos especies químicas de ácido nucleico, diferenciadas por la naturaleza del azúcar. Estas son el ADN o **ácido desoxirribonucleico**, cuya molécula de pentosa es una D-ribosa, y el ARN o **ácido ribonucleico**, cuya molécula de azúcar consiste en una 2-desoxirribosa.

3.2.2. Tipos de enlace en el ADN

La estabilización de la estructura de los ácidos nucleicos se ve fundamentada en la existencia de las siguientes interacciones: (i) puentes de hidrógeno entre los pares de bases de ambas hebras; (ii) interacciones electrostáticas, y (iii) interacciones de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas de apilamiento. Algunas de ellas pueden observarse en la figura 10.

Los puentes de hidrógeno y las fuerzas de apilamiento son de gran importancia para la estabilidad y el mantenimiento de la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos, aunque cabe destacar que son fuerzas débiles. No obstante, el ambiente hidrofóbico del interior de la hélice hace que los puentes de hidrógeno entre las bases sean más estables porque están protegidos contra moléculas de agua (Horton y cols., 2008).

Con respecto a la relación estructura-interacción, cabe destacar diversas características:

a) La presencia de cationes o, poliamidas y proteínas, que contienen abundantes residuos básicos de arginina y lisina, neutraliza las fuerzas repulsivas presentes entre los grupos fosfato del esqueleto, que presentan carga negativa, lo que contribuiría a la estabilidad de la estructura de la hélice (Singer y Berg, 1993).

b) La facilidad o dificultad con la que la doble hélice se desnaturaliza depende de su composición de bases. De esta manera, la presencia en el ADN de un alto porcentaje de pares de bases G-C implica una mayor resistencia a la desnaturalización; esto se debe a que las bases guanina y citosina establecen tres puentes de hidrogeno por cada par de bases, frente a los dos puentes de hidrógeno que establecen cada par de bases A-T (Singer y Berg, 1993).

c) Las interacciones hidrofóbicas de apilamiento sitúan paralelamente los planos de los anillos de dos o más bases. De esta forma, el apilamiento de las bases ayuda a minimizar el contacto con el agua (Singer y Berg, 1993).

Por último, cabe destacar que el apilamiento resulta de una combinación de interacciones de Van der Waals y dipolo-dipolo entre las bases.

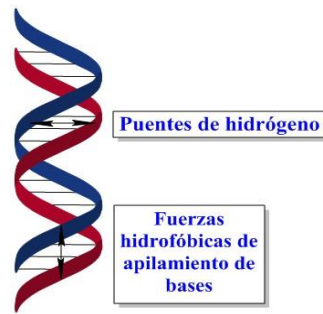


Figura 10. Tipos de interacciones del ADN.

3.2.3. Tipos de conformaciones en el ADN

El ADN es una molécula muy flexible, por lo que es capaz de adoptar diversas conformaciones en función de las condiciones y características del medio; las diferentes estructuras pueden encontrarse favorecidas gracias a modificaciones covalentes de las bases como la metilación y la bromación, o la presencia en el medio de disolventes o moléculas pequeñas tales como colorantes y antibióticos, entre otros (Hicks, 2006).

Así pues, las distintas conformaciones que puede presentar el ADN se agrupan en dos grandes familias: formas canónicas y formas no canónicas.

Formas canónicas. Son estructuras en las que las dos hebras presentan disposición antiparalela. Se agrupan dentro de esta categoría cuatro tipos de ADN: B-ADN, A-ADN, C-ADN y Z-ADN. En la tabla 2, se resumen las características estructurales de cada una de las conformaciones del ADN.

PARÁMETROS	A-ADN	B-ADN	Z-ADN	C-ADN
Sentido hélice	Dextrógira	Dextrógira	Levógira	Dextrógira
Pb por vuelta	11	10	12	9,33
Separación de bases	0,23 nm	0,34 nm	0,37 nm	No descrito
Surco principal	Estrecho, profundo	Ancho, profundo	Plano	Estrecho
Surco secundario	Ancho, superficial	Estrecho, profundo	Estrecho, profundo	Estrecho

Tabla 2. Principales parámetros estructurales de las diferentes conformaciones de ADN (Watson y Crick, 1953. Strekowski y Wilson, 2007).

a) B-ADN. Esta conformación de ADN fue descrita y postulada por Watson y Crick (Watson y Crick, 1953). Constituye la estructura más estable que puede adoptar el ADN en condiciones fisiológicas, por lo que se considera el punto de referencia para estudiar el mecanismo de duplicación del ADN, así como el almacenamiento de la información genética.

La variante B del ADN presenta una doble hélice dextrógira y comprende 10 pares de bases en cada vuelta completa de la doble hélice, siendo la distancia entre las bases de 0,34 nm. Las bases púricas y pirimidínicas de ambas hebras están apiladas en el interior de la doble hélice, situadas a muy corta distancia unas de otras y en conformación anti. El apareamiento de las dos hebras da lugar a la formación de un surco principal y un surco secundario (véase figura 11), que constituyen el lugar de enlace de multitud de ligandos (Watson y Crick, 1953).

b) A-ADN. La forma A predomina en disoluciones anhidras o de alto contenido alcohólico. El A-ADN es una doble hélice dextrógira, más corta y más gruesa. El número de pares de bases por cada vuelta helicoidal es de 11, debido a que la distancia entre bases se acorta a 0,23 nm. El plano de los pares de bases presenta una inclinación de unos 20° con respecto al eje de la hélice; las bases púricas y pirimidínicas conservan la conformación anti. Estos cambios estructurales propician que el surco principal sea más profundo y el surco secundario más superficial, como puede observarse en la figura 11 (Watson y Cols., 2008). Cabe destacar que no se ha atribuido una función biológica a la variante A (Watson y Cols., 2008).

c) C-ADN. La conformación C del ADN consta de una hélice dextrógira y presenta 9,33 pares de bases por vuelta (Aguilera y cols., 1996). El C-ADN se genera en condiciones de humedad relativamente baja (44%-66%), en presencia de iones litio o cuando aumentan las concentraciones de iones sodio. Esta conformación presenta surcos más estrechos que los de la variante B (Strekowski y Wilson, 2007).

d) Z-ADN. El Z-ADN se encuentra estructurado en una doble hélice levógira. Presenta 12 pares de bases por vuelta completa, con una distancia entre bases de 0.37 nm. En la conformación Z, las cadenas de ADN adoptan un plegamiento en zig-zag; en dicho esqueleto, la estructura de las purinas adoptan la conformación syn y las pirimidinas conservan la conformación anti. La variante Z presenta una estructura más delgada y alargada, lo que permite que el surco principal sea apenas perceptible y el surco secundario estrecho y profundo (véase figura 11). Es la forma más deshidratada de todas las canónicas. La función de la variante Z se vincula con la regulación de la expresión génica (Strekowski y Wilson, 2007).

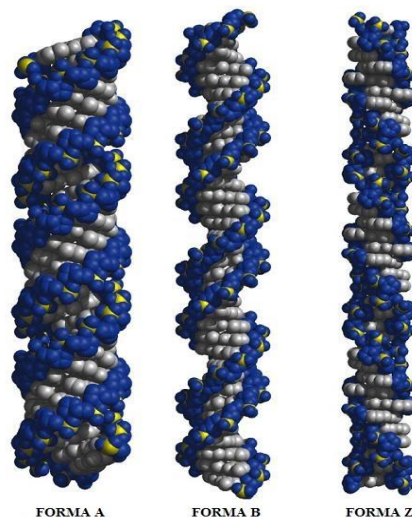


Figura 11. Estructuras de los tipos de ADN (Nelson y Cox, 2007).

Formas no canónicas. Son conformaciones poco comunes del ADN que constan de tres o cuatro hebras y cuyo apareamiento, que no sigue el patrón de Watson y Crick, se denomina Apareamiento de Hoogsteen (Bloomfield y cols., 2000). Estos tipos de apareamientos permiten la formación de ADN de triple hebra o la hebra cuádruple.

3.3. Modos de unión

Las interacciones producidas entre el ADN y los diferentes ligandos tales como antibióticos como las antraciclinas, agentes alquilantes, iones pesados y complejos metálicos, entre otros, se encuentran favorecidas gracias a los diferentes enlaces entre moléculas y fuerzas de interacción que existen entre ambas estructuras (Wolff, 1997).

Como consecuencia de estas interacciones, se pueden producir cambios en la estructura y actividad de los ácidos nucleicos, lo que puede alterar la conservación y la transmisión genética de células sanas, así como producir la destrucción de células cancerosas. Esto último ha propiciado la investigación de los modos de unión entre el ADN y diversos ligandos, ya que las propiedades citotóxicas producidas tras esta unión han permitido el uso de dichos ligandos como agentes quimioterápicos en el tratamientos de distintos tipos de cáncer (Waring, 1981).

La interacción ADN/ligando depende fundamentalmente de la composición, la secuencia y la naturaleza de los ácidos nucleicos (Müller y Crothers, 1975). Así pues, las diferentes características químicas de los ligandos, como polaridad, carga o la existencia de una cadena lateral, también contribuyen a una mayor selectividad hacia regiones concretas de la secuencia (Graves y Velea, 2000).

Según el tipo de interacción, podemos clasificar las uniones ADN/ligando como uniones covalentes y uniones no covalentes. Las uniones no covalentes pueden ser, a su vez, las siguientes: intercalación, unión externa, unión electrostática y unión a los surcos principal y secundario.

a) Intercalación. La intercalación consiste, generalmente, en la introducción de una molécula aromática con anillo plano entre los pares de bases presentes en la doble hélice. El esquema del proceso de intercalación se observa en la figura 12 (Waring, 1981).

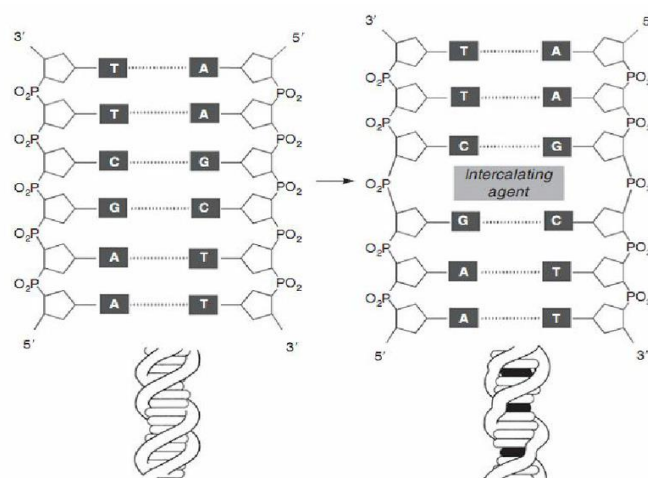


Figura 12. Representación esquemática de la intercalación de un ligando planar genérico entre los pares de bases del ADN (Karimi y cols., 2014).

El proceso se caracteriza por intercalar el ligando entre más de un par de bases en el caso de moléculas simples (Warning, 1981). No obstante, si el ligando es muy voluminoso o se encuentra impedido estéricamente, la molécula puede intercalar hasta seis pares de bases (Müller y Clothiers, 1968). Por tanto, tras la intercalación aumentará la distancia entre pares de bases adyacentes, el esqueleto azúcar-fosfato se distorsiona y la estructura regular de la hélice se modifica.

Este modo de unión ha dado lugar al modelo de “neighbor-exclusion principle” o principio de exclusión de sitios adyacentes (Lerman, 1961), en el que los cambios conformacionales asociados al proceso de intercalación no se limitan sólo al par de bases inmediatamente adyacente al sitio de intercalación, sino que también ocurre en los sitios vecinos más alejados. De esta manera, se produce la inactivación de uno o más sitios adyacentes a los previamente ocupados.

Normalmente, la intercalación tiene lugar en un proceso que comprende dos etapas: primeramente se produce la interacción del ligando con la parte externa de la cadena de ADN, generalmente de tipo electrostático. Posteriormente, el ligando se intercala entre los pares de bases del ADN, produciéndose el cambio conformacional en la doble hebra (Saenger, 1988). Por otro lado, la intercalación en múltiples lugares de la hélice produce un alargamiento y desenrollamiento de la misma que origina, a su vez, variaciones en la viscosidad y en el coeficiente de sedimentación del ADN (Lorente y Fernández, 2008).

Existen tres tipos de intercalación (Neidle y Waring, 1994):

- **Intercalación Clásica.** La presentan generalmente moléculas aromáticas que poseen cargas positivas en el anillo. El ligando está situado entre 2 o más pares de bases del ADN, produciendo la apertura de la doble hebra.

- **Intercalación Ensartada.** Esta intercalación se produce cuando la parte aromática de la molécula se intercala entre las bases de la doble hélice, al mismo tiempo que un sustituyente catiónico se une al surco principal y otro sustituyente interactúa con el surco secundario.

- **Intercalación No Clásica.** La presentan moléculas que poseen varios anillos aromáticos conjugados, que contienen cadenas laterales protonadas o átomos de nitrógeno en el anillo. Este tipo de intercalación va siempre acompañada de la unión al surco.

Las principales consecuencias biológicas tras la intercalación de ligandos en el ADN son la inhibición del crecimiento celular y la muerte celular (Haq, 2002). Por ello, muchos ligandos intercalantes se emplean como antibacterianos, antiparasitarios y antitumorales. Así pues, es necesario conocer que la intercalación del ADN llevada a cabo por diversos ligandos intercalantes puede interferir en numerosos procesos fisiológicos, entre ellos (Neidle, 1979):

I. Inhibición de enzimas dependientes de ADN, lo que impediría la replicación, transcripción y traducción de ADN.

II. Mutación del ADN por desplazamiento del marco de lectura debido a la eliminación o adición de pares de bases.

III. Daños en el ADN.

b) Unión externa. Existen ligandos que forman agregados helicoidales, los cuales se superponen apilados, siendo así capaces de interactuar con la parte externa del esqueleto de los ácidos nucleicos. Este enlace se conoce como unión externa (LePecq y Paoletti, 1967). De esta forma, las cargas negativas de los residuos de fosfato presentes en la estructura de los ácidos nucleicos actúan como plataforma para llevar a cabo este enlace (Bradley y Wolf, 1959). Este modo de unión es muy sensible a los cambios en el medio como la presencia de sales y codisolventes, cambios de pH, y a la conformación que presenta la doble hélice.

c) Unión a los surcos principal y secundario. La estructura de la doble hélice de ADN se caracteriza por la presencia de un surco principal y otro secundario. Las características químicas de las distintas secuencias de ADN son diferentes en cada surco; esto permite que las proteínas y las pequeñas moléculas reconozcan de forma específica una región determinada del ADN (Gao y cols., 1992).

La unión a los surcos requiere ligandos con elevada flexibilidad, ya que la molécula debe ser capaz de seguir el surco del polímero, y la torsión alrededor del eje central de la hélice (Geierstanger y Wemmer, 1995). Además, deben presentar diversas características estructurales como carga positiva y/o grupos aceptores y donadores de hidrógeno.

La unión al surco principal se lleva a cabo fundamentalmente por moléculas de gran tamaño, como proteínas. Por otro lado, moléculas pequeñas interactúan preferentemente con el surco secundario. Los ligandos que se unen al surco secundario pueden ser moléculas naturales como antibióticos y antivirales, así como moléculas sintéticas tales como el DAPI.

Estos ligandos interactúan con la doble hebra de ADN, presentando una mayor selectividad por las secuencias de ADN ricas en segmentos adenina-timina (Neidle, 1997). Los ligandos que interactúan con los surcos son alargados, por lo que dicha molécula posicionada a lo largo de la doble hélice de ADN suele ocupar, como mínimo, entre tres y cinco pares de bases (Kumar y cols., 1993).

Por último, las fuerzas que estabilizan las uniones al surco principal y secundario del ADN son los puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y uniones electrostáticas (Chaires, 2006).

d) Unión electrostática. Es el proceso por el que los ligandos cargados positivamente interactúan con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos presentes en el esqueleto de ADN, que presentan cargas negativas. Esta interacción es relativamente débil, comparada con las descritas anteriormente, y contribuye a la estabilización de la doble hélice de ADN al evitar las fuerzas repulsivas entre los fosfatos (Lorente y Fernández, 2008).

Esta unión es independiente de la composición química y las características conformacionales de los ácidos nucleicos. La atracción entre el ligando y los ácidos nucleicos del ADN aumenta con la disminución de la fuerza iónica. Así pues, la presencia de esta interacción puede evidenciarse realizando estudios cinéticos y/o termodinámicos en función de la fuerza iónica del medio (Record y cols., 1978).

4. Objetivos

Este trabajo de revisión bibliográfica tiene como objetivo principal el estudio de las antraciclinas daunorubicina, doxorubicina y epirubicina (véase figuras 2, 3 y 4) y su interacción con los ácidos nucleicos, así como en el análisis de sus propiedades farmacológicas.

Otros objetivos más específicos de este trabajo son:

- Analizar sus aplicaciones terapéuticas, así como la implicación de la estructura en su capacidad anticancerosa.
- Comprobar las consecuencias toxicológicas tras el uso de antraciclinas.
- Comparar niveles de toxicidad y tipos de cánceres sobre los que actúan cada una de las antraciclinas analizadas.
- Analizar los mecanismos de acción de las antraciclinas que justifican su acción anticancerígena.

- Determinar los diferentes modos de unión de las antraciclinas con los ácidos nucleicos.
- Comparar la energética de la interacción de la doxorubicina, la daunorubicina y la epirubicina con el ADN, en términos de constantes de equilibrio, energías libres de unión y factores entálpicos y entrópicos.

5. Metodología

La búsqueda bibliográfica se ha realizado empleando los recursos electrónicos de la Universidad de Sevilla, concretamente, empleando el buscador “Isi Web of Science”. En esta base de datos se realizaron en primer lugar búsquedas más generales, orientadas a conocer e investigar la estructura, la conformación y las diferentes interacciones de los ácidos nucleicos con los diferentes fármacos seleccionados; así como en comprender y conocer los posibles usos de las antraciclinas y su implicación en el cáncer. Las palabras clave empleadas para dicha búsqueda fueron “nucleic acids”, “DNA”, “structure”, “interaction”, “action”, “binding mode”, “anthracycline”, “antitumor drug” y “cancer”. Las estrategias de búsqueda fueron restringidas a la búsqueda combinada de las palabras clave incluidas en el título del artículo, centrándolas sobre todo en artículos de revisión bibliográfica. Así, se llevaron a cabo las siguientes búsquedas combinadas:

- “Nucleic acids” “and” “structure” (1733 resultados)
- “DNA” “and” “interaction” (13377 resultados)
- “DNA” “and” “action” (1998 resultados)
- “DNA” “and” “binding mode” (521 resultados)
- “Anthracycline” “and” “cáncer” (1392 resultados)
- “Anthracycline” “and” “antitumor drug” (25 resultados)

Posteriormente, se realizaron búsquedas bibliográficas más específicas sobre antraciclinas concretas, profundizando en las distintas interacciones de éstas con los ácidos nucleicos, así como en su eficacia anticancerosa y sus efectos tóxicos. Para realizar la búsqueda, se emplearon las siguientes palabras clave: “doxorubicin”, “daunorubicin”, “4'-epiadriamycin”, “anthracycline”, “intercalation”, “sequence”, “cardiotoxicity” y “toxicity”. Así pues, se realizaron las siguientes búsquedas combinadas:

- “Doxorubicin” “and” “intercalation” (372 resultados)
- “Daunorubicin” “and” “intercalation” (232 resultados)
- “4'-epiadriamycin” “and” “intercalation” (10 resultados)
- “Doxorubicin” “and” “sequence” (3546 resultados)

“Daunorubicin” “and” “sequence” (831 resultados)

“4'-epiadriamycin” “and” “sequence” (12 resultados)

“Anthracycline” “and” “cardiotoxicity” (3556 resultados)

“Anthracycline” “and” “toxicity” (5852 resultados)

De entre todas las referencias obtenidas, este estudio bibliográfico se ha centrado fundamentalmente en los últimos 20 años, y se han tenido en mayor consideración las revisiones bibliográficas sobre la materia.

Por último, la mayor parte de las figuras se han realizado empleando el programa ChemBioDraw; el programa de ajuste Sigma Plot 11.0 fue empleado para la construcción de los gráficos de este trabajo.

6. Resultados y discusión

6.1. Antraciclinas: toxicidad e interacción con el ADN

Como se indicó anteriormente, el ADN es la biomolécula responsable de transmitir y conservar la información genética. Por ello, la interacción de pequeñas moléculas y ligandos con su estructura permite que el ADN sea el principal objetivo en terapia anticancerosa. En particular, el análisis de las antraciclinas como fármacos antineoplásicos ha sido extensamente estudiado. Así, actualmente, se encuentran numerosos trabajos referentes a estos fármacos y a su efectividad anticancerígena (Aubel-Sadron y Londos-Gagliardi, 1984. Rabbani y cols., 2004. Hortogabyi G, 1997).

En concreto, este estudio se centra en el análisis específico de la eficacia anticancerosa y la toxicidad, así como su interacción con el ADN, de tres tipos de antraciclinas: doxorubicina, daunorubicina y epirubicina.

6.2. Toxicidad de doxorubicina, daunorubicina y epirubicina

Las antraciclinas son fármacos con elevada efectividad anticancerosa; sin embargo, su administración produce diversos efectos tóxicos en el paciente (Hortogabyi G, 1997); así pues, algunas de estas reacciones adversas son:

- Mielosupresión, principalmente neutropenia, que suele producirse tras la administración de dosis convencionales de fármaco.
- Estomatitis, que se desarrolla entre el quinto y el decimotercer día de tratamiento.
- Náuseas y vómitos moderados, que pueden ser reducidos si se administran previamente fármacos antieméticos.

- Alopecia reversible.
- Irritación cutánea, así como daño cutáneo en aquellas zonas de la piel expuestas a radioterapia.
- Lesiones graves de tejidos por extravasación.

Sin embargo, el efecto tóxico más significativo y perjudicial producido por las antraciclinas es la **cardiotoxicidad**, un efecto secundario que limita su uso. La cardiotoxicidad inducida por las antraciclinas se manifiesta mediante arritmias e hipotensión e intracelularmente puede causar degeneración vacuolar, desorganización miofibrilar, aumento del número de lisosomas y apoptosis y necrosis de los cardiomiocitos (Menna y cols., 2007). Así, en la figura 13, se observan dos imágenes comparativas de tejidos cardiacos antes y después de la administración de antraciclinas.

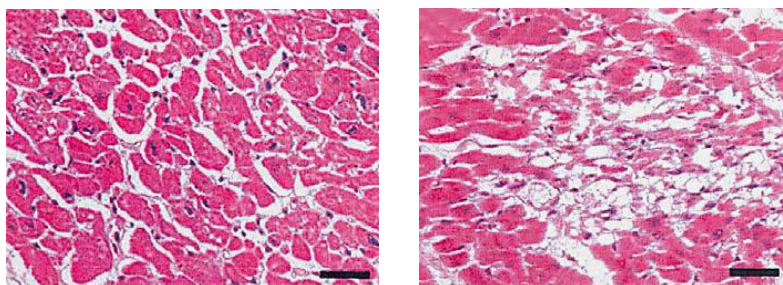


Figura 13. Tejidos cardiacos antes y después de la administración de antraciclinas. En la imagen izquierda, se observa un miocardio normal sin ningún cambio en la matriz extracelular y miocitos intactos. En la imagen derecha se observa un tejido cardiaco con pérdida de miocitos, desorganización de la matriz y fibrosis difusa (Chatterjee y cols., 2010).

Las antraciclinas pueden producir cardiotoxicidad aguda o precoz (en la primera semana de tratamiento), y tardía o crónica (años después de finalizar el tratamiento). La cardiotoxicidad aguda, que ocurre en menos del 1% de los pacientes, no depende de la dosis y produce miocarditis y pericarditis. La cardiotoxicidad aguda, una condición benigna y reversible que desaparece tras 1-2 dosis, es un efecto muy poco habitual y no es motivo de interrupción del tratamiento. Más común es la cardiotoxicidad tardía, cuya manifestación depende de la dosis y produce un daño progresivo del endomiocardio que puede derivar en cardiomiopatía e insuficiencia cardiaca congestiva décadas después de finalizar el tratamiento. Las principales diferencias entre los dos tipos de cardiotoxicidad se resumen en la tabla 3 (Singal y Iliskovic, 1998).

TIPO DE CARDIOTOXICIDAD	AGUDA/PRECOZ	TARDÍA/CRÓNICA
¿Cuándo aparece?	1ª semana de tto	Años después de finalizar el tto
Causas	Formación de radicales libres y ROS	Formación de radicales libres y ROS
Efectos	Miocarditis y pericarditis	Cardiomiopatías e ICC

Tabla 3. Tipos de cardiotoxicidad asociadas al uso de las antraciclinas (Singal y Iliskovic, 1998. Volkova y Russell, 2011).

Existen una gran variedad de factores de riesgo vinculados al desarrollo de cardiotoxicidad por el tratamiento con las antraciclinas, como son edades extremas de la vida (menores de 15 años y mayores de 65), hipertensión, hiperlipidemia, diabetes, problemas metabólicos, así como problemas vasculares o patologías cardíacas previas (Reinbolt y cols., 2016). No obstante, el factor de riesgo principal es la dosis total acumulada, que varía para cada tipo de antraciclina (Pérez y cols., 2009).

No se conoce exactamente el mecanismo por el que se produce la cardiotoxicidad por las antraciclinas, pero parece estar relacionado con la producción de radicales libres y ROS, que se forman tras el proceso de metabolización del fármaco (Volkova y Russell, 2011). La mayoría de los tejidos contienen enzimas que detoxifican los radicales libres y previenen o limitan el daño. Sin embargo, el tejido del miocardio es deficiente en estas enzimas y, por lo tanto, susceptible de sufrir estrés oxidativo (Dorr, 1996). La cardiotoxicidad también puede surgir tras el proceso de metabolización de la antraciclina, en el que se reduce el grupo carbonilo del carbono 13 a un grupo alcohol, dando lugar a diversos metabolitos como doxorubicinol, epirubicinol o daunorubicinol, que son potentes inhibidores de la ATPasa que actúan inhibiendo la captación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático, lo que impide la relajación o contracción del tejido cardíaco (Reinbolt y cols., 2016).

6.2.1. Doxorubicina

El daño cardíaco producido por la doxorubicina se desarrolla normalmente a los dos meses de la última dosis, pero en algunos casos la cardiomiopatía puede desarrollarse entre seis meses y años después de haber recibido la última dosis (Henderson y Frei, 1980).

La incidencia y severidad de la patología cardíaca está estrechamente relacionada con la dosis total acumulada (Von Hoff y cols., 1979), que en el caso de la doxorubicina se limita a un valor de 450-500 mg/m² (Menna y cols., 2007).

El 2% de los pacientes que reciben la doxorubicina desarrollan síntomas cardíacos debido a ICC. Sin embargo, la incidencia aumenta a 3,5% de pacientes si se aumenta la dosis total

acumulada a 400 mg/m²; así como a un 7% y 15% de pacientes si se administran dosis acumuladas de 550 mg/m² y 700mg/m², respectivamente (véase figura 14). Por tanto, se concluye que todos los pacientes tratados con anterioridad por la doxorubicina a dosis moderadas probablemente sufrirán cardiomiopatías en el futuro (Henderson y Frei, 1980).

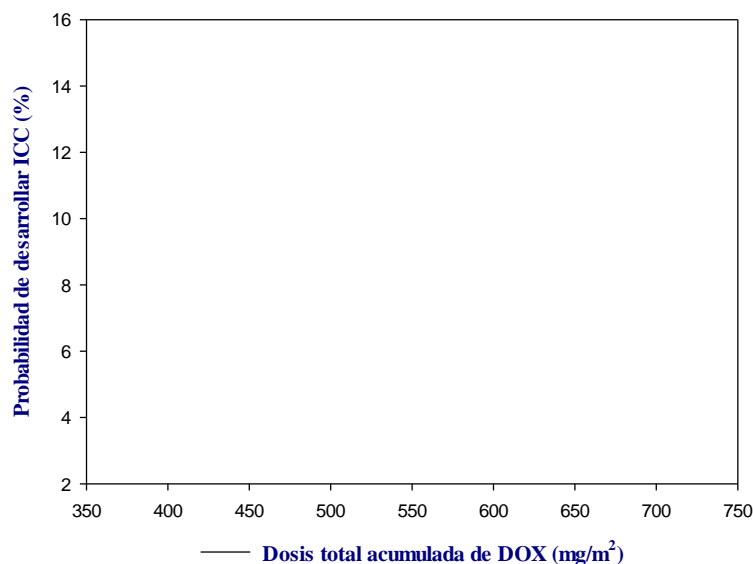


Figura 14. Probabilidad de desarrollar ICC en función de la dosis acumulada de fármaco (adaptada de Henderson y Frei, 1980).

Por último, cabe destacar que los efectos cardiotóxicos producidos por la doxorubicina son más frecuentes en jóvenes, ya que más de la mitad de los niños con leucemia linfoblástica aguda curados tras recibir la doxorubicina (a una dosis acumulada limitada a 500 mg/m²) presentaron anomalía en el grosor y en la contractilidad de la pared ventricular, así como una reducción del volumen cardíaco, tras una media de 6,4 años después de finalizar el tratamiento (Doroshov, 1991).

6.2.2. Daunorubicina

A pesar de su eficacia anticancerosa, el uso de la daunorubicina se encuentra limitado debido al desarrollo de anomalías cardíacas que aparecen tras su administración. Por ello, la dosis total acumulada para la daunorubicina se limita a 650 mg/m², ya que la incidencia de patologías cardíacas aumenta si se administran dosis totales acumuladas de la daunorubicina superiores a este valor (Aubel-Sadron y Londos-Gagliardi, 1984).

La incidencia del daño cardíaco parece depender de dos factores: la edad del paciente y la dosis administrada. En los niños, la toxicidad cardíaca secundaria a la daunorubicina parece ser dependiente de la dosis, mientras que en adultos no parece estar relacionada con la dosis y aparece de manera abrupta. Por tanto, se prefiere no administrar la daunorubicina a pacientes de más de 40 años, incluso en ausencia de síntomas cardíacos (Marmont y cols., 1969). Este hecho puede

observarse en el siguiente estudio, en el que se describe la cardiotoxicidad desarrollada en 13 pacientes adultos a los que se administró una terapia combinada de la daunorubicina con otros fármacos antineoplásicos. La dosis total de la daunorubicina no supero en ningún caso los 2-5 mg/kg. Los resultados obtenidos en este estudio fueron los siguientes, los cuales además se resumen en la tabla 4: (Marmont y cols., 1969):

- De cuatro pacientes mayores de 35 años, tres murieron por los efectos tóxicos cardíacos y sólo uno tuvo una completa remisión de la enfermedad.
- De nueve pacientes menores de 35 años, ocho tuvieron una remisión completa de la enfermedad y uno murió por cardiotoxicidad tras reinducción con el tratamiento combinado.

ENFERMEDAD	EDAD	CASOS	COMPLETA REMISIÓN	CARDIOTOXICIDAD FATAL
Leucemia linfoblástica aguda	<35	9	8	1
Leucemia linfoblástica aguda	>35	2	1	1
Leucemia mieloblástica aguda	>35	2	-	2

Tabla 4. Resumen de los resultados de cardiotoxicidad obtenidos en un estudio tras la administración de la daunorubicina (Marmont y cols., 1969).

De esta manera, la cardiotoxicidad secundaria a la administración de la daunorubicina es común y ocurre a dosis relativamente bajas. Sin embargo, se observa que esta condición surge con mucha más frecuencia en adultos de mediana edad y ancianos, por lo que debido a su gran eficacia antileucémica se prefiere reservar sobre todo su administración a niños y jóvenes.

Por último, parece ser que la administración de dosis intermitentes en lugar de dosis diarias produce menos efectos tóxicos cardíacos, ya que se ha observado que tras la administración de la daunorubicina, los niveles de fármaco en sangre y plasma disminuyen rápidamente, así como la excreción urinaria y fecal del fármaco son bastante bajas. Esto sugiere que la daunorubicina se fija rápidamente a los tejidos corporales. Por lo tanto, la acumulación de fármaco y los consecuentes efectos secundarios son más probable que ocurran con un programa de dosis diaria (Marmont y cols. 1969).

6.2.3. Epirubicina

La epirubicina presenta una eficacia antitumoral prácticamente superponible a la doxorubicina, aunque su toxicidad cardíaca es menor (González y cols., 2007).

Esto se debe a la menor formación intramolecular de ROS y metabolitos secundarios tales como epirubicinol. Además, la diferencia estructural de EPI con respecto a otras antraciclina (epimerización del grupo hidroxilo de daunosamina) facilita la glucuronización y posterior eliminación de EPI (Menna y cols., 2007).

Por último, la incidencia de cardiopatías tras la administración de EPI aumenta si se exceden dosis acumuladas de 850-900 mg/m² del fármaco, una dosis a la que EPI es aproximadamente 1,3 veces más activa que DOX (Menna y cols., 2007).

6.3. Interacción antraciclina/ADN: modos de unión, energética de interacción y daño inducido en la doble hebra

Los fármacos antraciclínicos presentan actividad antitumoral a distintos niveles. El primer modo de acción consiste en la intercalación de la antraciclina entre los pares de bases adyacentes del ADN, lo que produce la deformación de la molécula de ADN (Hortogabyi G, 1997).

Posteriormente, la antraciclina interacciona con la TOP-II, formando un complejo altamente estable que favorece la rotura de la doble hebra de ADN (Hortogabyi G, 1997). (Véase apartado 6.3.1.).

Por último, la reducción enzimática del fármaco da lugar a la formación de diferentes radicales libres que también se relacionan con la actividad antineoplásica de las antraciclina (Hortogabyi G, 1997) (Véase apartado 6.3.2.).

Las antraciclina son fármacos intercalantes del ADN que representan la mayor clase de antibióticos antitumorales. El complejo resultante (Antraciclina/ADN) es consecuencia de la introducción de la estructura plana de tetraciclina, conocida como cromóforo, entre los pares de bases adyacentes del ADN. Esta interacción está favorecida por las interacciones electrostáticas entre los grupos fosfato del ADN y la carga positiva del grupo amino del azúcar. El sitio de intercalación no sólo depende de la estructura planar del cromóforo, sino también de una gran variedad de factores intrínsecos (estéricos y electrónicos). Sin embargo, la actividad citotóxica de las antraciclina no está simplemente asociada con su afinidad por el ADN, sino también y de forma más acusada por el modo de unión que presenta en su interacción con el ADN (Beretta y Zunino, 2007).

Las principales características de las antraciclina estudiadas se resumen en la tabla 5.

Parámetros	Doxorubicina	Daunorubicina	Epirubicina
Especificidad de unión con el ADN	Pares de bases GC y AT adyacentes	Pares de bases GC adyacentes y un par de bases AT	Pares de bases GC y TG
Modo de unión	Intercalación, unión al surco menor, unión externa y unión electrostática	Intercalación, unión externa de carácter electrostático y unión electrostática	Intercalación y unión al surco menor
Tipo de interacción	Interacciones hidrofóbicas de apilamiento y puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas de apilamiento y puentes de hidrógeno	Fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas de apilamiento y puentes de hidrógeno
Cambio conformacional	Sí	Sí	No
Tipo de cambio conformacional	Z-ADN	Z-ADN	No descrito

Tabla 5. Resumen de las características de DOX, DNR y EPI (Pérez-Arnaiz y cols., 2014. Rabbani y cols., 2004. Chaires y cols., 1987. Aubel-Sadron y Londos-Gagliardi, 1984. Lin y cols., 2010. Barone y cols., 2012. Trieb y cols., 2012. Langlois d'Estaintot y cols., 1992).

a) Doxorubicina/ADN

La DOX interacciona con el ADN formando dos tipos diferentes de complejos DOX-ADN: PD_I y PD_{II}, cuyo mecanismo de reacción es el siguiente (Pérez-Arnaiz y cols., 2014):



PD_I es un complejo bifuncional cuya formación sigue un mecanismo en dos pasos sucesivos (Pérez-Arnaiz y cols., 2014).

- Una primera etapa cinéticamente rápida caracterizada por la unión del fármaco a las regiones adenina-timina (AT) del surco, en la que el anillo de daunosamina se une al surco menor del ADN mediante puentes de hidrógeno entre el grupo amino de daunosamina y el grupo donador de electrones del surco (Pérez-Arnaiz y cols., 2014). Además, se producen uniones electrostáticas entre la carga positiva de DOX y los grupos fosfatos del ADN (Rabbani y cols., 2004).

- Una segunda etapa cinéticamente lenta, en la que la estructura cromófora plana se intercala entre los pares de bases guanina-citosina (GC) del ADN (Pérez-Arnaiz y cols., 2014).

Posteriormente, se forma PD_{II}, complejo formado por unión externa al ADN y a expensas de PD_I cuando todos los sitios intercalativos están ocupados. Por ello, la liberación parcial en PD_I de moléculas de fármaco intercaladas entre los pares de bases favorece la formación de PD_{II} (Pérez-Arnaiz y cols., 2014).

La formación de ambos complejos puede observarse en la figura 15 y dependerá de la relación de concentración fármaco/ADN, ya que PD_I se forma cuando la $C_{\text{DOX}} \ll C_{\text{ADN}}$, mientras que PD_{II} se forma cuando la $C_{\text{DOX}} \gg C_{\text{ADN}}$ (Pérez-Arnaiz y cols., 2014).

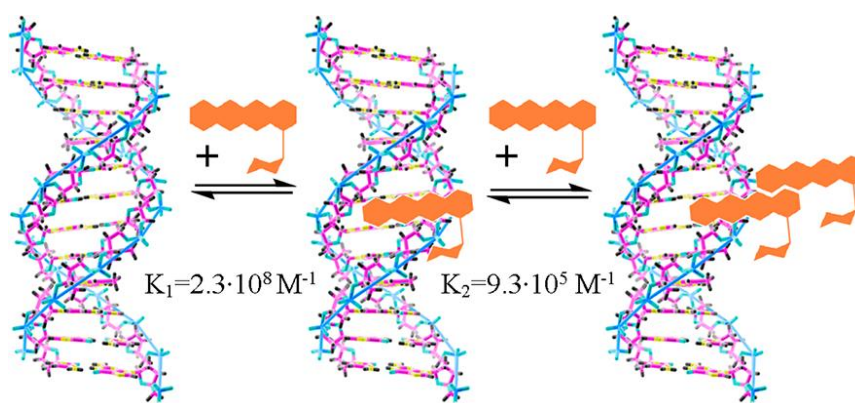


Figura 15. Reacción de formación de los complejos PD_I y PD_{II} (Pérez-Arnaiz y cols., 2014).

Para que tenga lugar la interacción, es imprescindible una adecuada composición de los pares de bases, ya que DOX muestra una fuerte especificidad estructural en su interacción con el ADN (Chaires y cols., 1987). De esta manera, la unión de DOX al surco tiene lugar preferentemente con secuencias ricas en adenina-timina, mientras que el sitio de intercalación debe presentar preferentemente pares de bases guanina-citosina adyacentes. El sitio de intercalación óptimo puede abarcar más de una secuencia de tripletes y las secuencias más energéticamente favorables son aquellas con tripletes de 5'-TCG y 5'-ACG (Chaires y cols., 1990). Además, DOX presenta una mayor afinidad por los polinucleótidos que presentan secuencias alternas de purinas y pirimidinas en cada hebra (Aubel-Sadron y Londos-Gagliardi, 1984). Por otra parte, también es importante destacar la interacción específica mediante puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del C14 de DOX con los oxígenos de los grupos fosfatos de la cadena de ADN (Zunino y cols., 1979).

La intercalación se produce de forma casi perpendicular al eje de la doble hélice (Chaires y cols., 1987). Tras el proceso intercalativo, los pares de bases del ADN adyacentes al sitio de

intercalación sufren un giro de la hélice. Estas desviaciones de la planaridad se deben a la necesidad de mantener interacciones de apilamiento entre el resto intercalativo del fármaco y los pares de bases que lo rodean (Frederick y cols., 1990). En la figura 16, se observa una comparativa de las dos posibles orientaciones (paralela o perpendicular) de un agente intercalante entre los pares de bases del ADN. Cuando el eje de la superficie de un fármaco es paralelo al eje del par de bases adyacentes al sitio de intercalación, ese par de bases se doblan para maximizar el contacto mediante fuerzas de van der Waals. Sin embargo, cuando el eje de la superficie del fármaco es casi perpendicular con respecto al eje de un par de bases adyacentes, ese par de bases gira su hélice para maximizar el contacto fármaco-ADN (Frederick y cols., 1990).

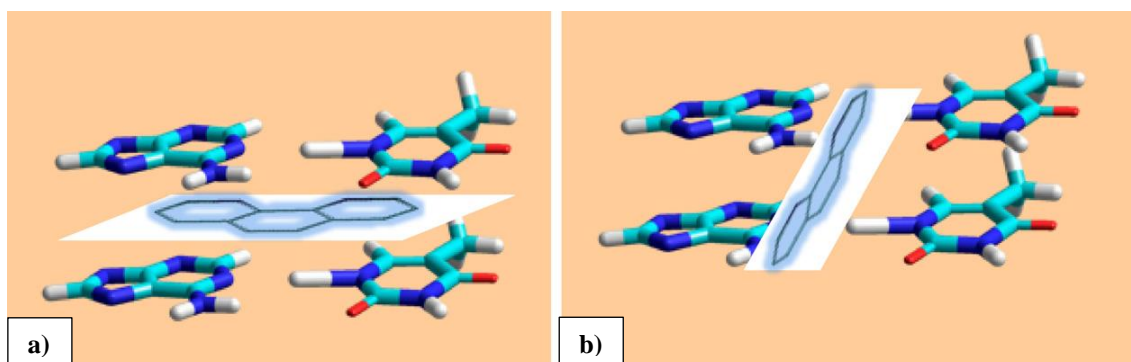


Figura 16. Imagen que permite visualizar las dos posibles orientaciones: a) paralela y b) perpendicular de un agente intercalante entre los pares de bases del ADN (Grueso y cols., 2011).

El complejo DOX-ADN es estabilizado por interacciones de apilamiento de naturaleza hidrofóbica, así como por la formación de puentes de hidrógeno entre los pares de bases de la doble hebra (Rabbani y cols., 2004).

La estabilidad de la interacción puede valorarse a partir de las constantes termodinámicas correspondientes a la formación de PD_I y PD_{II} , recogidas en la tabla 6, las cuales fueron obtenidas a $T = 298\text{ K}$ y $\text{pH} = 7.0$. Como puede observarse en la tabla, la constante de equilibrio correspondiente a la formación de PD_I es dos y tres veces superior que para otros fármacos intercaladores, lo que revela una interacción más compleja. No obstante, las constantes de equilibrio de ambos complejos revelan que los procesos son muy favorables termodinámicamente. Por otra parte, también se observa que la formación de PD_I es poco exotérmica y altamente entrópica, mientras que otros complejos intercalativos presentan una contribución entrópica bastante moderada. Estos resultados apoyan que la formación de PD_I está relacionada no sólo con la naturaleza intercalativa del fármaco, sino también con su capacidad de unión al surco. Para finalizar, también se observa que PD_{II} requiere gran contribución entrópica para llevar a cabo la formación del complejo, lo que se consigue gracias a la liberación de moléculas de agua del mismo.

COMPLEJO	K(M ⁻¹)	ΔG(KJ/mol)	ΔH(KJ/mol)	ΔS(J/mol·K)
PD _I	2,3·10 ⁸	-47,7	-4,8	144
PD _{II}	9,3·10 ⁵	-34,1	-2,69	105,2

Tabla 6. Parámetros termodinámicos determinados tras la unión de DOX al ADN (Pérez-Arnaiz y cols., 2014).

La unión de DOX al ADN incrementa la longitud de la cadena y disminuye la flexibilidad de la doble hélice. Usando métodos viscométricos se ha demostrado que la interacción de DOX con el ADN induce rigidez, torsión y elongación del ADN (Aubel-Sadron y Londos-Gagliardi, 1984), lo que implica que la conformación de la doble hebra cambie de la forma B a la forma Z tras la formación del complejo.

Por último, la unión de DOX al ADN aumenta la T_m de la doble hélice 30°C más con respecto a la temperatura de fusión natural del ADN, ya que se alcanza la saturación de los sitios de unión (Chaires y cols., 1982). El incremento del valor de T_m del ADN (en torno a 100°C) es debido a la estabilización de la doble hélice como consecuencia de la intercalación del fármaco, lo que podría explicar la inhibición de la síntesis del ADN, así como los efectos anticancerígenos de estos fármacos.

b) Daunorubicina/ADN

El mecanismo de reacción para la formación del complejo DNR-ADN consta de 3 pasos sucesivos (Chaires y cols., 1985):



La interpretación del mecanismo cinético en términos moleculares es el siguiente (Chaires y cols., 1985):

- Un primer paso, cinéticamente rápido, representado por la formación de un complejo DNR-ADN débilmente unido mediante unión externa de carácter electrostático. Esta unión mantiene al fármaco relativamente próximo al ADN con la finalidad de producir las alteraciones necesarias para la posterior intercalación (Chaires y cols., 1985). Por otra parte, el grupo amino de daunosamina se carga positivamente a pH fisiológico, lo que también contribuye favorablemente a la formación del complejo mediante uniones electrostáticas con los grupos fosfato del ADN (Lin y cols., 2010).

- El segundo paso cinéticamente lento representa la intercalación perpendicular de la estructura cromófora de DNR entre los pares de bases de la cadena de ADN (Chaires y cols., 1985).
- La última etapa se ajusta a un reordenamiento conformacional del fármaco intercalado o de la molécula de ADN (Chaires y cols., 1985).

Al igual que ocurre en la formación del complejo DOX-ADN, la doble hélice debe presentar una composición específica de pares de bases para que se lleve a cabo la interacción. Así, el proceso intercalativo tiene lugar preferentemente entre pares de bases guanina-citosina presentes en secuencias de tripletes compuestas por dos pares de bases GC adyacentes y un par de bases AT (GC-GC-AT) (Barone y cols., 2012). De esta manera, se observa que DNR se une al ADN más fuertemente cuando éste presenta mayor proporción de regiones con pares de bases GC que con pares de bases AT; por tanto, la unión presenta una clara especificidad. Así pues, DNR también presenta una mayor afinidad por regiones alternas de purinas y pirimidinas, y la intercalación de DNR entre estas secuencias alternas no es perturbada por los grupos voluminosos en posición 5 del anillo de pirimidina, que proyectan hacia el interior del surco principal de la doble hélice (Zunino y cols., 1979).

El proceso de intercalación tiene lugar de manera casi perpendicular al eje de la cadena de ADN y produce un giro helicoidal de los pares de bases adyacentes al sitio de intercalación. Sin embargo, la orientación del fármaco con relación a la doble hélice de ADN podría cambiar al adicionar o eliminar sustituyentes a la estructura (Frederick y cols., 1990). La orientación del proceso intercalativo es similar a la que figura en la imagen 16 b).

El complejo DNR-ADN es estabilizado por el apilamiento de las bases de la doble hélice por encima y por debajo del sitio de intercalación, así como por puentes de hidrógeno entre los pares de bases del ADN (Trieb y cols., 2012).

La estabilidad de la interacción DNR-ADN se constata a partir de las constantes termodinámicas recogidas en la tabla 7, las cuales fueron obtenidas usando un tampón buffer BPRS, $T = 298 \text{ K}$ y $\text{pH} = 7.0$. Como puede observarse en la tabla, la constante de equilibrio y los valores de energía libre, ΔG , exponen que el proceso de interacción DNR-ADN está muy favorecido termodinámicamente. Por otra parte, también se observa que la formación del complejo es altamente exotérmica y poco entrópica. Estos resultados se relacionan con las fuertes interacciones hidrofóbicas que participan en el proceso de complejación. Sin embargo, aunque la interacción hidrofóbica es la principal fuerza que contribuye al mecanismo de unión, se ha comprobado que la interacción electrostática y los puentes de hidrógeno también están implicados, aunque en menor medida, en el proceso de interacción fármaco-ADN (Lin y cols., 2010).

COMPLEJO	K(M ⁻¹)	ΔG (KJ/mol)	ΔH(KJ/mol)	ΔS(J/mol·K)
DNR-ADN	1,13·10 ⁶	-34,58	-56,52	-74,15

Tabla 7. Parámetros termodinámicos correspondientes a la formación del complejo DNR-ADN (Lin y cols., 2010).

Por último, se produce un cambio conformacional en el ADN (de la forma B a la forma Z) como consecuencia de la intercalación, lo que conlleva una disminución de la flexibilidad del esqueleto de ADN, así como la deformación de los surcos y la formación de nuevos puentes de hidrógeno (Trieb y cols., 2012).

c) Epirubicina/ADN

EPI interacciona con el ADN tras intercalar la estructura cromófora entre los pares de bases CG y TG, principalmente. Sin embargo, parece ser que la presencia de secuencias con pares de bases CG y TG adyacentes a adenina o timina favorece la intercalación del antibiótico. Así, la interacción entre el ADN y EPI se produce de manera más eficaz cuando una secuencia AT es adyacente al sitio de intercalación. Tras el proceso intercalativo, el anillo D sobresale por el surco mayor, los anillos C y B llevan a cabo interacciones de apilamiento perpendiculares a las bases y el anillo A se sitúa en el surco menor. El aminoazúcar, unido al anillo A, se localiza también en una sección del surco menor (Langlois d'Estaintot y cols., 1992).

El complejo se estabiliza principalmente por fuerzas de van der Waals entre la estructura cromófora aromática y las bases del ADN y por interacciones hidrofóbicas de apilamiento, así como por puentes de hidrógeno formados entre el antibiótico y la doble hélice (Langlois d'Estaintot y cols., 1992).

Los parámetros termodinámicos para la interacción EPI-ADN se recogen en la tabla 8, los cuales fueron calculados a T = 293 K y pH = 7.0. Como se observa en la tabla, los valores de la constante de equilibrio, K, y la energía libre del proceso, ΔG, muestran un proceso intercalativo favorecido termodinámicamente. Además, el proceso de interacción es muy exotérmico pero poco entrópico, probablemente debido a la estabilidad adicional que proporcionan los puentes de hidrógeno formados durante el proceso de complejación (Hajian y cols., 2012).

COMPLEJO	K(M ⁻¹)	ΔG(KJ/mol)	ΔH(KJ/mol)	ΔS(J/mol·K)
EPI-ADN	3,8·10 ⁵	-31,29	-57,07	-87,96

Tabla 8. Parámetros termodinámicos determinados tras la formación del complejo EPI-ADN (Hajian y cols., 2012).

En este caso, tras la intercalación de EPI en la doble hélice, no se observa cambio conformacional en la estructura de ADN, ya que en el sitio de intercalación el par de bases sufre un giro helicoidal prácticamente imperceptible a pesar de la distorsión local causada por el fármaco (Langlois d'Estaintot y cols., 1992).

Por tanto, de forma resumida, se observa que los procesos intercalativos llevados a cabo por cada una de las antraciclinas estudiadas se encuentran muy favorecidos termodinámicamente, siendo la interacción de la doxorubicina con el ADN la que resulta termodinámicamente más favorable. Sin embargo, los factores entálpicos y entrópicos de cada fármaco revelan que el proceso intercalativo está controlado por diferentes fuerzas de estabilización. Así, para la interacción DOX-ADN, los valores altamente entrópicos y moderadamente exotérmicos se relacionan además con la capacidad de unión del fármaco al surco. Sin embargo, la formación del complejo DNR-ADN es altamente exotérmica y poco entrópica, lo que se relaciona con las fuertes interacciones hidrofóbicas que tienen lugar en el proceso intercalativo. Por último, y al igual que ocurre en la formación del complejo DNR-ADN, tras la unión de epirubicina al ADN también se observan valores muy exotérmicos pero débilmente entrópicos, lo que se vincula con la formación de puentes de hidrógeno durante el proceso de intercalación.

Por otra parte, la unión de las distintas antraciclinas al ADN puede inducir cambio conformacional en el mismo. Así pues, la doble hebra sufre un cambio en su conformación (de la forma B a la forma Z) tras la intercalación de DOX y DNR entre los pares de bases del ADN, lo que disminuye la flexibilidad y la longitud de la cadena. No obstante, tras la intercalación de EPI en el ADN no se observa cambio conformacional de la estructura de la cadena, ya que el par de bases entre los cuales se intercala el fármaco apenas sufre giro helicoidal.

6.3.1. Daño al ADN por interacción de antraciclinas con TOP-II

Tras la intercalación, tiene lugar el principal mecanismo citotóxico y antitumoral de las antraciclinas, que se atribuye a la interacción del fármaco con la TOP-II. De esta manera, se forma un complejo escindible ADN/antraciclina-topoisomera, en el que la actividad de TOP-II se inhibe y la hebra de ADN se rompe (Beretta y Zunino, 2007).

El efecto de las antraciclinas sobre la doble hebra depende de la concentración existente de fármaco en el medio. Así, las antraciclinas a baja concentración pueden inhibir la actividad catalítica de la enzima TOP II sin estimular la rotura de ADN, y a alta concentración estimular la escisión de la cadena (Beretta y Zunino, 2007).

La unión de la antraciclina a la TOP-II es específica. La especificidad del fármaco por la TOP-II se debe principalmente a la base anterior (-1) y posterior (+1) al sitio de anclaje de la enzima. Así, los residuos localizados en el sitio de anclaje -1 serán preferentemente purinas, mientras que en +1 serán purinas y pirimidinas (véase figura 17).

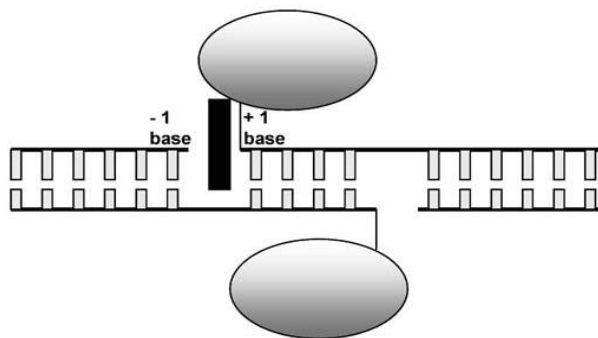


Figura 17. Modelo esquemático del complejo ADN-antraciclina-enzima (Beretta y Zunino, 2007).

Generalmente, los fármacos que presentan una alta afinidad por el sitio de anclaje -1 poseen una débil afinidad por el sitio de anclaje +1, lo cual indica que el reconocimiento del ADN por el fármaco se lleva a cabo por un lado u otro de la molécula, y por ello, el fármaco se puede localizar en la parte superior o inferior del enlace fosfodiéster del ADN (Beretta y Zunino, 2007).

6.3.2. Daño en el ADN inducido por la formación de radicales libres

La citotoxicidad de las antraciclinas debido a la producción de radicales libres es compleja y sólo se detecta si los niveles de fármaco son elevados.

El estrés oxidativo inducido por las antraciclinas se produce cuando el grupo quinona del fármaco se reduce a hidroquinona, y se producen radicales libres semiquinonas que a su vez dan lugar a especies reactivas de oxígeno, como peróxido de hidrógeno o radicales hidroxilo. Estas ROS originan daño en el ADN y peroxidación lipídica con formación de MDA; este compuesto produce una gran inserción y deleción en las bases de ADN. En células de nueva formación, tras la administración de antraciclinas, se producen aductos MDA-ADN, que originan una parada del ciclo celular (Beretta y Zunino, 2007). En la figura 18 se observa un esquema de la formación de radicales libres.

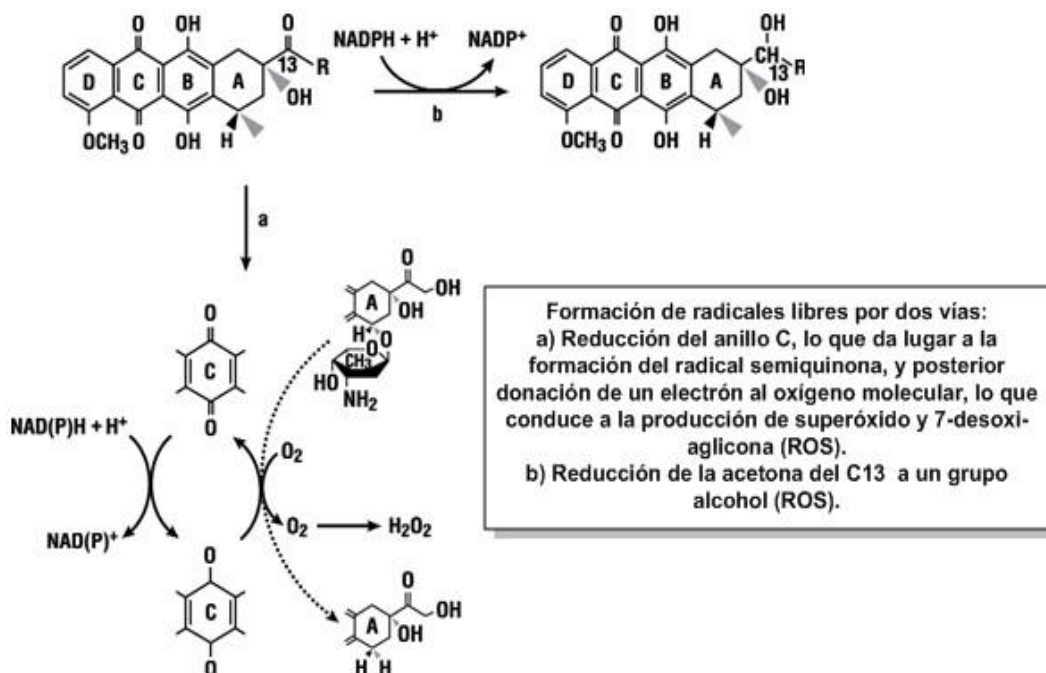


Figura 18. Formación de radicales libres por antraciclina (Kruger y Wojnowski, 2006).

Por otro lado, los aniones superóxido y peróxido de hidrógeno podrían estar implicados en la muerte celular, ya que la apoptosis activada por daño al ADN, puede estar influenciada por la formación de ROS y por el daño oxidativo a componentes mitocondriales.

7. Conclusiones

Con esta revisión bibliográfica se ha reafirmado el papel antitumoral de las antraciclina y se han justificado las aplicaciones terapéuticas de los diferentes fármacos en función de sus estructuras.

Estos antibióticos antitumorales presentan diferentes aplicaciones terapéuticas; así, la doxorubicina es un fármaco potencialmente eficaz frente a tumores sólidos, mientras que la daunorubicina presenta gran eficacia frente a tumores hematológicos. Sin embargo, se ha comprobado que epirubicina sólo presenta eficacia frente a determinado tipo de cánceres.

Por otra parte, y a pesar su eficacia anticancerosa, se ha comprobado que el uso de estos fármacos se encuentra muy limitado debido a los diversos efectos tóxicos que producen en el paciente, siendo la cardiotoxicidad la reacción adversa más perjudicial. Además, se ha corroborado que la severidad del daño cardíaco está relacionada con la dosis total acumulada, la cual es diferente para cada antraciclina. Para la doxorubicina, la dosis total acumulada se limita a 450-500 mg/m², mientras que para la daunorubicina y la epirubicina las dosis totales acumuladas no deben superar los 650 mg/m² y 850-900 mg/m², respectivamente. Además, se ha observado

que la epirubicina es la antraciclina más segura, puesto que la toxicidad cardíaca que produce es menor.

Con respecto a la termodinámica de la interacción de estos antibióticos antitumorales con el ADN, se ha comprobado que la doxorubicina y la daunorubicina presentan una interacción termodinámica más favorable, mientras que la epirubicina forma un complejo con el ADN menos estable termodinámicamente. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el modo de unión que cada uno de estos fármacos presenta:

- La doxorubicina interacciona con el ADN formando dos complejos distintos en función de la concentración de fármaco. Cuando se administran dosis bajas de doxorubicina, éste forma un complejo con el ADN por intercalación y unión al surco de la doble hebra, y todo ello está estabilizado por uniones electrostáticas formadas entre el fármaco y la doble hélice.
Por otra parte, si se aumenta la dosis de la doxorubicina, se forma un segundo complejo entre el fármaco y el ADN por unión externa.
Por tanto, se concluye que la interacción de la doxorubicina con la doble hélice es más estable y completa.
- La daunorubicina interacciona con el ADN formando un complejo débil por unión externa de carácter electrostático, estabilizado por interacciones electrostáticas entre la doble hebra y la daunorubicina. Posteriormente, el fármaco se intercala entre los pares de bases de la doble hélice, formando un complejo muy estable.
- La epirubicina, sin embargo, forma un complejo menos estable, resultado fundamentalmente de la intercalación del fármaco entre los pares de bases de la doble hebra y, en menor medida, por unión al surco menor del ADN.

Por último, y tras la deformación de la hélice, se ha comprobado de manera general que las antraciclinas interaccionan con la TOP-II, lo que favorece la rotura de la doble hebra. Además, se forman radicales libres como consecuencia de la reducción enzimática del fármaco, los cuales se relacionan también con la actividad antitumoral del mismo.

Para finalizar, cabe destacar que el estudio de la especificidad de la interacción de las antraciclinas con los ácidos nucleicos no es sólo importante desde el punto de vista químico-físico, sino también desde el punto de vista farmacológico. De esta manera, la interacción de la doxorubicina, la daunorubicina y la epirubicina con los ácidos nucleicos arroja luz en el desarrollo de nuevos fármacos análogos, efectivos y eficaces que aporten una solución a los efectos cardiopáticos producidos por las antraciclinas convencionales, haciendo posible que vayan dirigidos a secuencias específicas del ADN de células cancerosas.

8. Referencias bibliográficas

- [1] Aguilera A, Ávalos F, López I, Sartero E, Jiménez J, Casadesús J. Genes. 2ª edición. Barcelona: Reverté S.A., 1996.
- [2] Aubel-Sadron G, Londos-Gagliardi D. Daunorubicin and Doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie*. 1984; 66(5): 333-352.
- [3] Barone G, Guerra C, Gambino N, Silvestri A, Lauria A, Almerico A, Bickelhaupt F. Intercalation of Daunomycin into stacked DNA base pairs. DFT study of an anticancer drug. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2008; 26(1): 115-130.
- [4] Beretta G, Zunino F. Molecular mechanisms of anthracycline activity. En: Krohn K, editor. *Anthracycline chemistry and biology I*. 1ª edición. Berlín: Springer; 2007. P. 1-16.
- [5] Bloomfield V, Clothiers D, Tinoco I. Nucleic acids: structures, properties and functions. *J. Med. Chem.* 2000; 43(24): 4721-4722.
- [6] Bradley D, Wolf M. Aggregation of dyes bound to polyanions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1959; 45(7): 944-952.
- [7] Chaires J. A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Arch. Biochem. Biophys.* 2006; 453(1): 26-31.
- [8] Chaires J, Dattagupta N, Crothers D. Studies on interaction of anthracycline antibiotics and DNA: equilibrium binding studies on interaction of daunomycin with DNA. *Biochemistry*. 1982; 21(17): 3933-3934.
- [9] Chaires J, Dattagupta N, Crothers D. Kinetics of the daunomycin-DNA interaction. *J. Biochem.* 1985; 24(2): 260-267.
- [10] Chaires J, Fox K, Herrera J, Britt M, Waring M. Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction. *Biochemistry*. 1987; 26(25): 8227-8236.
- [11] Chaires J, Herrera J, Waring M. Preferential binding of daunomycin to 5'ATCG and 5'ATGC sequences revealed by footprinting, titration experiment. *Biochemistry*. 1990; 29(26): 6145-6153.
- [12] Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner J. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*. 2010; 115(2): 155-162.
- [13] Chen K, Gresh N, Pullman B. A theoretical investigation on the sequence selected binding of Adriamycin to double stranded polynucleotide. *Nucleic. Acid. Res.* 1986; 14(5): 2251-2267.
- [14] Doroshow J. Doxorubicin-induced cardiac toxicity. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324(12): 843-845.
- [15] Dorr R. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin. Oncol.* 1996; 23(8): 23-24.

- [16] Frederick C, Williams L, Ughatto G, Van der Marel G, Van Boom J, Rich A, Wang A. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: Adriamycin and Daunomycin. *Biochemistry*. 1990; 29(10): 2538-2549.
- [17] Gao X, Mirau P, Patel D. Structure refinement of the chromomycin dimer-DNA oligomer complex in solution. *J. Mol. Biol.* 1992; 223(1): 259-279.
- [18] Geierstanger B, Wemmwe D. Complexes of the minor groove of DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* 1995; 24(1): 463-493.
- [19] González M, Ordóñez A, Feliu J, Zamora P, Espinosa E. *Tratado de medicina paliativa y tratamiento de soporte del paciente con cáncer*. 2ª edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- [20] Graves D, Velea L. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids. *Curr. Org. Chem.* 2000; 4(9): 915-929.
- [21] Grueso E, López-Pérez G, Castellano M, Prado-Gotor R. Thermodynamic and structural study of phenanthroline derivate ruthenium complex/DNA interactions: probing partial intercalation and binding properties. *J. Inorg. Biochem.* 2011; 106(2012): 1-9.
- [22] Hajian R, Ekhlesi E, Daneshvan R. Spectroscopic and electrochemical studies on the interaction of epirubicin with fish sperm DNA. *E-J. Chem.* 2012; 9(3): 1587-1598.
- [23] Haq I. Thermodynamics of drug-DNA interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; 403(1): 1-15.
- [24] Henderson I, Frei E. Adriamycin cardiotoxicity. *Am. Heart. J.* 1980; 99(5): 671-674.
- [25] Hicks J. *Bioquímica*. 2ª edición. Mexico: McGraw Hill; 2006.
- [26] Hortobagyi G. Anthracyclines in the treatment of cancer. *Drugs*. 1997; 54(4): 1-7.
- [27] Horton H, Moran L, Scrimgeour K, Perry M, Rawn J. *Principios de bioquímica*. 4ª edición. México: Pearson Prentice Hall; 2008.
- [28] Karimi M, Moradi N, Moradi Z. DNA intercalators and using them as anticancer drugs. *IJABBR*. 2014; 2(3): 811-822.
- [29] Kruger A, Wojnowski L. Cardiotoxicity of anthracyclines-an unsolved problem. *Dtsch Arztebl.* 2006; 103(37): 1-8.
- [30] Kumar C, Turner R, Asuncion E. Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix: the salt effects. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* 1993; 74(2-3): 231-238.
- [31] Langlois d'Estaintot B, Gallois B, Brown T, Hunter W. The molecular structure of a 4'-epiadriamycin complex with d(TGATCA) at 1,7Å resolution: comparison with the structure of 4'-epiadriamycin d(TGTACA) and d(CGATCG) complexes. *Nucleic Acids Research*. 1992; 20(14): 3561-3566.
- [32] LePecq J, Paoletti C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J. Mol. Biol.* 1967; 27(1): 87-106.

- [33] Lerman L. Structural considerations in the interaction of deoxyribonucleic acid and acridines. *J. Mol. Biol.* 1961; 3(1): 18-30.
- [34] Lin P, Kao Y, Chang Y, Cheng Y, Chien C, Chen W. Daunomycin interaction with DNA: Microcalorimetric studies of the thermodynamics and binding mechanism. *J. Biotechnol.* 2010; 5(10): 1069-1077.
- [35] Lorente A, Fernández M. Interacciones no covalentes con el ADN. *An. Quím.* 2008; 104(4): 280-289.
- [36] Marmont AM, Damasio E, Rossi F. Cardiac toxicity of Daunorubicin. *Lancet.* 1969; 1(7599): 837-838.
- [37] Menna P, Salvatorelli E, Gianni L, Minotti G. Anthracycline Cardiotoxicity. En Krohn K, editor. *Anthracycline Chemistry and Biology I*. 1ª edición. Berlín: Springer; 2007. P. 21-41.
- [38] Müller W, Clothiers D. Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA. *J. Mol. Biol.* 1968; 35(2): 251-290.
- [39] Müller W, Clothiers D. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specificity of intercalating ligands. *Eur. J. Biochem.* 1975; 54(1): 267-277.
- [40] Neidle S. The molecular basis for the action of some DNA-binding drugs. *Prog. Med. Chem.* 1979; 16(1): 151-221.
- [41] Neidle S. Crystallographic insights into DNA minor groove recognition by drugs. *Biopolymers.* 1997; 44(1): 105-121.
- [42] Neidle S, Waring M. Molecular aspects of anticancer drug DNA interactions: Vol 2. 1ª edición. EEUU: CRC Press; 1994.
- [43] Nelson D, Cox M. *Lehninger: Principios de bioquímica*. 5ª edición. Barcelona: Omega; 2009.
- [44] Pérez C, Agustí M, Tornos P. Cardiotoxicidad tardía inducida por antraciclinas. *Med. Clin.* 2009; 133(8): 311-313.
- [45] Pérez-Arnaiz C, Busto M, Leal J, García B. New insights into the mechanism of the DNA/Doxorubicin interaction. *J. Phys. Chem. B.* 2014; 118(5): 1288-1295.
- [46] Rabbani A, Finn R, Ausió J. The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *BioEssays.* 2005; 27(1): 50-56.
- [47] Record M, Anderson C, Lohmann T. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening and ion effects on water activity. *Q. Rev. Biophys.* 1978; 11(2): 103-178.
- [48] Reinbolt R, Patel R, Pau X, Dawn C, Pilarski R, Shapiro C, Lustberg M. Risk factors for anthracycline-associated cardiotoxicity. *Support. Care. Cancer.* 2016; 24(5): 2173-2180.
- [49] Saenger W. *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag. 1988; 6(1): 63-91.

- [50] Singal P, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1998; 339(13): 900-905.
- [51] Singer M, Berg P. *Genes y genomas. Una perspectiva cambiante.* 1ª edición. Barcelona: Omega; 1993.
- [52] Strekowski L, Wilson B. Noncovalent interactions with DNA: an overview. *Mutat. Res.* 2007; 623(1-2): 3-13.
- [53] Trieb M, Rauch C, Wellwzohn B, Wibowo F, Loerting T, Mayer E et al. Daunomycin intercalation stabilizes distinct backbone conformations of DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2004; 21(5): 713-724.
- [54] Volkova M, Russell R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence pathogenesis and treatment. *Curr. Cardiol. Rev.* 2011; 7(4): 214-220.
- [55] Von Hoof D, Layard M, Basa P, Davis H, Von Hoff A, Rozenzweig M, Muggia F. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann. Intern. Med.* 1979; 91(5): 710-717.
- [56] Waring M. DNA modification and cancer. *Annu. Rev. Biochem.* 1981; 50(1): 159-162.
- [57] Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. *Biología molecular del gen.* 5ª edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008.
- [58] Watson J, Crick F. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature.* 1953; 171(4356): 737-738.
- [59] Wolff M. Bioorganic chemistry: nucleic acids. *J. Med. Chem.* 1997; 40(4): 630-631.
- [60] Zunino F, Di Marco A, Zaccara A, Gambeta R. The interaction of daunorubicin and doxorubicin with DNA and chromatin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1980; 607(2): 206-214.