

COMPLEJOS CATIONICOS DE PT II CON BENZOTIAZOLES:
SINTESIS E INTERACCION CON DNA

EMILY QUIÑONES ALSINA



UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
COLEGIO UNIVERSITARIO DE CAYEY

1996





Programa de Honor
Emily Quiñones Alsina

**COMPLEJOS CATIONICOS DE Pt (II) CON BENZOTIAZOLES:
SINTESIS E INTERACCION CON DNA**

POR

Emily Quiñones Alsina

Tesina sometida para cumplir con los requisitos requeridos por el
Programa de Estudios de Honor

Universidad de Puerto Rico
Colegio Universitario de Cayey
1996

BIBLIOTECA
COLEGIO UNIVERSITARIO
CAYEY

JUN 6 '97

Aprobada por:

Mayra E. Cádiz
Mayra Cádiz, PhD

18/II/96
Fecha

Emilio Díaz
Emilio Díaz, PhD

Fecha

Carmen C. Umpierre
Carmen C. Umpierre, PhD
Directora Programa de Honor

31/V/96
Fecha

CPL
RC
27/
.CSS
.QSS
C.I

1076407

RESUMEN

Cisplatin, (*cis*-[Pt(NH₃)₂ Cl₂]) es la droga anticancerígena más utilizada en los Estados Unidos particularmente, en el tratamiento del cáncer de los testículos, ovarios y vejiga. Desafortunadamente, efectos adversos acompañan, y a menudo limitan sus aplicaciones clínicas. Estas limitaciones inspiran a desarrollar nuevos agentes que puedan mejorar sus propiedades terapéuticas.

En un esfuerzo por desarrollar nuevos complejos de platino, se sintetizó un complejo catiónico de platino. El complejo, nitrato de *cis*-diaminocloro (2,5-dimetilbenzotiazol) platino(II) fue sintetizado a partir de cisplatin. El nuevo complejo fue caracterizado por medio de técnicas espectroscópicas tales como infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón. Todas las señales de protón en los espectros de resonancia magnética nuclear se desplazan a campo bajo debido a la formación del complejo. Los estudios de interacción con DNA se llevaron a cabo mediante la incubación del DNA de timo de becerro variando la concentración del complejo de platino en amortiguador de fosfato. Los resultados sugieren que el complejo tiene la capacidad de interaccionar con el DNA, desestabilizando la doble hélice.



TABLA DE CONTENIDO

<u>Capítulo</u>	<u>Página</u>
Lista de Figuras	III
Lista de Tablas	IV
1 Introducción	1
Objetivos	11
2 Trabajos Previos	12
3 Materiales y Métodos	18
Reactivos y Medidas Experimentales	18
Síntesis	18
Preparación de nitrato de <i>cis</i> -diaminocloro (2,5-dimetilbenzotiazol) platino II	18
Estudios con DNA	22
4 Resultados y Discusión	26
Caracterización espectral del complejo	26
Resonancia Magnética Nuclear	27
Espectroscopía Infrarrojo	27
Estudios Espectrofotométricos de DNA	28
Estudios de Desnaturalización DNA	38
5 Conclusiones	42
Bibliografía	43
Apéndice	47



LISTA DE FIGURAS

<u>Capítulo</u>		<u>Página</u>
1-1	Representación de la estructura general de los complejos neutrales de platino (II). <i>Cis</i> -[Pt(amina) ₂ X ₂]; <u>X</u> es un grupo saliente como cloruro, y <u>A</u> es una amina representada como amoníaco o una amina primaria monodentada o bidentada.	2
1-2	Representación esquemática de el aducto más común formado por cisplatin en DNA. Ligadura transversal a una misma hebra "intrastrand crosslinking" entre guaninas adyacentes.	4
1-3	Representación de la estructura general de los complejos catiónicos con triamina con actividad antitumoral demostrada. <i>Cis</i> -[Pt(NH ₃) ₂ (Am) Cl] ⁺ , Am es un ligando amino heterocíclico derivado de piridina, pirimidina, purina, piperidina, o anilina.	6
1-4	Representación esquemática de el aducto monofuncional, formado por los nuevos complejos catiónicos de platino, <i>cis</i> -[Pt (NH ₃) ₂ (Am) Cl] ⁺ , en DNA.	7
1-5	Representación de la estructura general de los complejos <i>trans</i> -platino con citotoxicidad demostrada. <i>Trans</i> -[PtCl ₂ -(L)(L')], L=L'= piridina o tiazol, o L= quinolina.	9
1-6	Representación de la estructura general del complejo <i>cis</i> -[PtCl(NH ₃) ₂ (2,5 dimebt)]NO ₃ sintetizado.	10
3-1	Representación esquemática de la síntesis de <i>cis</i> -[Pt(NH ₃) ₂ (A)Cl] ⁺ .	20



LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
3.1	Preparación de las muestras para los distintos experimentos	24
3.2	Preparación de las muestras control para los estudios espectrofotométricos	25
4.1	$^1\text{H-NMR}$ para <i>cis</i> -[PtCl (NH ₃) ₂ (2,5-dimebt)]NO ₃	32
4.2	Experimento de desnaturalización de DNA con <i>cis</i> -[PtCl (NH ₃) ₂ (2,5-dimetilbenzotiazol)] NO ₃	39
4.3	Experimento de desnaturalización de DNA con cisplatin	40
4.4	Experimento de desnaturalización de DNA con <i>cis</i> -[PtCl (NH ₃) ₂ (1-metilimidazol)] NO ₃	41

Capítulo I

INTRODUCCION

El complejo de coordinación clásico *cis-diaminodicloroplatino (II)*, *cis-DDP* o cisplatín, es la droga anticancerígena más utilizada en el tratamiento de varios tipos de cáncer en los Estados Unidos (Hollis et al., 1991). Recientemente ha sido aprobada para el tratamiento del cáncer testicular y en los ovarios (Hollis et al., 1991). Desafortunadamente, efectos severos acompañan y limitan las aplicaciones clínicas de esta droga. Efectos adversos tales como nefrotoxicidad, neurotoxicidad, náusea y vómito limitan su uso (Prestayko et al., 1980). Afortunadamente, la mayoría de estos efectos han sido superados; sólo la neurotoxicidad es aún el mayor efecto que limita la dosificación. Algunas desventajas adicionales asociadas a la terapia con drogas de platino son el desarrollo de resistencia y una actividad limitada contra algunas de las comunes y mortales formas de la enfermedad tales como el cáncer del colon y de las mamas (Carter et al., 1984). Estas limitaciones reducen su eficiencia e inspiran a desarrollar nuevos agentes que puedan mejorar sus propiedades terapéuticas.

Una alternativa a este problema es identificar nuevas clases de complejos activos de platino con estructuras diferentes a los análogos de cisplatín existentes. En general la mayoría de los análogos que muestran actividad anticancerígena son compuestos neutrales con platino (II) de la forma *cis*-[Pt(amina)₂X₂], donde X es un grupo saliente aniónico como cloruro, y amina representa amoníaco o una amina primaria monodentada o bidentada (Figura 1-1) (Cleare et al., 1980). El isómero *trans* de cisplatín, *trans*-[PtCl₂(NH₃)₂], *trans-DDP*, carece de actividad anticancerígena.

Varios estudios han establecido la correlación entre la geometría *cis* y el grupo saliente X y su actividad observada. Estas investigaciones sugieren que la actividad antitumoral reside en la interacción de estos complejos con DNA. Cisplatín y sus análogos producen lesiones bifuncionales al DNA que son capaces de inhibir la replicación y transcripción de la biomolécula (Sherman and Lippard, 1987). El aducto más común es



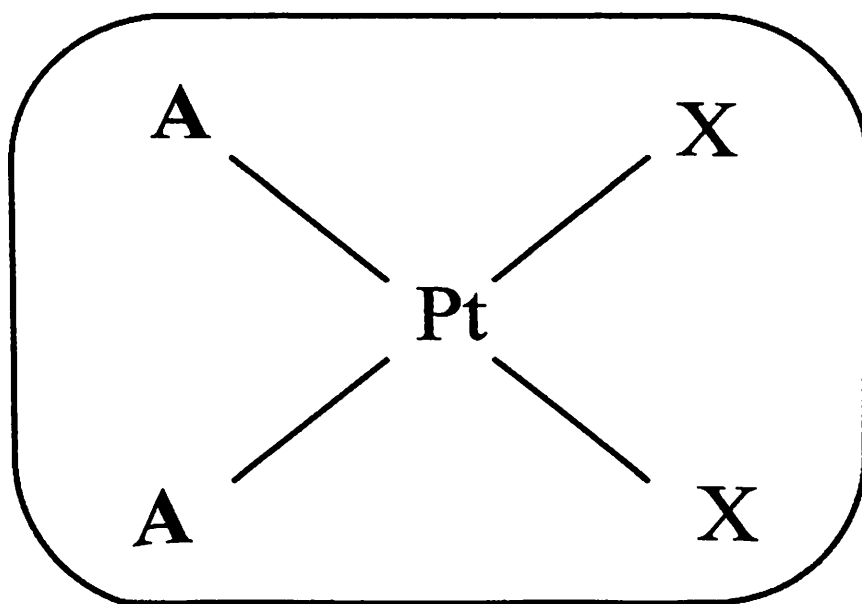


Figura 1-1 Representación de la estructura general de los complejos neutrales de platino (II). *cis*-[Pt(amina)₂X₂]; X es un grupo saliente como cloruro, y A es una amina representada como amoniaco o una amina primaria monodentada o bidentada.



una ligadura transversal a una misma hebra "intrastrand crosslink" entre bases de guanina adyacentes, que han mostrado que inhiben la síntesis de DNA (Figura 1-2) (Sherman and Lippard, 1987; Heiger-Berneys et al., 1990).

Recientemente se logró preparar un deoxinucleótido con doble hélice que contiene el mayor aducto de cisplatin y se reportó la estructura cristalina (Takahara et al., 1995). Según estos estudios, la ligadura transversal a una misma hebra "intrastrand crosslink" facilita el enlace de proteínas que contienen uno o más grupos de alta movilidad (HMG). Cuando este tipo de proteínas se enlaza a cisplatin en la ligadura transversal, éstas pueden ser separadas de sus sitios de enlace en el genoma y evitar que los aductos se reparen. Este tipo de actividad sensibiliza a las células con respecto a cisplatin y contribuye a sus propiedades citotóxicas. Los resultados sugieren que, al enlazarse cisplatin al DNA, se distorciona la geometría de coordinación de platino (Takahara et al., 1995). Otro estudio en donde se reportó la estructura de *cis*-DDP y su ligadura transversal a las dos hebras del DNA "interstrand cross-link" mostró inesperado y es que el puente de *cis*-DDP reside en el surco "groove" menor del DNA en lugar de el surco "groove" mayor (Huang et al., 1995).

Una mínima variación en los ligandos podría tener efectos significativos en la actividad antitumoral y en la toxicidad de los compuestos de platino. En la droga de platino ideal el grupo saliente es un anión que debe de tener un enlace de fortaleza intermedia a Pt (II). Complejos con aniones lábiles son inactivos, en algunos casos la disociación de estos aniones son activados "in vivo" (Cleare, 1974). Ejemplos de aniones efectivos son Cl⁻, SO₄²⁻, citrato (3⁻), oxalato (2⁻) y otros residuos de ácidos carboxílicos. Al menos uno de los dos ligandos aminos *cis* debe de tener un grupo N-H. Compuestos que no tienen esta propiedad han sido encontrados inactivos. El grupo N-H es requerido como función de donar un enlace de hidrógeno; además; el efecto estérico podría ser importante (Lempers and Reedijk, 1991).

La búsqueda de nuevas clases de drogas antitumorales de platino ha permitido el descubrimiento de nuevos agentes que parecen tener propiedades químicas y biológicas



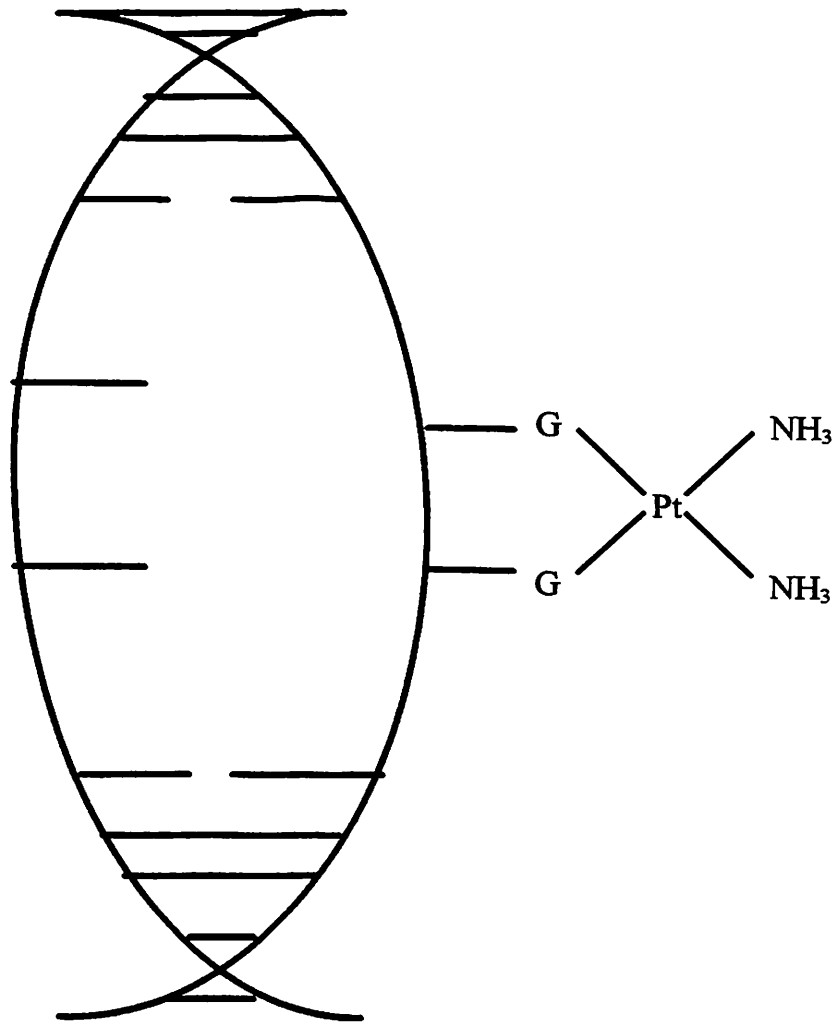


Figura 1-2: Representación esquemática de el aducto más común formado por cisplatin en DNA. Ligadura transversal de una misma hebra “intrstrand crosslinking” entre guaninas adyacentes.



diferentes a las de cisplatin. Complejos catiónicos triamina-platino de la forma *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Am})\text{Cl}]^+$, donde Am es un ligando amino heterocíclico derivado de piridina, pirimidina, purina, piperidina o anilina, han sido encontrado activos activos en tumores de células de ratón y humanos (Figura 1-3) (Hollis et al., 1991). Estos complejos poseen propiedades químicas deseadas como alta estabilidad y solubilidad en medio acuoso. Como estos complejos triamina-platino son especies catiónicas que contienen tres donadores de nitrógeno y un solo grupo saliente, no se pueden considerar como análogos clásicos de cisplatin. Ha sido demostrado, en contraste a cisplatin, que estos complejos no producen el tipo de ligadura transversal en una hebra "intrastrand crosslinks" del DNA, característico de cisplatin y sus análogos. Estos complejos de platino catiónicos forman aductos monofuncionales en el DNA (Figura 1-4) en lugar de eliminar NH_3 o Am para producir lesiones bifuncionales (Hollis et al., 1991). Este descubrimiento sugiere la posibilidad de que los ligandos aromáticos planares puedan intercalarse entre los pares de bases de DNA adyacente al sitio de coordinación de platino, formando un aducto pseudobifuncional capaz de inhibir la replicación (Sundquist et al., 1990). La presencia de ligandos planares parece ser esencial en la actividad antitumoral de los complejos triamino-platino y *trans*.

Recientemente, ha sido reportado que la presencia de ligandos planares tales como piridina aumentan la citotoxicidad de la estructura *trans* (Van Beusichem and Farrell, 1992). La citotoxicidad de los complejos de platino *trans* de la fórmula estructural *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{L})(\text{L}')]]$, donde $\text{L} = \text{L}' =$ piridina o tiazol, o $\text{L} =$ quinolina) (Figura 1-5) fue estudiada en líneas de células antitumorales (Farrell, et al., 1992). Los resultados confirman que utilizando ligandos planares se aumenta la citotoxicidad de estos complejos en comparación con *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$. En algunos casos la citotoxicidad fue equivalente a la de cisplatin. Estos resultados son muy importantes porque complejos estructuralmente diferentes a cisplatin y sus análogos podrían tener diferencia en actividad



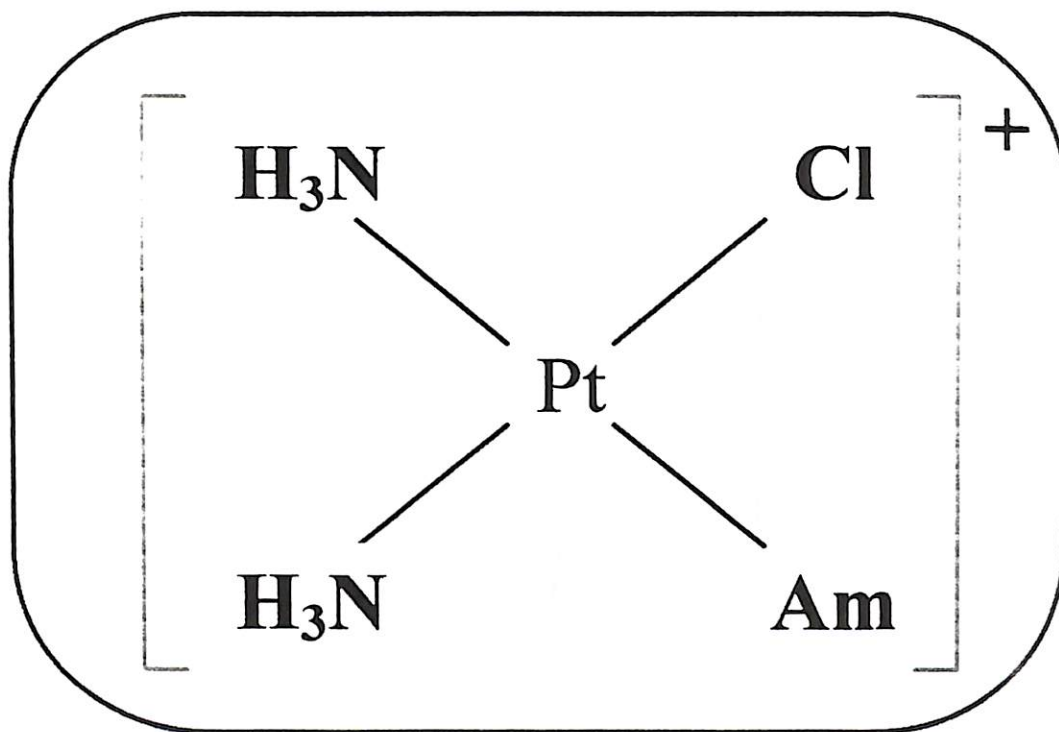


Figura 1-3: Representación de la estructura general de los complejos catiónicos con triamina con actividad antitumoral demostrada. *Cis*-[Pt(NH₃)₂ (Am) Cl]⁺, Am es un ligando amino heterocíclico derivado de piridina, pirimidina, purina, piperidina, o anilina.



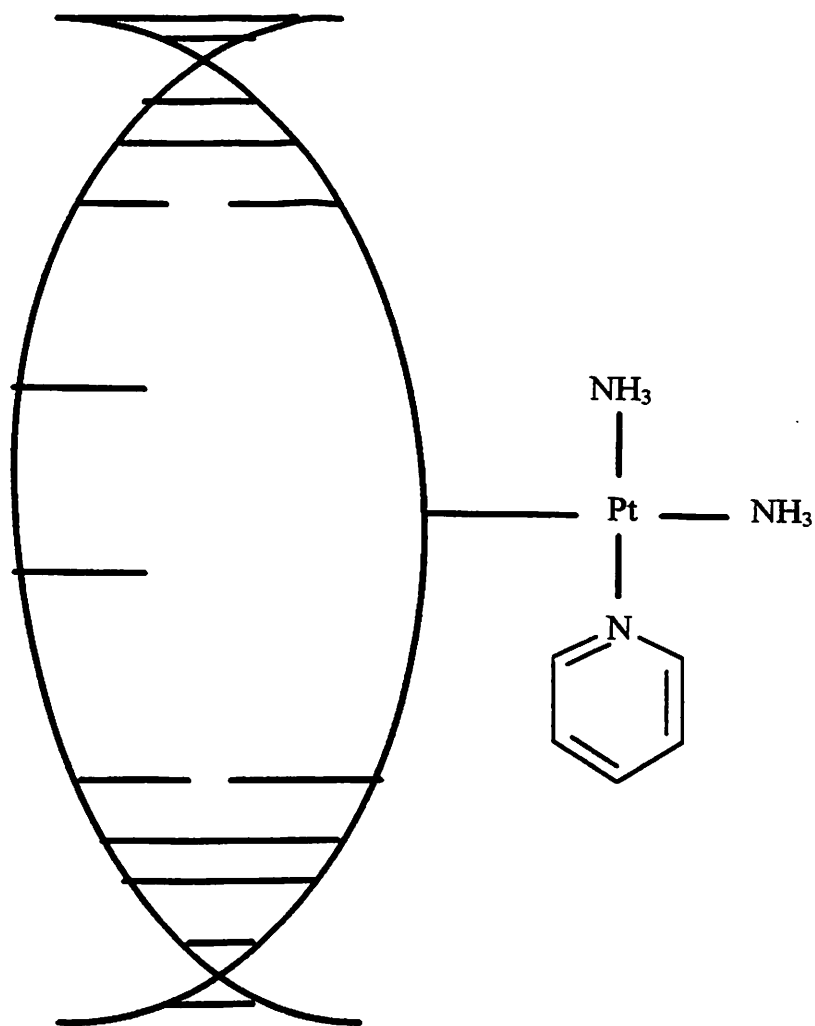


Figura 1-4: Representación esquemática de el aducto monofuncional formado por los nuevos complejos catiónicos de platino, $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Am})\text{Cl}]^+$, en DNA.

o citotoxicidad. Los factores determinantes en citotoxicidad pueden no seguir el mismo patrón encontrado para cisplatino y sus análogos (Farrell et al., 1992).

Estudios en los pasados años han demostrado que otros complejos de platino con citotoxicidad aceptable envuelven a ligandos aromáticos con anillos planos. Ligandos heterocíclicos derivados de imidazol, tiazol y oxazol han sido utilizados en la síntesis de nuevos complejos. Estos nuevos complejos poseen una citotoxicidad significativa (Muir et al., 1990).

Entre los efectos del enlace de platino a la estructura de DNA se encuentra el aumento o disminución de su punto de fusión, T_m . Cuando se aumenta la cantidad de *cis*- $\{Pt(NH_3)_2\}$ se desestabiliza la doble hélice del DNA, resultando en una disminución en su temperatura de fusión. Por otra parte, varios reportes indican que el *trans*-DDP estabiliza el DNA aumentando su temperatura de fusión ya que establece ligaduras transversales a dos hebras (Sherman y Lippard, 1987).

Teniendo esto en mente se sintetizó el complejo catiónico de la forma *cis*- $[Pt(NH_3)_2(A)Cl]^+$ donde A es 2,5-dimetilbenzotiazol (Figura 1-6) y se llevó a cabo su caracterización mediante estudios espectroscópicos ultravioleta-visible, Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear de protón (1H -NMR). Se espera que el mecanismo de acción de este compuesto sea distinto al de cisplatino. También se hicieron varios experimentos de T_m utilizando complejos que contienen 1-metilimidazol y 2,5-dimetilbenzotiazol como ligando para compararlos con cisplatino y se estudió su interacción con DNA.



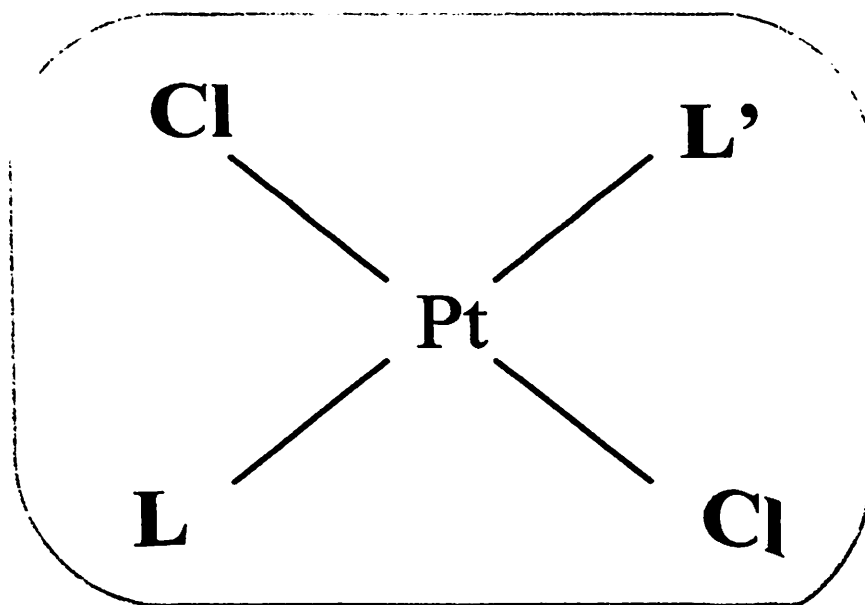
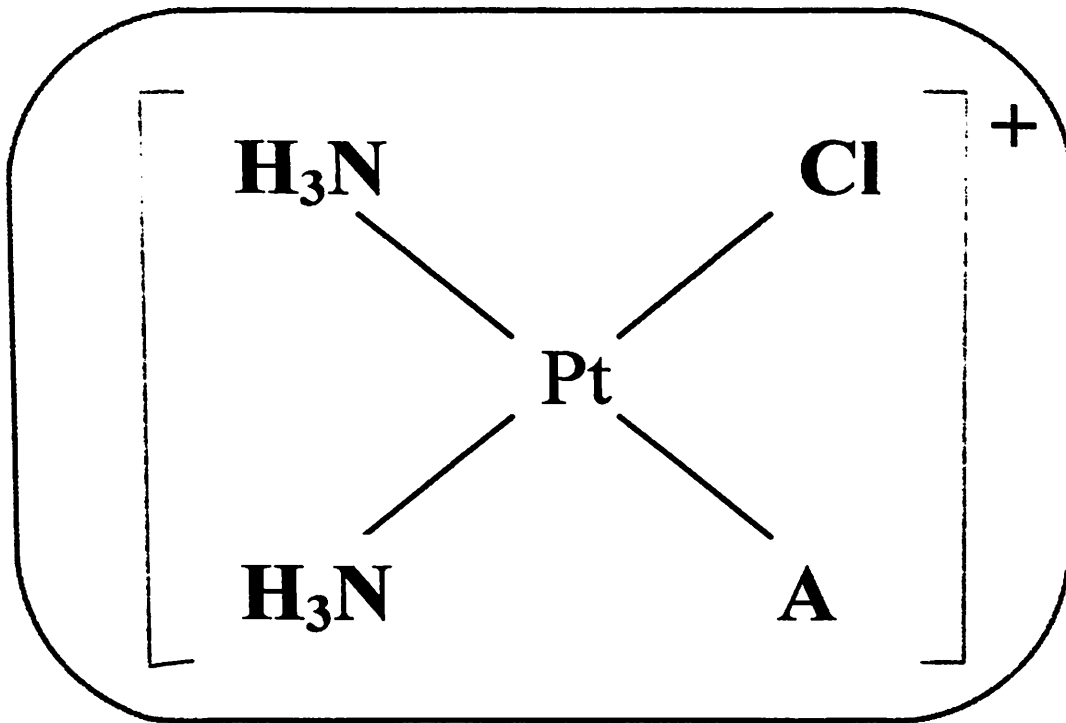


Figura 1-5: Representación de la estructura general de los complejos *trans*-platino con citotoxicidad demostrada. *Trans*-[PtCl₂(L)(L')], L=L'=piridina o tiazol, o L=quinolina.



donde
 A=2,5-dimetilbenzotiazol

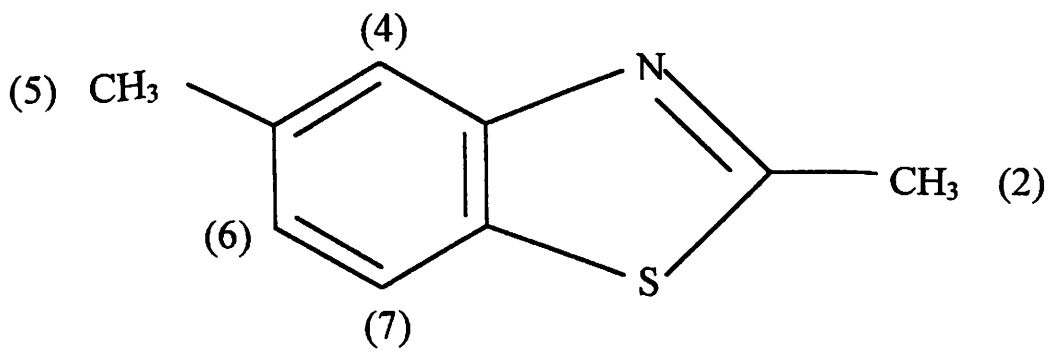


Figura 1-6: Representación de la estructura general del complejo *cis*-[PtCl(NH₃)₂(2,5 dimebt)]NO₃ sintetizado.



OBJETIVOS:

El propósito principal de este trabajo fue desarrollar un nuevo complejo catiónico de platino, del tipo $cis-[PtCl(NH_3)_2A]NO_3$ que contenga en su estructura 2,5-dimetilbenzotiazol como ligando. Se evaluó la capacidad de interacción que posee este compuesto con DNA. El complejo fue sintetizado utilizando métodos reportados en la literatura para la preparación de compuestos relacionados. Para llevar a cabo nuestro propósito se siguieron los siguientes objetivos:

1. Caracterizar el nuevo complejo mediante la realización de análisis elemental tales como % de carbono y % de hidrógeno, y documentar propiedades físicas como punto de fusión.
2. Caracterizar mediante estudios espectroscópicos ultravioleta-visible, Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H-NMR).
3. Examinar si puede interaccionar con DNA y alterar la estructura de la macromolécula. Se utilizó espectroscopía ultravioleta-visible para detectar cambios en las propiedades electrónicas del DNA que haya sido expuesto al complejo.
4. Realizar experimentos de temperatura de desnaturalización de DNA para ver cómo se afecta con el nuevo complejo y comparar con el efecto de cisplatino, y un complejo catiónico relacionado, utilizando distintas razones de Pt/DNA.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the success of any business and for the protection of the interests of all parties involved. The document also highlights the need for transparency and accountability in all financial dealings.

The second part of the document outlines the various methods and techniques used to collect and analyze data. It describes the different types of data that can be collected and the various tools and software used to process and analyze this data. The document also discusses the importance of data security and the need to protect sensitive information.

The third part of the document discusses the various methods and techniques used to collect and analyze data. It describes the different types of data that can be collected and the various tools and software used to process and analyze this data. The document also discusses the importance of data security and the need to protect sensitive information.

The fourth part of the document discusses the various methods and techniques used to collect and analyze data. It describes the different types of data that can be collected and the various tools and software used to process and analyze this data. The document also discusses the importance of data security and the need to protect sensitive information.

The fifth part of the document discusses the various methods and techniques used to collect and analyze data. It describes the different types of data that can be collected and the various tools and software used to process and analyze this data. The document also discusses the importance of data security and the need to protect sensitive information.

Capítulo II

TRABAJOS PREVIOS:

Rosenberg et al. (1965), mientras estudiaba el efecto de un campo eléctrico en el crecimiento de bacterias utilizando electrodos de platino, descubrió que un producto de la electrólisis inhibió la división en las bacterias. Las bacterias crecieron en forma de filamentos largos, pero no habían dejado de dividirse. Los agentes que produjeron este efecto fueron identificados como *cis*-diaminotetracloroplatino(IV) y su complejo correspondiente de platino (II), *cis*-diaminodicloroplatino(II) (cisplatin) (Rosenberg et al., 1967). Como los compuestos activos de platino suprimieron la división de las células sin matar la bacteria, se pensó que podían inhibir el crecimiento de células cancerosas. Rosenberg y sus colaboradores demostraron que dicha actividad si ocurría (Rosenberg et al., 1969; Rosenberg, 1980), y en 1972, se empezó a utilizar *cis*-DDP en pruebas clínicas. En 1979, la Administración de Drogas y Alimentos "Food and Drug Administration" (FDA) aprobó el compuesto, y hasta ahora es una de las drogas anticancerígenas más utilizadas alrededor del mundo.

Cis-DDP ha sido exitoso en el tratamiento del cáncer en el pulmón, cabeza, cuello (Rosenberg, 1980; Loehrer y Einhorn, 1984) y especialmente, en el cáncer testicular y ovariano. Desafortunadamente, efectos severos (Reedijk, 1992) acompañan el uso de este compuesto y limitan sus aplicaciones clínicas. Otras limitaciones son su baja solubilidad en soluciones salinas, su resistencia inherente a ciertos tipos de tumores, y el desarrollo de resistencia, reducción en su eficacia a través de la repetición de tratamiento (Farrell, 1993). Un análogo de cisplatin, carboplatin, *cis*[Pt(NH₃)₂(1,1ciclobutanodicarboxilato)], ha sido desarrollado en un esfuerzo por reducir la toxicidad. Carboplatin muestra una actividad similar a la de cisplatin cuando es utilizado para el tratamiento del cáncer ovariano, pero es menos tóxico (Sherman and Lippard, 1987).



El *cis*-DDP es activo como droga anticancerígena mientras que el isómero *trans* no lo es. A pesar de que la rapidez y el mecanismo de formación de los aductos del DNA de *cis*- y *trans*-DDP no muestran mucha diferencia, la regioespecificidad y la estereoespecificidad para los dos complejos es dramáticamente diferente. Dicha diferencia implica una preferencia estereoquímica por la interacción del isómero *cis* para el blanco biológico, que no es compartido por el isómero *trans*. La biomolécula aceptada como el blanco de cisplatino es DNA, lo cual simplifica el problema a entender las diferencias en la estereoquímica de los aductos de *cis*- y *trans*-DDP con DNA (Sunquist y Lippard, 1990). Evidencia que apoya la idea de que el DNA es un blanco importante de las drogas de platino es la inducción al crecimiento filamentoso en bacterias, la inhibición de síntesis de DNA (opuesto a la síntesis de RNA y proteínas) en cultivos celulares, la inactivación de virus y bacteriófagos, y la actividad mutagénica (Lippert, 1989). *Cis*-DDP prefiere la formación de ligaduras transversales a una misma hebra entre pares de bases adyacentes, con un 90% de los aductos envolviendo a platino coordinándose a la posición N7 de dos bases de guanina o una base adenina y otra base guanina (Sherman y Lippard, 1987). El isómero *trans* no forma ligaduras transversales a una misma hebra "intrastrand crosslink". Esto ha sido demostrado en estudios de resonancia magnética nuclear (Sunquist y Lippard, 1990).

A pesar de que las ligaduras transversales formados por *cis* y *trans*-DDP difieren substancialmente, ambos inhiben la replicación de DNA *in vitro* y *in vivo* (Roberts y Thomson, 1979). Sin embargo, el isómero *cis* es más tóxico y mutagénico a las células en medios de cultivo que el isómero *trans* (Sunquist y Lippard, 1990). Existen dos posibles explicaciones para este hecho. Una es que los aductos formados *in vivo* por el isómero *trans* inhiben la replicación de DNA menos eficientemente que el isómero *cis*. El isómero *trans* forma aductos monofuncionales por hebra, los cuales, en general son inactivos, mientras que el isómero *cis* forma aductos bifuncionales que tienden a ser más tóxicos. Esto implica que las reacciones responsables de la actividad antitumoral de cisplatino y sus



análogos requieren de un enlace bifuncional a la molécula biológica (Sundquist y Lippard, 1990). También se ha sugerido que los aductos Pt-DNA formados por el isómero *trans* son reparados más eficientemente, haciéndolos menos activos.

Una gran variedad de técnicas y métodos han sido utilizados para caracterizar la interacción de cisplatino y sus análogos con las bases nitrogenadas de DNA. Experimentos han revelado un cambio en el pico máximo de absorción de DNA de 259 a 264 nm debido a la reacción con los complejos de platino, indicando una asociación de platino con las bases nitrogenadas (Horacek, 1971). También se observa una inhibición no competitiva en bromuro de etidio "ethidium bromide" por *cis*-DDP, lo cual demuestra que los compuestos de platino se enlazan covalentemente al DNA y no por intercalación (Howe-Grant et al., 1976; Butour y Macquet, 1977).

El enlace de platino altera la estructura de plásmidos de DNA de superhélice covalentemente cerrado, según fue medido por su movilidad en una gel de electroforesis (Ushay, 1981). El aumentar la cantidad de ambos *cis* y *trans*-DDP, desenrollan la doble hélice, resultando en la remoción de superrollos "supercoils" negativos, disminuyendo consecuentemente la movilidad electroforética de el plásmido hasta que el DNA covalentemente cerrado coemigra con DNA circular abierto. Información adicional concerniente a los patrones de enlace de platino y sus aductos en el DNA ha sido derivada de métodos de degradación enzimática de DNA tratado con platino usando endonucleasas de restricción (Cohen, 1980) y exonucleasas (Tullius y Lippard, 1981); sedimentación por gradiente y elución alcalina (Roberts y Friedlos, 1982; Zwelling et al., 1979), replicación enzimática con una plantilla de DNA con platino modificada (Pinto y Lippard, 1985) y el uso de anticuerpos para aductos de platino (Sundquist y Lippard, 1986).

El grado de cuánto son capaces de desenvolver "unwind" el DNA los aductos específicos de la droga anticancerígena cisplatino, ha sido cuantitativamente determinado (Bellon, 1991). Ha sido encontrado que los aductos *cis*-GG y *cis*-AG desenvuelve "unwind" el DNA por 13°, mientras que el aducto *cis*-GTG desenvuelve "unwind" el DNA



por 23°. Distorsiones del DNA en el lugar de coordinación de platino fueron amplificadas por medio de la polimerización de estos monómeros, y fueron cuantitativamente evaluadas utilizando una gel de electroforesis de poliacrilamida (Bellon, 1991). El grado de desentrelazamiento "unwinding" del DNA fue determinado sistemáticamente variando la distancia entre átomo de platino en polímeros que contienen los aductos. El multímero que migra más lento da la fase óptima para el enlace cooperativo, de aquí se puede obtener el grado de desentrelazamiento "unwinding".

Las relaciones originales de estructura-actividad para las drogas de platino anticancerígenas establecidas fueron las siguientes: (1) los dos ligandos de amina en los compuestos de platino debe de ser en la orientación *cis*-PtX₂(Am)₂ para Pt(II) y *cis*-PtY₂X₂(Am)₂ para Pt (IV); (2) el ligando X, usualmente un anión, debe de consistir de grupos que tienen fortaleza intermedia al enlazar Pt(II); (3) el ligando de amina debe de poseer al menos un grupo N-H (Reedjick et al., 1987).

Estas reglas empíricas para las drogas de platino parecían indicar que solamente los complejos bifuncionales, con dos grupos salientes en la posición *cis*, eran activos. En años recientes, la actividad anticancerígena de los complejos de platino que difieren en estructura a cisplatin han sido reportados.

La demostración de actividad anticancerígena de estos complejos automáticamente significa que lesiones similares a las de cisplatin no son las únicas que producen citotoxicidad y actividad anticancerígena. Es importante examinar cuán radicalmente diferente es el mecanismo de acción de estos nuevos agentes comparados con los de la droga en uso (Farrell, 1993). Al menos cuatro series han sido reconocidas que violan la relación empírica estructura-actividad de los agentes anticancerígenos de platino. Una de ellas es la de complejos dinucleares de platino que contienen dos unidades *cis*-[Pt(amina)₂] unidas por una cadena de diamina de largo variable, [*cis*-tCl₂(NH₃)₂]₂(H₂N(CH₂)_nNH₂) (Farrell et al., 1988) o complejos que contienen esferas de coordinación monodentada, [*trans*-{PtCl(NH₃)₂}]₂H₂N(CH₂)_nNH₂]Cl₂ (Farrell et al., 1990).



Otra serie está compuesta por complejos de geometría *trans*, como lo es *trans*-[PtCl₂(piridina)₂], los cuales son más tóxicos que su isómero *cis* y demuestran una actividad equivalente a la de cisplatin en cultivos de tejidos (Farrell et al., 1989). En adición, complejos que contienen ligandos activos en reacciones de oxidación-reducción, como nitroimidazol en *cis* y *trans*-[PtCl₂(NH₃) (NO₂Im)], son más citotóxicos que cisplatin en células hipóxicas que en el aire (Skov et al., 1990).

Dos series de complejos catiónicos han sido reportadas con actividad anticancerígena. Las estructuras generales son [PtCl₂(R'R"SO) (diamina)] NO₃ (Farrell et al., 1990a) y *cis*-[Pt (NH₃)₂ (amina)Cl]⁺ (amina= piridina sustituida o pirimidina) (Hollis et al., 1989).

El perfil de enlaces de las series de complejos de platino [*trans*-PtCl(L)₂H₂N(CH₂)_nNH₂]²⁺ (L= NH₃ o py) y [*cis*PtCl(NH₃)₂]₂H₂N(CH₂)_nNH₂]²⁺ fueron examinadas para comparar los efectos de isomerismo geométrico en la presencia de ligandos que no sean NH₃ en la esfera de coordinación. Efectos estéricos, debido a la geometría de los grupos salientes *cis* al puente de diamina, o en la presencia de ligandos de piridina planares, afectaron el enlace al DNA de timo de becerro para estos isómeros. Por el contrario, los derivados de piridina muestran una preferencia distinta por poli(dG-dC).poli(dG-dC) en comparación con ambos isómeros de NH₃. El enlace bifuncional de los isómeros de NH₃ es capaz de desenvolver "unwind" el plásmido pUC19 de modo equivalente a *cis*-DDP, mientras que el efecto derivado de piridina es aproximadamente el doble que el de *trans*-[PtCl₂(py)₂]. La ligadura transversal entre hebras "interstrand cross-linking" DNA-DNA es muy eficiente para los tres agentes (Farrell et al., 1995).

Complejos del tipo *cis*-[Pt(NH₃)₂(amina)Cl]⁺ son de especial interés porque éstos se enlazan a nucleótidos de purina en DNA formando aductos monofuncionales los cuales, al contrario de los formados por [Pt(dien)Cl]⁺ y [Pt(NH₃)₃Cl]⁺, inhiben la replicación (Sundquist y Lippard, 1990). Un estudio realizado con 32 complejos catiónicos de platino de la forma *cis*-[PtA₂AmCl]⁺ demostró que la actividad observada depende de la

The first part of the paper discusses the
importance of the research and the
methodology used. The second part
presents the results of the study
and the third part discusses the
conclusions and implications of the
research.

The results of the study indicate that
there is a significant difference in
the performance of the two groups
and that the intervention has a
positive effect on the outcome.
The implications of the research
suggest that the intervention should
be implemented in a wider range of
settings to maximize its impact.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

naturaleza y orientación de los ligando de amina (Am). En general, ligandos de NH₃ de configuración *cis* son requeridos para la actividad. Tanto el ligando amina (Am) como el grupo saliente (X) influyen en la actividad anticancerígena. Los análogos activos contienen ligandos de aminas heterocíclicas, secundarias, o terciarias, mientras que las aminas primarias son inactivas (Hollis et al., 1989).

Cationes *cis*-[Pt(NH₃)₂(Am)Cl]⁺ forman aductos monofuncionales con DNA en lugar de eliminar NH₃ o Am para formar lesiones bifuncionales (Hollis et al., 1991). Esta conclusión es sostenida por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y análisis de digestión enzimática de los productos de las reacciones de estos complejos con d(GpG) y dG, los cuales revelaron enlace monofuncional. El rol del ligando de amina planar (Am) es crítico para aumentar la citotoxicidad (Farrell, 1993). Estas propiedades de enlace de DNA sugiere que este nuevo tipo de compuesto puede mostrar una actividad diferente a cisplatino y sus análogos relacionados como carboplatino (Hollis et al., 1991).



Capítulo III

MATERIALES Y METODOS

Reactivos y medidas experimentales:

Todos los reactivos fueron obtenidos de fuentes comerciales y se utilizaron sin ningún proceso de purificación adicional. Cisplatin fue adquirido de las compañías Sigma Chemical Company y Fluka A.G. El compuesto 2,5-dimetilbenzotiazol fue adquirido de la compañía Aldrich. El DNA de timo de becerro fue comprado a la compañía Sigma Chemical Company. Las membranas para la diálisis "Spectra/Por Dialysis membrane tubing" (mwco=12-14,000) fueron compradas a la industria Spectrum Medical Industries, inc.

El análisis elemental fue hecho en el laboratorio Atlantic Microlab Inc., Norcross, Georgia. El punto de fusión fue medido en tubos capilares utilizando el aparato Electrothermal IA9000 Series Digital Melting Point Apparatus. Los espectros de Infrarrojo fueron tomados en un espectrofotómetro Perkin Elmer FT-IR System 2000 en pastillas de KBr. Los espectros de $^1\text{H-NMR}$ fueron corridos en un espectrofotómetro Gemini 300 FT-NMR utilizando DMF como solvente y TSP como estándar. Los espectros de UV-Visible fueron tomados en un espectrofotómetro computarizado Perkin Elmer Lambda 2, utilizando un amortiguador de fosfato, con un pH de 7.4, como disolvente. Se utilizaron muestras de diferentes concentraciones.

Síntesis:

El complejo *cis*-[PtCl(NH₃)₂(2,5dimebt)]NO₃ fue preparado a partir de cisplatin utilizando el método de Hollis et al., 1989. La pureza del producto final fue analizado por análisis elemental. El esquema de la síntesis del complejo está mostrado en la Figura 3-1.

Preparación de nitrato de *cis*-diaminocloro (2,5-dimetilbenzotiazol) platino(II):

Cisplatin (0.2507 g, 0.0008335 moles) fue disuelto en 5 mL de dimetilformamida (DMF), se le aplicó un poco de calor y se añadieron 5 mL adicionales de DMF. Se tomaron 5 mL de DMF para disolver el nitrato de plata (0.1419 g). Una vez disuelto el



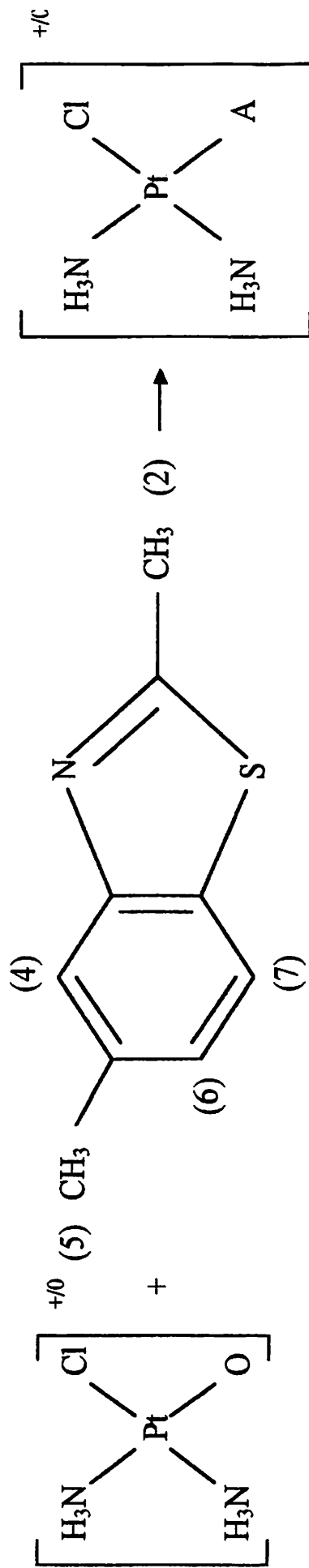
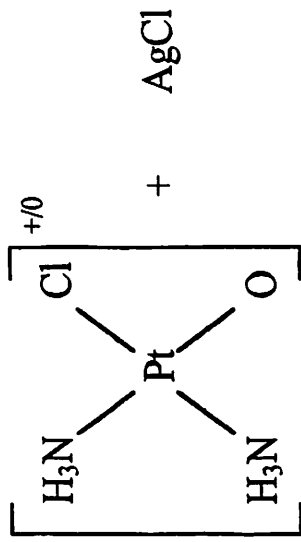
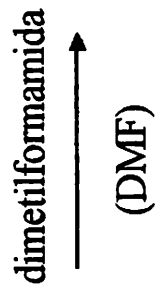
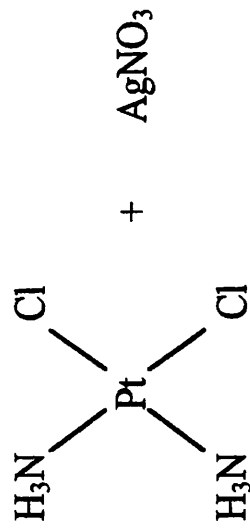
nitrate de plata se añadió lentamente a la solución de cisplatino. Se dejó agitando la solución por 24 horas. Luego se filtró al vacío para separar el AgCl. Se obtuvo un líquido amarillo transparente y se colocó en la nevera por 48 horas. Se filtró el líquido a través de un disco con una membrana de teflón con poro de 0.45 μm , conectado a una jeringuilla. Luego se añadió a la solución el ligando 2,5-dimetilbenzotiazol (0.1361 g). El disolvente se removió al vacío, y se lavó el producto con CH_2Cl_2 , metanol y éter. Se obtuvo 0.285 g de un sólido color marrón claro, lo que representa un 70% de rendimiento de producto crudo a partir de cisplatino (p.f. 162-164 °C). Los porcentajes de carbono e hidrógeno calculados para $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{SPt}$ son 22.07% y 3.0%, respectivamente. El análisis reflejó unos porcentajes de C y H de 17.70% y 3.08%, respectivamente.



Figura 3-1. Representación esquemática de la síntesis de $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{A})\text{Cl}]^+$.

Sintesis de *cis*-[Pt(NH₃)₂(A)Cl]⁺

A = 2,5-dimetilbenzotiazol





Estudios de DNA:

Se preparó una solución disolviendo el DNA de timo de becerro en amortiguador de fosfato con un pH de 7.4. La concentración de la solución fue determinada espectrofotométricamente. Se leyó la absorbancia en 260 nm y se determinó la concentración molar utilizando el coeficiente de extinción de $6.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La concentración de la solución "stock" fue $1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$. Para el estudio espectrofotométrico y para el de T_m se preparó una solución a partir de la solución "stock" para dar una concentración final de $9 \times 10^{-5} \text{ M}$. Se prepararon soluciones "stock" de los complejos para las diferentes interacciones ($2.25 \times 10^{-5} \text{ M}$). Se prepararon muestras de los complejos con el DNA en varias razones de $[\text{Pt}]/[\text{DNA}]$ en amortiguador de fosfato con un pH de 7.4. Todas las muestras contenían la misma concentración de DNA ($9 \times 10^{-5} \text{ M}$). La concentración de los complejos de Pt fue variada para obtener razones $[\text{Pt}]/[\text{DNA}]$ de 0.00, 0.17, 0.33, 0.50 y 0.67 para cada compuesto. Cada muestra se llevó a un volumen de 5 mL utilizando el amortiguador de fosfato de pH de 7.4 (Tabla 3.1). Las muestras fueron incubadas en un baño de agua por 24 horas a 37 grados Celsius. Para el estudio espectrofotométrico se utilizaron las muestras luego de sacarlas de la incubación. Por cada muestra, se trabajó con una muestra control para utilizarla como referencia en el comportamiento del espectrofotómetro. Estas se prepararon de modo paralelo a las muestras a estudiarse excepto que no contenían DNA (Tabla 3.2). De este modo, se pretendía eliminar cualquier contribución que el complejo pudiera hacer a la absorbancia a 260 nm, ya que el complejo *cis* $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(2,5 \text{ dimebt})] \text{NO}_3$ muestra máximos de absorción a 265 y 292 nm. Para los estudios de desnaturalización (T_m), las muestras fueron dializadas en amortiguador de fosfato por un periodo de 48 horas a 4 grados Celsius. Se hicieron dos cambios de amortiguador para remover el platino que no se enlazó al DNA. Se colocaron 300 μL en la celda especial del espectrofotómetro, la cual está conectada a un baño termostataado. Luego de cada ajuste para aumentar la



temperatura del baño, se esperaba por un periodo de 5 minutos para hacer la lectura de absorbancia.



Tabla 3.1 - Preparación de las muestras para los distintos experimentos

Muestra	Vol. Sol'n DNA (mL)	Vol. disolvente (mL) (Buffer fosfato pH = 7.4)	Vol. Sol'n Pt (mL)	Vol. total (mL)
1	3.0	2.0	0.0	5.0
2	3.0	1.5	0.5	5.0
3	3.0	1.0	1.0	5.0
4	3.0	0.5	1.5	5.0
5	3.0	0.0	2.0	5.0



Tabla 3.2 - Preparación de las muestras control para los estudios espectrofotométricos

Control	Vol. Sol'n DNA (mL)	Vol. disolvente (mL) (Buffer fosfato pH = 7.4)	Vol. Sol'n Pt (mL)	Vol. total (mL)
1	0.0	5.0	0.0	5.0
2	0.0	4.5	0.5	5.0
3	0.0	4.0	1.0	5.0
4	0.0	3.5	1.5	5.0
5	0.0	3.0	2.0	5.0

continued from previous page

Time (min)	Concentration (mg/L)
0	0
10	1
20	2
30	3
40	4
50	5
60	6
70	7
80	8
90	9
100	10

Capítulo IV

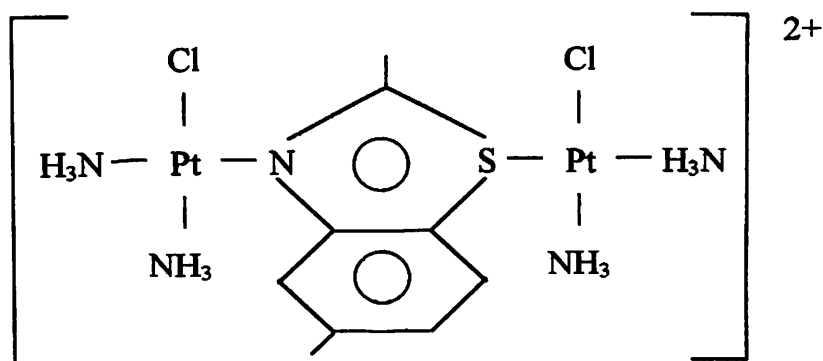
RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización espectral del complejo:

Un nuevo complejo de platino fue sintetizado utilizando el método descrito por Hollis et al., 1989.

Los datos analíticos no están del todo de acuerdo con lo esperado, ya que la diferencia entre el porcentaje de carbono encontrado y el calculado es de 4.37%. Esta diferencia se puede deber al contenido de impurezas inorgánicas tales como cisplatino o AgCl. Esto también podría deberse a la presencia de una especie en donde el 2,5-dimetilbenzotiazol actúe de forma ambidentada, enlazando dos unidades $\{Pt(NH_3)_2Cl^+\}$.

Como se muestra a continuación:



Un compuesto como $[cis- \{PtCl (NH_3)_2\}_2(2,5-dimebt)] (NO_3)_2$ tiene un porcentaje de carbono igual a 14.48%. Una mezcla entre el producto esperado, y una impureza como esta, reflejarán un menor porcentaje de carbono. El posible enlace de platino a azufre en un producto secundario de la síntesis parece estar sustentado por la señal (doblete) que se observa sobre 9 ppm en el espectro de resonancia magnética nuclear. El carácter ambidentado de los benzotiazoles ha sido postulado por Weaver et al., 1970.

1954

...

...

...

...

...

...



...

...

...

...

...

...

Ca

the

h

de

de

de

C

1

de

de

de

de

de

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear:

Los espectros de resonancia magnética nuclear del ligando y complejo se muestran en las figuras 4.1 y 4.2, respectivamente. Los datos de Resonancia Magnética nuclear de protón del complejo fueron utilizados para confirmar la presencia de la molécula orgánica en el producto obtenido en la síntesis. La Tabla 4.3 muestra una lista de los cambios químicos, en ppm, con respecto al estándar TSP para el ligando 2,5-dimetilbenzotiazol y para su complejo. Estos cambios se deben a varios efectos tales como el efecto del campo eléctrico causado por la complejación, o a enlaces pi, entre otros (Lavallee et al., 1977). Los protones del anillo en el espectro del ligando fueron asignados de acuerdo a la literatura (Gaetano et al., 1965). La asignación de las señales en el espectro del complejo fueron basadas en su forma y cambio químico relativo, utilizando el espectro del ligando como referencia.

Con respecto a las señales del ligando en el complejo, la señal de H(4) del benzotiazol muestra el cambio en el desplazamiento químico mayor hacia campo bajo, seguido por la señal de CH₃ (2) y la de H(7). El H(4) y el CH₃ (2) están más cerca del átomo de nitrógeno, el cual es el átomo más electronegativo en el anillo, y posible sitio preferido de coordinación. Este remueve densidad electrónica de estos protones, haciendo que sus señales aparezcan a campos bajos. La magnitud del cambio en desplazamiento químico, $\Delta\delta_{\text{ppm}}$ no varía proporcionalmente con la cercanía al sitio de coordinación cuando hay sistemas aromáticos (Lavalle, 1977).

Las constantes de acoplamiento entre protones y el átomo de platino pueden ser usadas para determinar el lugar de coordinación, mientras mayor sea la distancia del lugar de coordinación, más pequeña es la constante de acoplamiento. En nuestro estudio, estas constantes de acoplamiento no pudieron ser determinadas.

Espectroscopía Infrarrojo:

Los espectros de infrarrojo medio para 2,5-dimetilbenzotiazol y el complejo cis-[Pt(NH₃)₂(2,5-dimebt)Cl]NO₃ se muestran en las figuras 4.3 y 4.4, respectivamente. El



espectro para el complejo muestra las bandas de las vibraciones de NH_3 y NO_3^- , así como las del 2,5-dimetilbenzotiazol. El estiramiento $\nu(\text{NH}_3)$ aparece a una frecuencia de $3,273 \text{ cm}^{-1}$. La banda intensa aparece en la región de 1384.5 cm^{-1} es asignada al estiramiento de NO_3^- (Nakamoto, 1986). Las bandas del ligando 2,5-dimebt fueron alteradas debido a la complejación, siendo los cambios más notables desplazamientos en vibraciones asociadas al sitio de coordinación, así como disminución en la intensidad de las bandas. Las bandas del ligando en 2917 cm^{-1} (estiramiento C-H), 1522 cm^{-1} y 1378 cm^{-1} (estiramiento del anillo) no pudieron asignarse para el complejo por estar desplazados o solapados con otras bandas.

Estudio Espectrofotométrico de DNA:

Como parte de los estudios del complejo y su interacción con DNA se tomaron espectros de ultravioleta-visible de muestras del complejo a diferentes razones de $[\text{Pt}]/[\text{DNA}]$. Los espectros están mostrados en las figuras 4.5, 4.6 y 4.7. Las razones de $[\text{Pt}]/[\text{DNA}]$ fueron de 0.00, 0.17, 0.33, 0.50 y 0.67 respectivamente. Como resultado se obtuvo que, con el ión complejo *cis*-diaminocloro(2,5-dimetilbenzotiazol) platino (II), a medida que iba aumentando la razón de $[\text{Pt}]/[\text{DNA}]$, iba aumentando la absorbancia del DNA en 260 nm, y se iba desplazando el máximo hacia mayores longitudes de onda. Este efecto hipercrómico concuerda con lo reportado en la literatura para compuestos que desestabilizan del DNA, al abrirse la doble hélice y quedar expuestas las bases nitrogenadas. Este estudio provee evidencia adicional de que las lesiones de los complejos catiónicos en el DNA son monofuncionales, o sea, no importa la razón $[\text{Pt}]/[\text{DNA}]$ que se utilice siempre va a tener el mismo efecto en el DNA, el de desestabilizar la doble hélice. Esto es lo esperado, ya que un complejo como este no puede formar ligaduras transversales a dos hebras, a menos que pierda uno de los grupos NH_3 o el ligando plano. Sin embargo, al hacer el mismo experimento con cisplatín se observa lo contrario; al aumentar la razón $[\text{Pt}]/[\text{DNA}]$ disminuye la absorbancia del DNA. El efecto "estabilizador" a altas concentraciones de cisplatín puede atribuirse a que, al aumentarse el

Este trabajo se fundamenta en el Informe de la Comisión de
 Investigación de la tragedia aérea que tuvo lugar el día
 13 de octubre de 1972, en la zona de...
 El accidente ocurrió en la zona de...
 La investigación se centró en las causas...
 Las causas principales fueron...
 Las conclusiones del estudio...
 Las recomendaciones...

La presente investigación se fundamenta en...
 Se analizaron los datos...
 Los resultados indican...
 En consecuencia...

La presente investigación se fundamenta en...
 Se analizaron los datos...
 Los resultados indican...
 En consecuencia...

100
 99
 98
 97
 96
 95
 94
 93
 92
 91
 90
 89
 88
 87
 86
 85
 84
 83
 82
 81
 80
 79
 78
 77
 76
 75
 74
 73
 72
 71
 70
 69
 68
 67
 66
 65
 64
 63
 62
 61
 60
 59
 58
 57
 56
 55
 54
 53
 52
 51
 50
 49
 48
 47
 46
 45
 44
 43
 42
 41
 40
 39
 38
 37
 36
 35
 34
 33
 32
 31
 30
 29
 28
 27
 26
 25
 24
 23
 22
 21
 20
 19
 18
 17
 16
 15
 14
 13
 12
 11
 10
 9
 8
 7
 6
 5
 4
 3
 2
 1
 0

número de lesiones bifuncionales, se puede aumentar las ligaduras entre hebras. Las razones utilizadas para cisplatín normalmente son menores que 0.10, por lo que se observa mayormente el efecto desestabilizador que induce el enlace bifuncional a una sólo hebra del DNA. El ion complejo *cis*-diaminocloro (1-metilimidazol) platino(II), análogo de *cis*-[Pt (NH₃)₂ (2,5-dimebt)Cl]⁺, debería desestabilizar la doble hélice del DNA, ya que no debe ser capaz de hacer ligaduras transversales a dos hebras. La tendencia a estabilizar que se sugiere en la figura 4.7, no es lo esperado a menos que haya perdido un ligando. Este comportamiento no esperado deberá verificarse, ya que los cambios observados no son tan marcados como para hacer conclusiones definitivas.

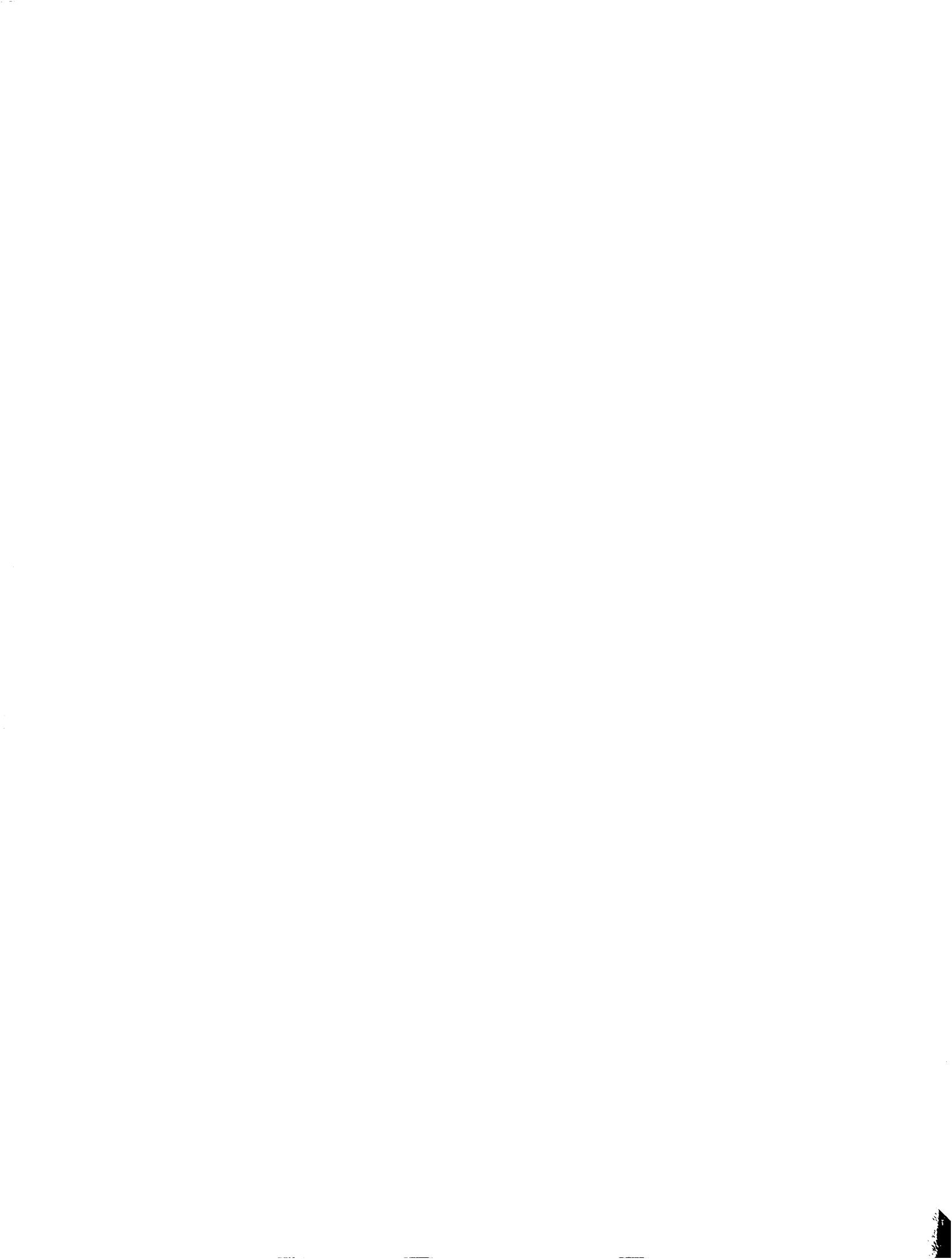
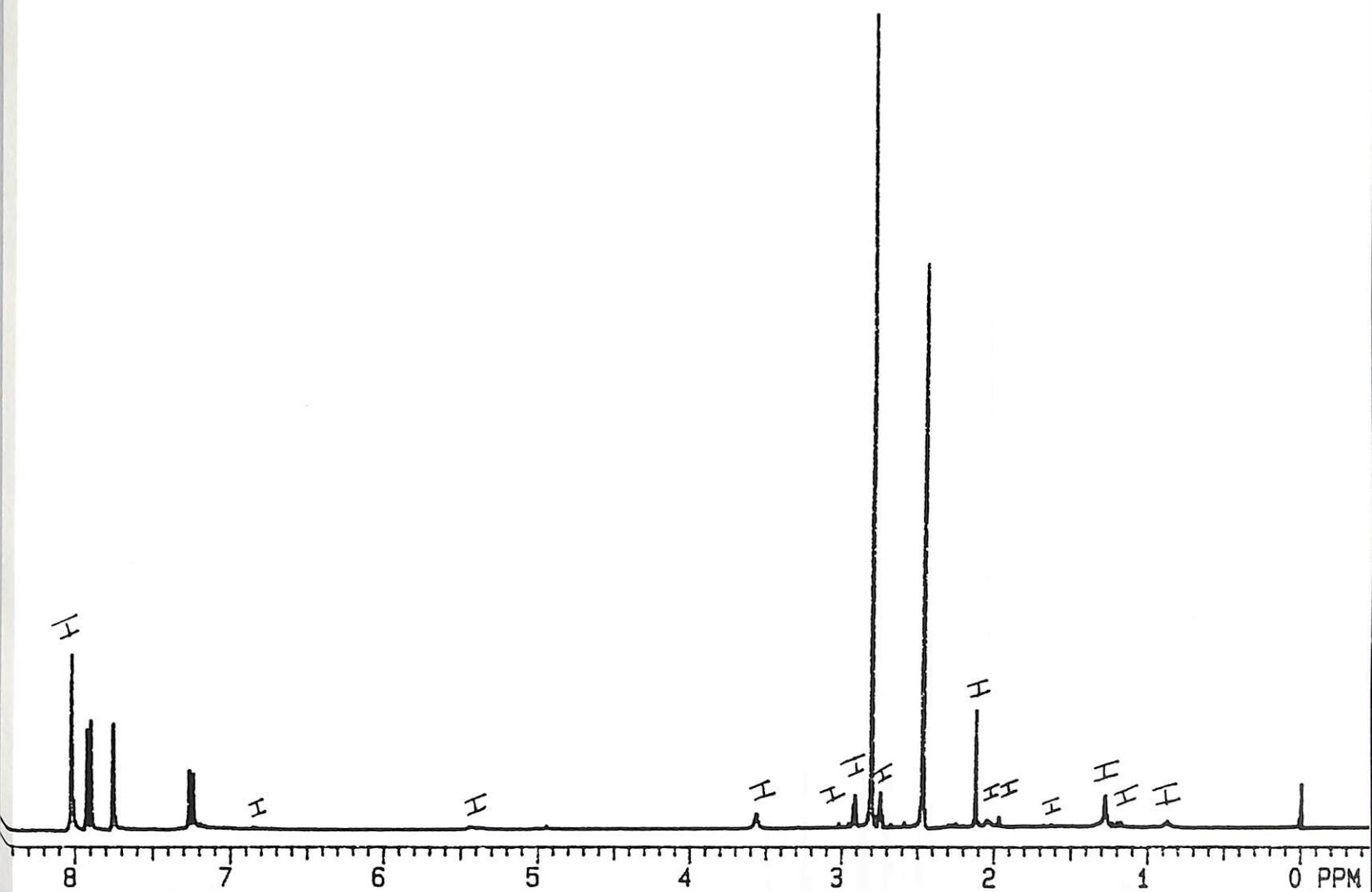


Figura 4.1

Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de 2,5-dimetilbenzotiazol

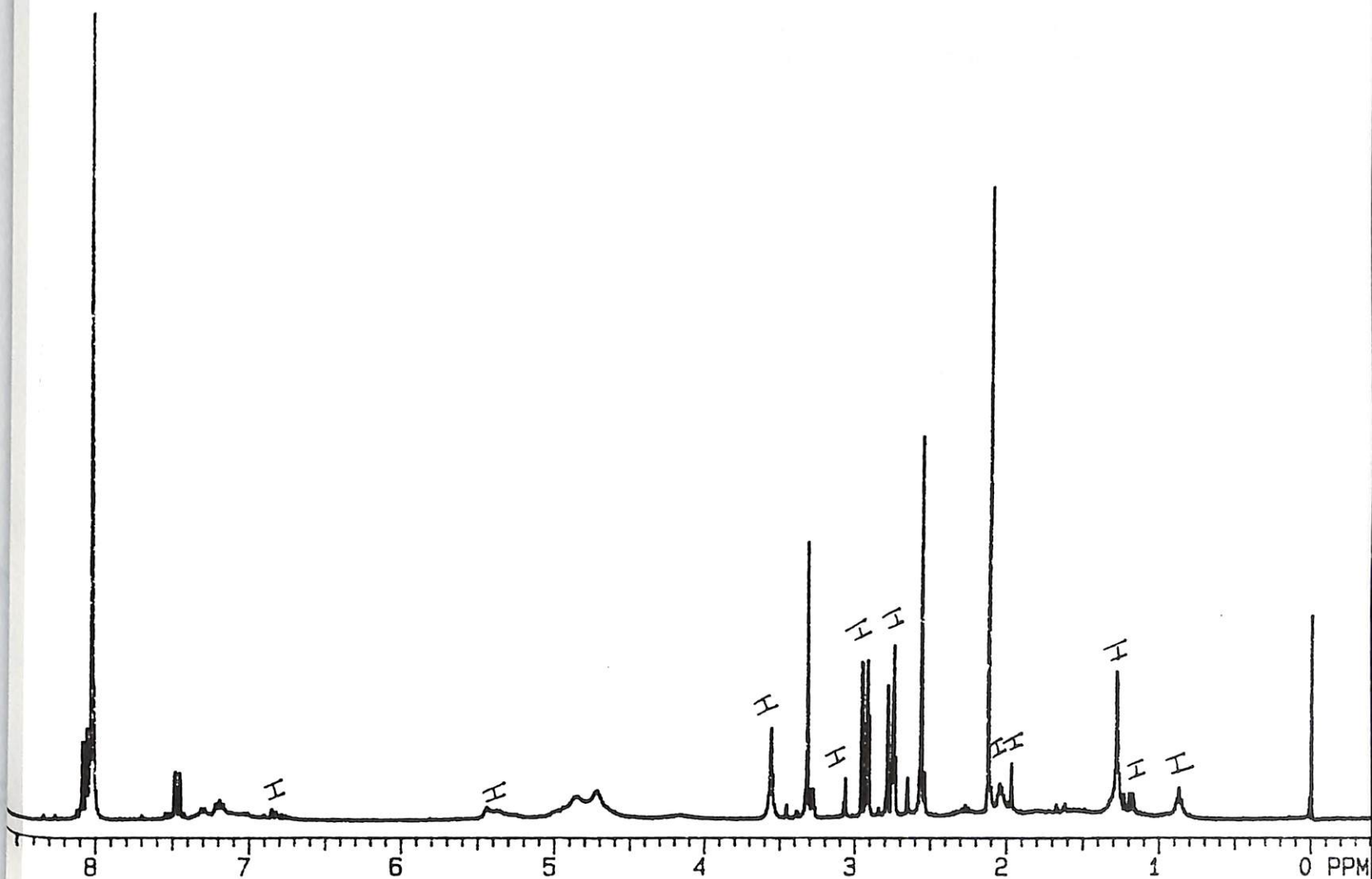


I = Impurezas del disolvente



Figura 4.2

*Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de Nitrato de
cis-diaminocloro (2,5-dimetilbenzotiazol) platino (II)*



I = Impurezas del disolvente



Tabla 4.1 - $^1\text{H-NMR}$ para *cis*-[PtCl (NH₃)₂ (2,5-dimebt)]NO₃

Protón	δ (PPM)	δ (PPM)	$\Delta\delta$ (PPM)
	Complejo	Ligando	
CH ₃ (2)	3.32	2.81	0.51
H ⁴	8.80	7.76	1.04
CH ₃ (5)	2.57	2.47	0.10
H ⁶	8.07	7.91	0.16
H ⁷	7.48	7.26	0.22

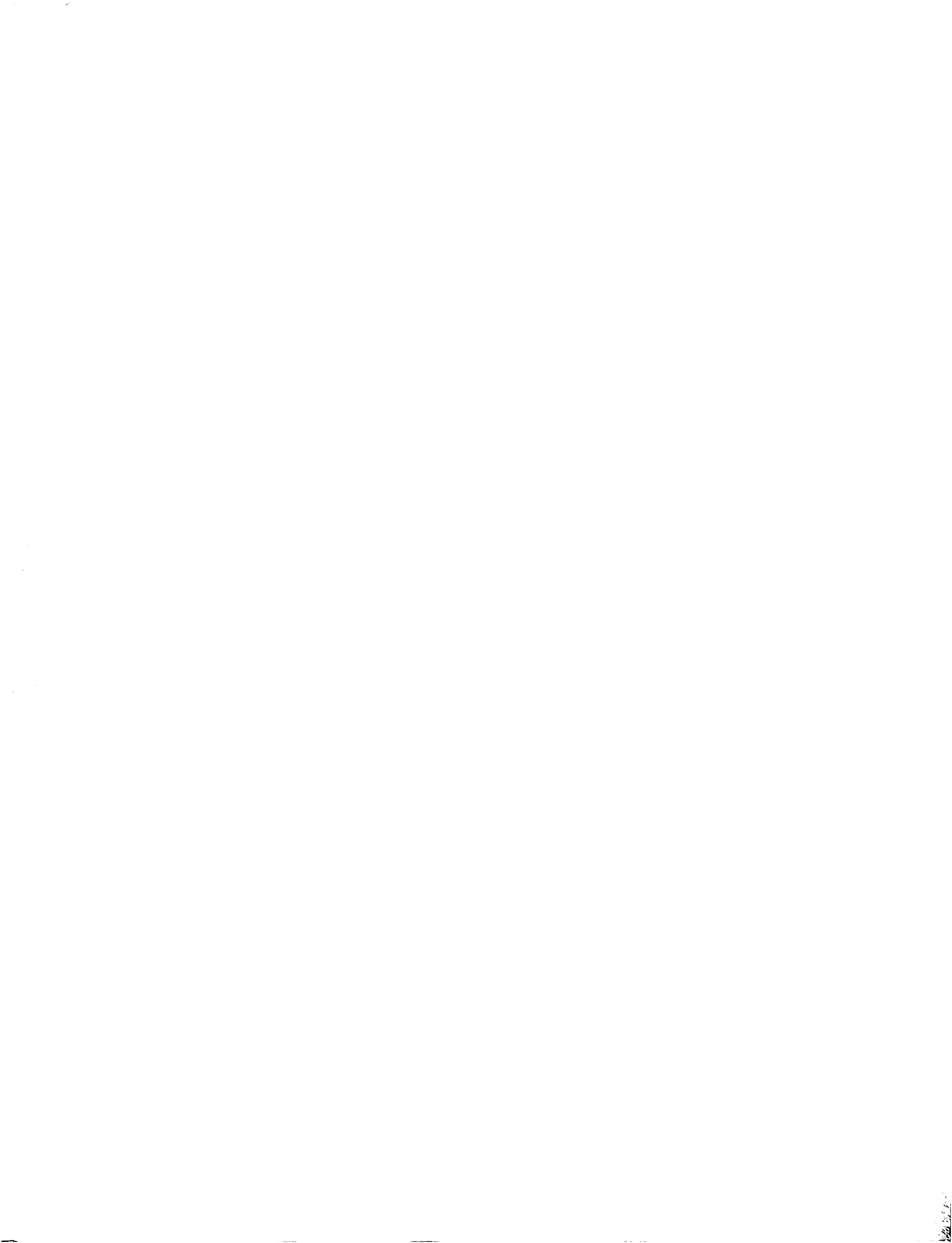
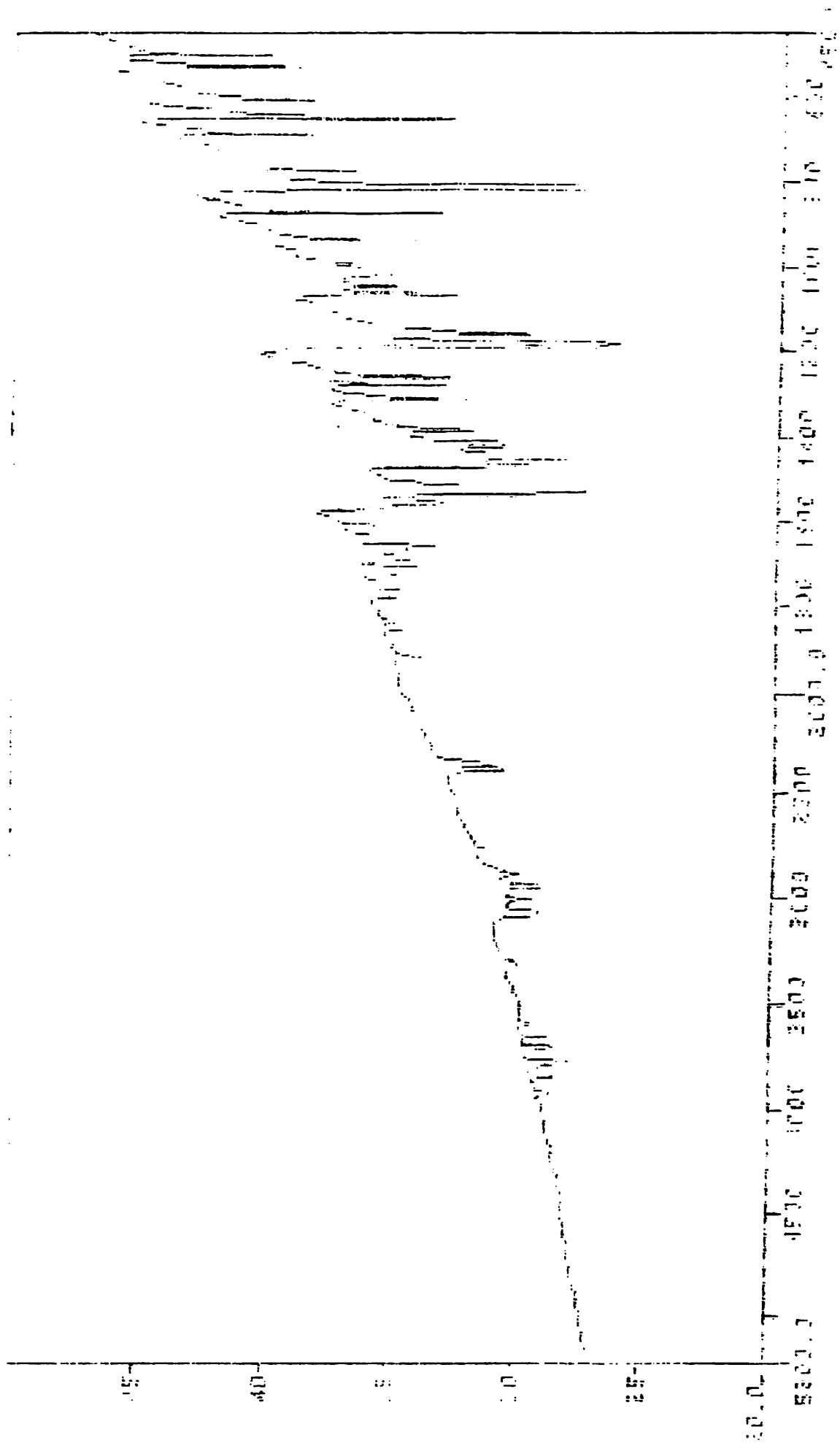


Figura 4.3

Espectro de Infrarrojo medio de 2,5-dimetilbenzotiazol



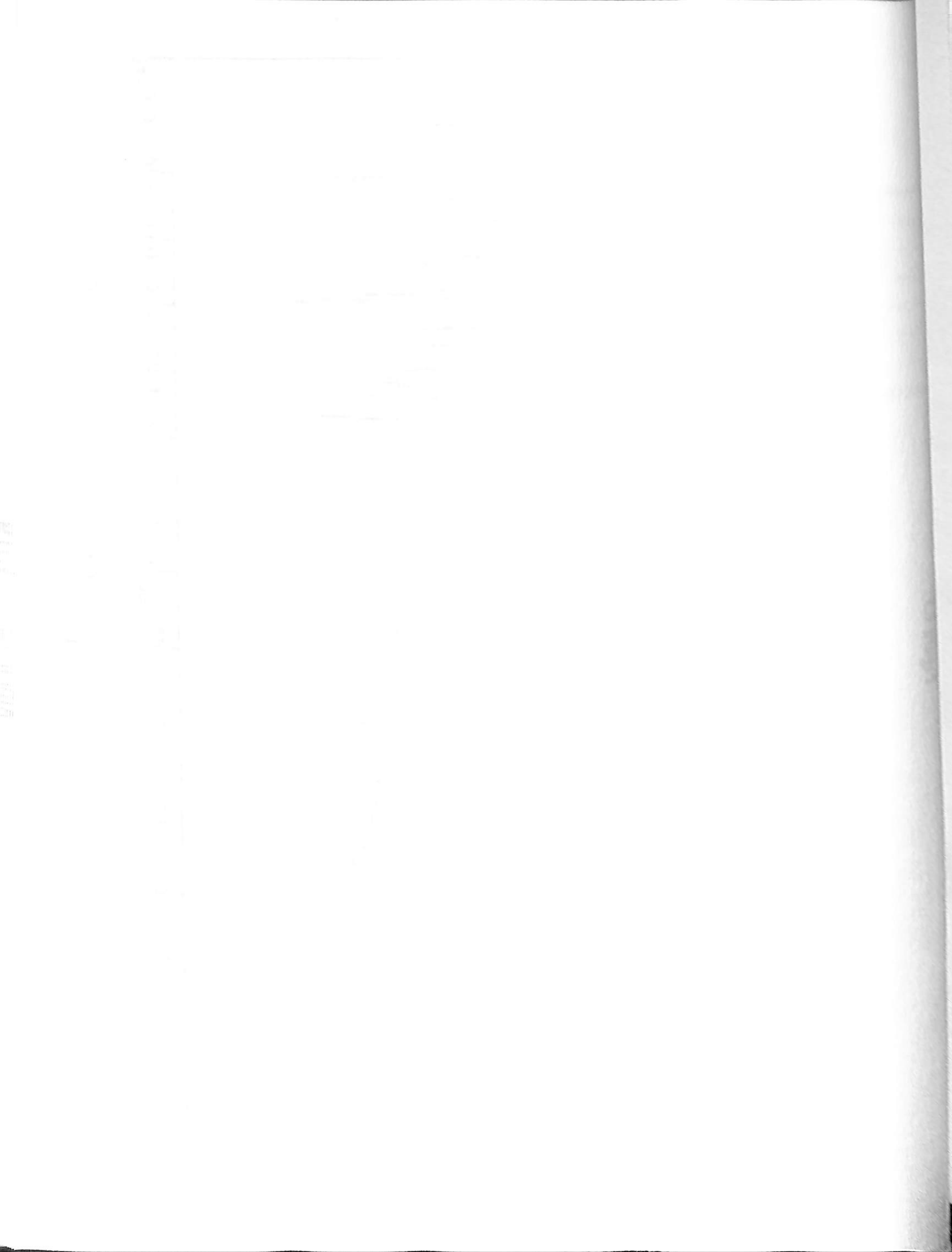


Figura 4.4

*Espectro de Infrarrojo medio de Nitrato de
cis-diaminocloro (2,5-dimetilbenzotiazol) platino (II)*

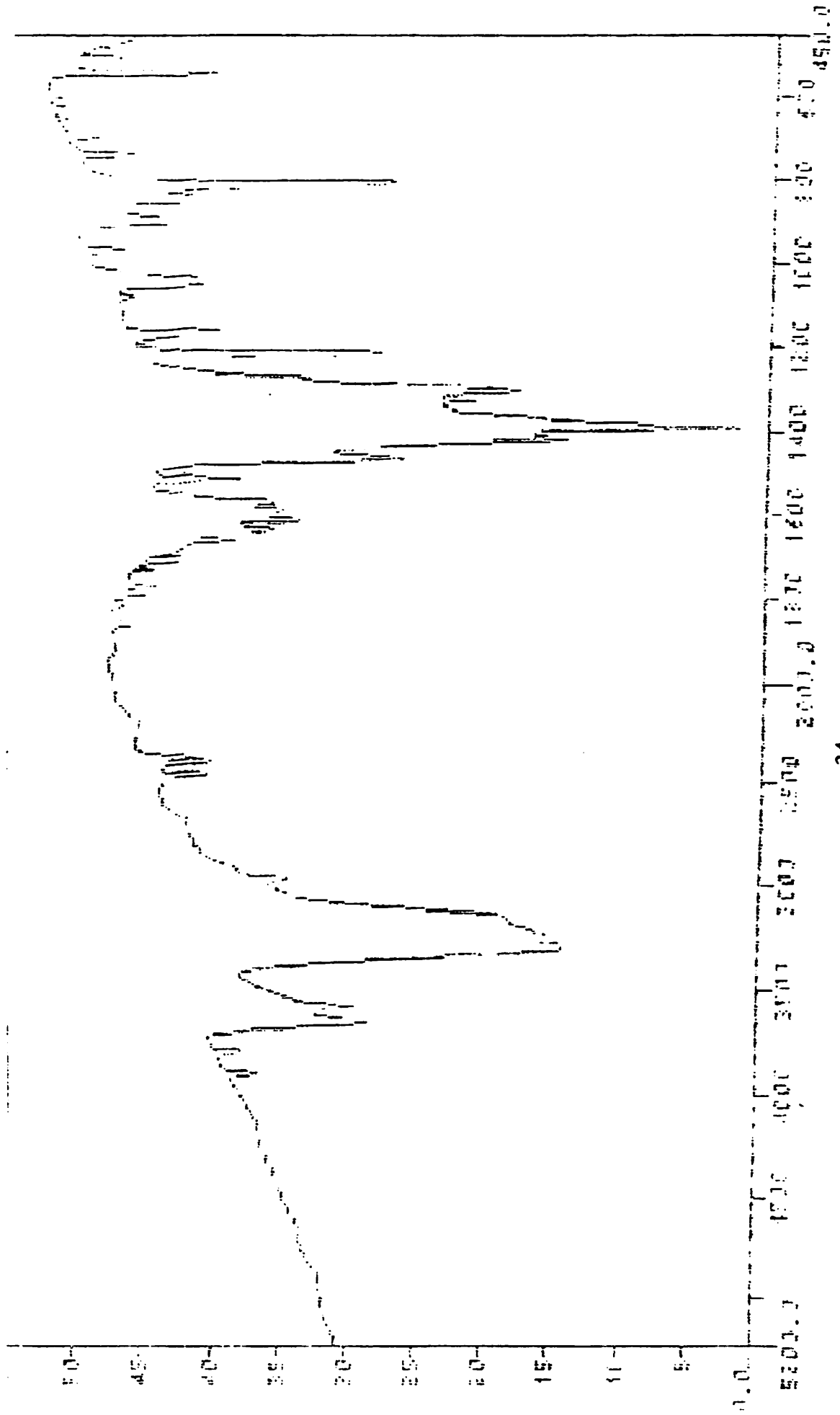
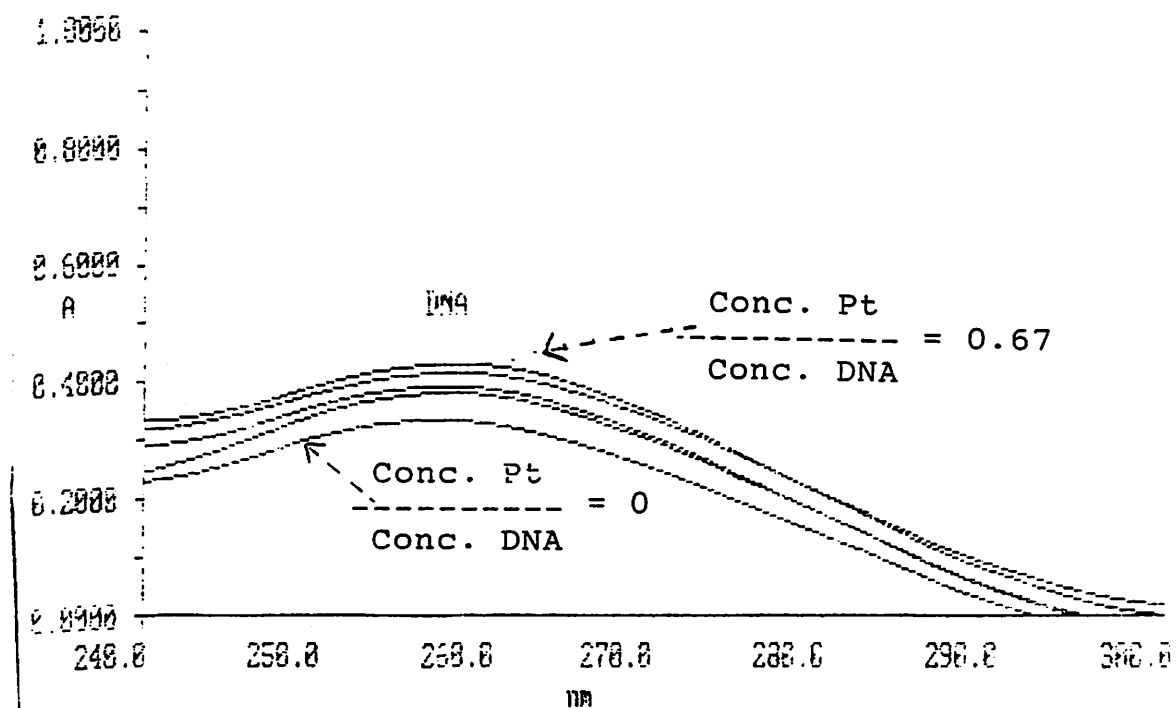




Figura 4.5

Estudio espectrofotométrico de DNA con Nitrato de cis-diaminocloro(2,5-dimetilbenzotiazol) platino (II)



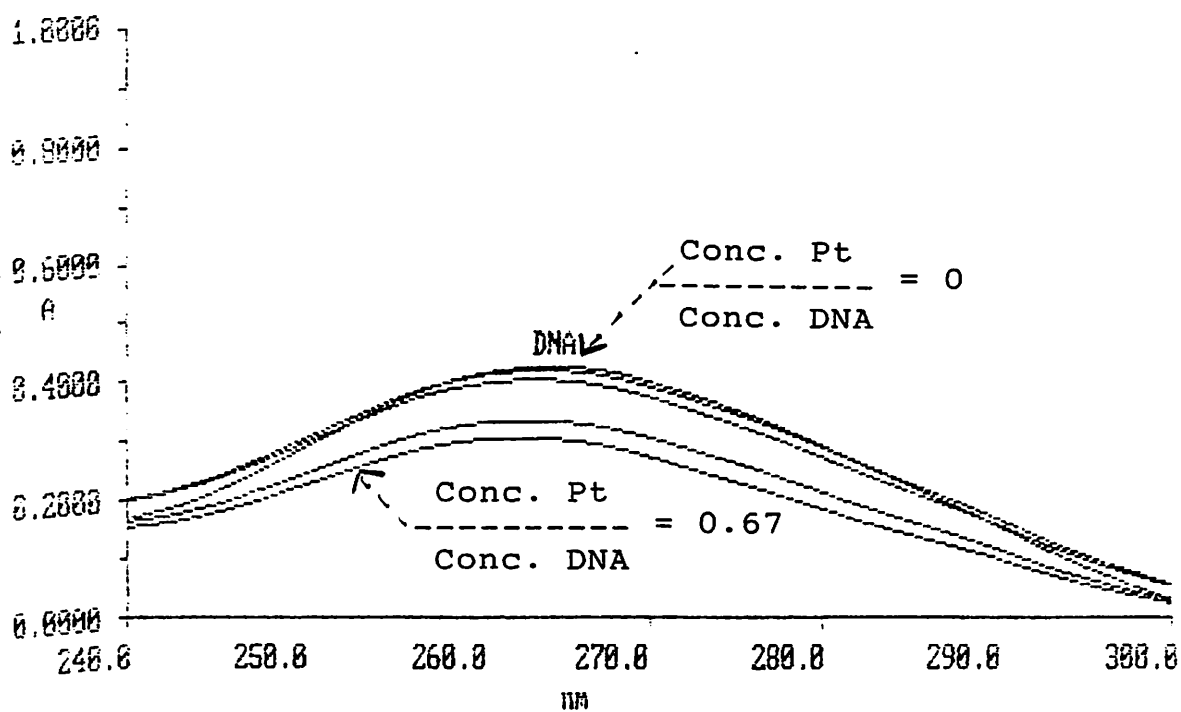
ab. 010117? nos KZ. P. 11
17. 11. 010117 (010117) 11. 11.

11. 11. 11. 11.
11. 11. 11. 11.

11. 11. 11. 11.
11. 11. 11. 11.

Figura 4.6

Estudio espectrofotométrico de DNA con Cisplatin



1875

1875

Estudios de temperatura de desnaturalización del DNA:

Se realizaron experimentos de temperatura de desnaturalización de DNA con el complejo *cis*-diaminocloro(2,5-dimetilbenzotiazol) platino (II), cisplatin y con el complejo *cis*-diaminocloro(1-metilimidazol) platino (II) utilizando distintas razones de $[Pt]/[DNA]$ 0.00, 0.17, 0.33, 0.50, 0.67. Las gráficas de los resultados están en el Apéndice I. Se tomaron los valores máximos para las razones $\Delta A/\Delta T$ en la región de 65-80°C y se presentan en las tablas 4.2 a 4.4. Estos valores máximos corresponden a los puntos de inflexión en dicha región, y dan información sobre la temperatura de fusión, T_m , del DNA. La Tabla 4.2 sugiere que el complejo *cis*- $[Pt(NH_3)_2(2,5-dimebt)Cl]^+$, tiende a disminuir la temperatura de fusión del DNA, sugiriendo que desestabiliza la doble hélice. Las Tablas 4.3 y 4.4 para cisplatin y *cis*- $[Pt(NH_3)_2(1-metilimidazol)Cl]^+$ sugiere que estos compuestos, a las razones Pt/DNA estudiadas, tienden a estabilizar la doble hélice, al aumentar la temperatura de fusión. Estos resultados son consistentes con el estudio espectrofotométrico, aunque deben tomarse con precaución ya que los perfiles de desnaturalización son muy complejos y muestran varios puntos de inflexión. Los cambios más marcados aparecen a temperaturas mayores de 80°C.

1. Préparation de l'émulsion de LBA avec les
 2. composants (II) et (III) et ajout des
 3. composants (IV) et (V) à l'émulsion (II)
 4. Détermination de la composition et du pH de l'émulsion
 5. Préparation de l'émulsion de LBA avec les
 6. composants (II) et (III) et ajout des
 7. composants (IV) et (V) à l'émulsion (II)
 8. Détermination de la composition et du pH de l'émulsion
 9. Préparation de l'émulsion de LBA avec les
 10. composants (II) et (III) et ajout des
 11. composants (IV) et (V) à l'émulsion (II)
 12. Détermination de la composition et du pH de l'émulsion

1984-1985

Tabla 4.2 - Experimento de desnaturalización de DNA con *cis*-[PtCl (NH₃)₂ (2,5-dimetilbenzotiazol)] NO₃

Tm DNA	76°C
Tm DNA + Pt (razón 0.17)	76°C
Tm DNA + Pt (razón 0.33)	74°C
Tm DNA + Pt (razón 0.50)	69°C
Tm DNA + Pt (razón 0.67)	66°C

Analisi di DNA con ca-PIC (NH₂)
concentrazione

70°C
75°C
78°C
80°C
85°C

Tabl

Tabla 4.3 - Experimento de desnaturalización de DNA con cisplatin

T _m DNA	73°C
T _m DNA + Pt (razón 0.17)	76°C
T _m DNA + Pt (razón 0.33)	77°C
T _m DNA + Pt (razón 0.50)	77°C
T _m DNA + Pt (razón 0.67)	75°C

Il sistema di DNA con sequenza

19C
18C
17C
16C
15C

2111 100 111 1111111111

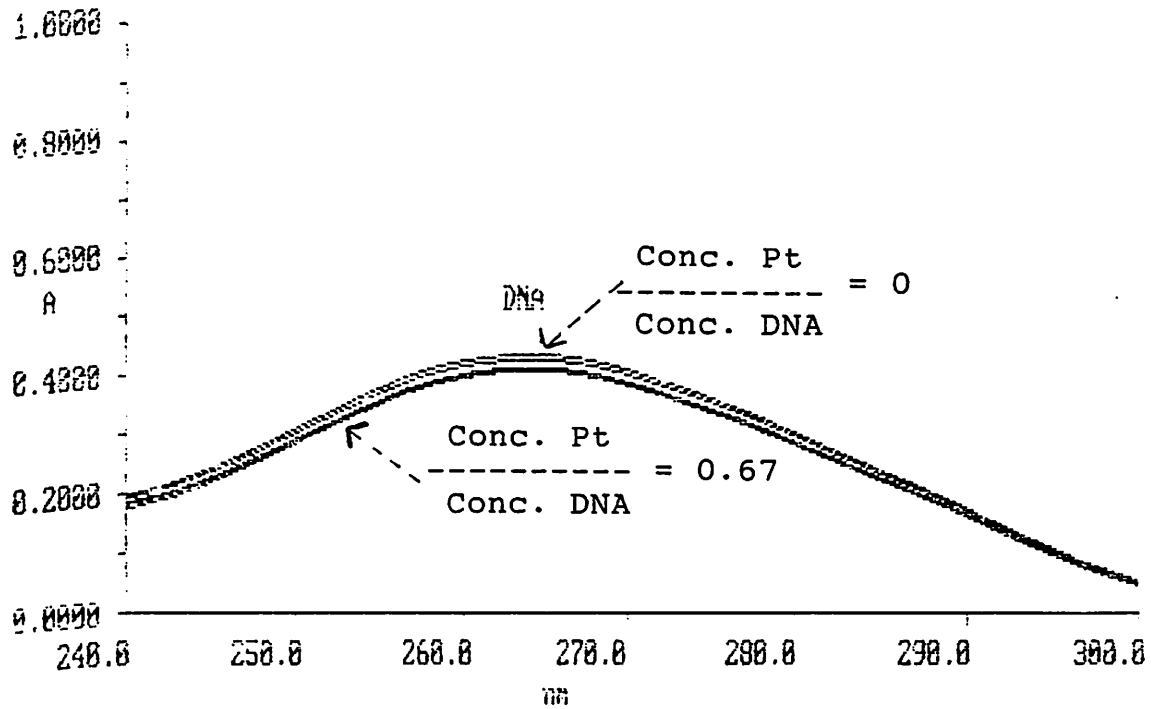
Tabla 4.4 - Experimento de desnaturalización de DNA con *cis*-[PtCl (NH₃)₂ (1-metilimidazol)] NO₃

Tm DNA	72°C
Tm DNA + Pt (razón 0.17)	73°C
Tm DNA + Pt (razón 0.33)	74°C
Tm DNA + Pt (razón 0.50)	76°C
Tm DNA + Pt (razón 0.67)	79°C



Figura 4.7

Estudio espectrofotométrico de DNA con Nitrato de cis-diaminocloro(1-metilimidazol) platino (II)



ad eandem rem per se
(1) ostendit (2) ostendit



Capítulo V

CONCLUSIONES

La síntesis del nuevo complejo catiónico de platino de la forma *cis*-[Pt(NH₃)₂ (A) Cl]⁺ conteniendo el ligando heterocíclico 2,5-dimetilbenzotiazol fue llevada a cabo. La caracterización de este complejo por técnicas de espectroscopía de ¹H-NMR e IR ha sido reportada.

Los estudios realizados con DNA sugieren que este complejo de platino tiene la habilidad de enlazarse a DNA, desestabilizando la doble hélice. Se requerirán estudios biológicos adicionales para saber de qué manera se enlaza al DNA y compararlo con Cisplatin.

CONCLUSIONES

El presente trabajo tiene como objetivo principal el estudio de la síntesis de la forma (S)-(+)-1,2-dipropil-1,2-dipropileno (DIPRO) a partir de la

reacción de la forma (S)-(+)-1,2-dipropil-1,2-dipropileno (DIPRO) con el ácido acético y el ácido propanoico.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la síntesis de la forma (S)-(+)-1,2-dipropil-1,2-dipropileno (DIPRO) a partir de la

reacción de la forma (S)-(+)-1,2-dipropil-1,2-dipropileno (DIPRO) con el ácido acético y el ácido propanoico

se realiza de manera eficiente y selectiva, obteniéndose la forma (S)-(+)-1,2-dipropil-1,2-dipropileno (DIPRO)

con un rendimiento del 85% y una pureza del 95%.

BIBLIOGRAFIA

Bellon, S. F.; Coleman, J. H. y Lippard, S. J., DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II). *Biochemistry* 30, 8026 (1991).

Butour, J. L. y Macquet, J. P., Differentiation of DNA. Platinum complexes by fluorescence. The use of an intercalating dye as a probe. *Eur. J. Biochem.* 78, 455 (1977).

Carter, S. K.; Cisplatin past present and future. In *Platinum Coordination Chemistry in Cancer Chemotherapy*; Hacker, M. P.; Douple, E. B. y Krakoff, L. H. (eds.); pp 359-376 Boston: Martinus Nijhoff Publishing, 1984.

Cleare, M. J., Transition metal complexes in cancer chemotherapy. *Coord. Chem. Rev.* 12, 349 (1974).

Cleare, M. J.; Hydes, P. C.; Hepburn, D. R. y Malerby, B. W. In *Cisplatin current status and new developments* edited by Crooke, S. T; Carter, S. K. (eds.); pp 149-170 New York, 1980.

Cohen, G. L., Ledner, J. A., Bauer, H. M., Ushay, H. M., Caravana, C., Lippard, S. J., Sequence dependent binding of *cis*-dichlorodiammineplatinum (II) to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 2487 (1980).

Farrell, N. P.; de Almeida, S. J. y Skov, K. A., Bis(platinum) complexes containing two platinum *cis*-diammine units. Synthesis and initial DNA-binding studies. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 5018 (1988).

Farrell, N., Tam, T. B., Ha Souchard, J. P., Wimmer, F. L., Cros, S., Johnson, N. P., Cytostatic *trans*-platinum (II) complexes. *J. Med. Chem.* 32, 2240-2241 (1989).

Farrell, N.; Kiley, D. M.; Schimdt, W. y Hacker, M. P., Chemical properties and antitumor activity of complexes of platinum containing substituted sulfoxides [PtCl(R'R"SO) (diamine)]NO₃. Chirality and leaving group ability of sulfoxide affecting biological activity. *Inorg. Chem.* 29, 397 (1990).

Farrell, N.; Kelland, L. R.; Roberts, J. D. y Van Beusichem, M., Activation of *trans* geometry in platinum antitumor complexes; A survey of the cytotoxicity of *trans* complexes containing planar ligands in Murine L1210 and human tumor panels and studies on their mechanism of action. *Cancer Research* 52, 5065 (1992).



Farrell, N., Nonclassical platinum antitumor agents: Perspective for design and development of new drugs complementary to cisplatin. *Cancer Investigation* 11(5), 578 (1993).

Farrell, N., Appleton, T. G., Qu, Y., Roberts, J. D., Soares Fontes, A. P., Skov, K. A., Wu, P. y Zou, Y., Effects of Geometric Isomerism and Ligand Substitution in Bifunctional Dinuclear Platinum Complexes on Binding Properties and Conformational Changes in DNA. *Biochemistry* 34, 15480-15486 (1995).

Heiger-Bernays, W. J., Essigmann, J. M., Lippard, S. J., Effect of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II) and related platinum complexes on eukariotic DNA replication. *Biochemistry* 29, 8461-8466 (1990).

Hollis, L. S.; Amundsen, A. R. y Stern, E. W., Chemical and biological properties of a new series of *cis*-[Pt(NH₃)₂ (N-donor) Cl]⁺. *J. Med. Chem.* 32, 128 (1989).

Hollis, L. S.; Sundquist, W.I.; Burstyn, J. N.; Heiger-Bernays, W. J.; Bellon, S. F.; Ahmed, K. J.; Amundsen, A. R.; Stern, E. W., Lippard, S. J., Mechanistic studies of a novel class of trisubstituted platinum (II) antitumor agents. *Cancer Research* 51, 1866 (1991).

Horacek, P., *J. Biochim. Biophys. Acta*, 254-341 (1971).

Howe-Grant, M.; Wu, K. C.; Bauer, W. R. y Lippard, S. J., Binding of platinum and palladium metallointercalation reagents and antitumor drugs to close and open DNAs. *Biochemistry* 15, 4339 (1976).

Huang, H.; Zhu, L.; Reid, B. R.; Drobny, G. P. y Hopkins, P. B., Solution Structure of a Cisplatin-Induced DNA Interstrand Cross-Link. *Science* 270, 1842-1844 (1995).

Lempers, E. L. M. y Reedjik, J., Interaction of platinum amine compounds with sulfur containing biomolecules and DNA fragments. *Advances in Inorganic Chemistry* 37, 175 (1991).

Lippert, B., Platinum Nucleobase Chemistry. In *Progress in Inorganic Chemistry*, 37; Lippard, S. J. (ed) pp. 1-97 New York (1989).

Loehrer, P. J., Einhorn, L. H., Cisplatin. *Ann. Inter. Med.* 100 (5), 704 (1984).

Muir, M.; Gómez, G.; Cádiz, M. y Muir, J. A., Synthesis and characterization of new platinum (II) complexes containing thiazole and imidazole donors. *Inorganica Chimica Acta* 168, 47 (1990).

Nakamoto, K.; *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Fourth Edition, John Wiley and Son, New York, 1986.

... (1977) ...

... (1978) ...

... (1979) ...

... (1980) ...

... (1981) ...

... (1982) ...

... (1983) ...

... (1984) ...

... (1985) ...

... (1986) ...

... (1987) ...

... (1977) ... (1978) ... (1979) ... (1980) ... (1981) ... (1982) ... (1983) ... (1984) ... (1985) ... (1986) ... (1987) ...

Pinto, A. L., Lippard, S. J., Sequence-dependent termination of *in vitro* DNA synthesis by *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum (II). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(14), 4616 (1985).

Prestayko, A. W., D'Aoust, J. C., Isell, B. F. y Crooke, S. T. 1980. Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat. Rev.* 6: 17-39.

Reedjick, J.; Fishtinger-Schepman, A. J.; Oosteron, A. J. y Van de Putte, P., Platinum ammine coordination compounds as antitumor drugs. Molecular aspects of the mechanism of action. *Structure and Bonding* 67, 53 (1987).

Reedjick, J., The relevance of hydrogen bonding in the mechanism of action of platinum antitumor complexes. *Inorganica Chimica Acta* 198-200, 873 (1992).

Roberts, J. J., Friedlos, F., The frequency of interstrand crosslinks in DNA following reaction of *cis*-diamminedichloroplatinum (II) with cells in culture or DNA *in vitro*: stability of DNA crosslinks and their repair. *Chem. Biol. Inter.* 39, 181 (1982).

Roberts, J. J., Thomson, A. J., The mechanism of action of antitumor platinum compounds. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 22, 71 (1979).

Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T., Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from platinum electrode. *Nature (London)* 205, 698-699 (1965).

Rosenberg, B., Van Camp, L., Thompson, A. J., The inhibition of growth of cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. *J. Biol. Chem.* 242 (6), 1347-1352 (1967).

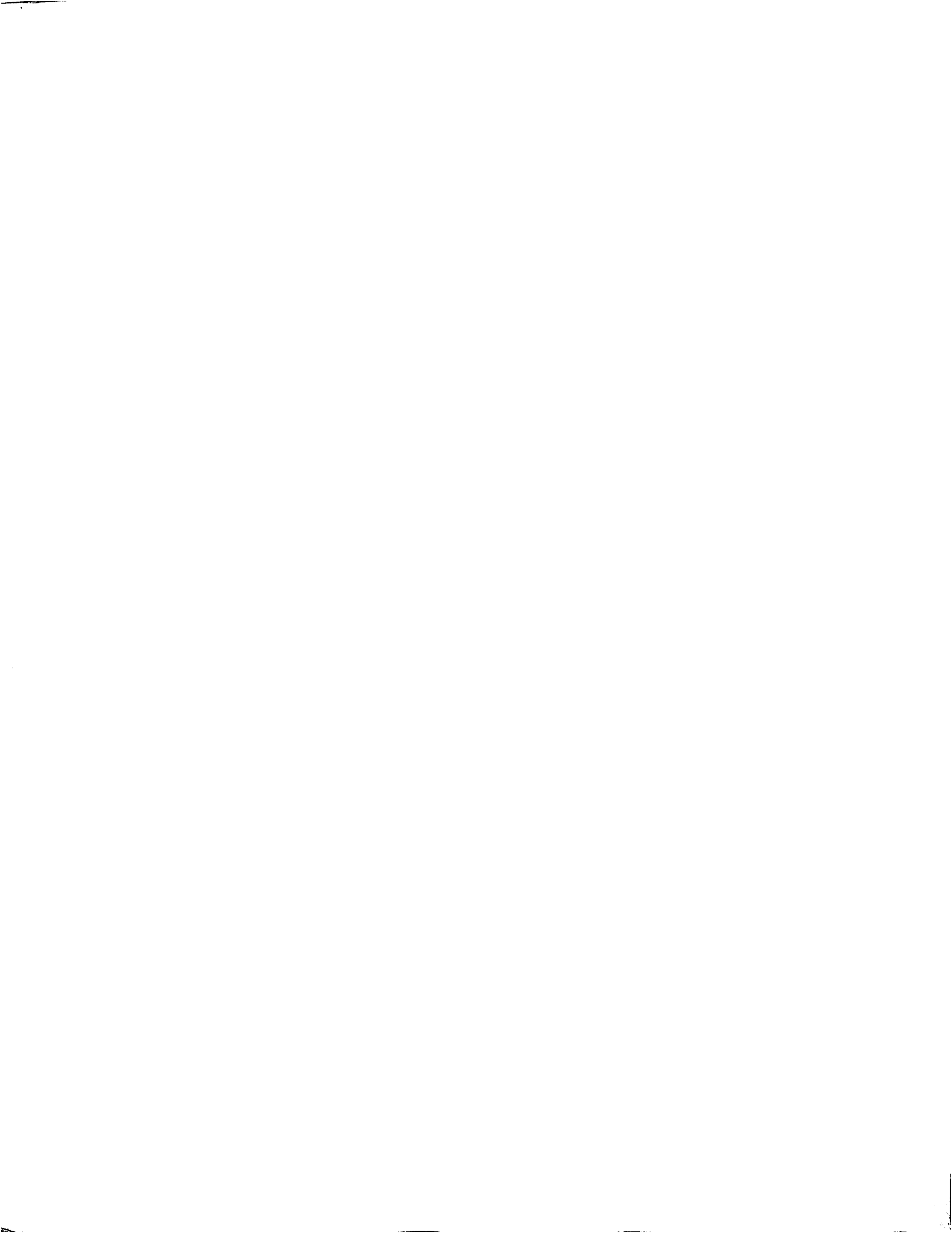
Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Trosko, J. E. y Mansour, V., Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents. *Nature (London)* 222, 385 (1969).

Rosenberg, B.: *Nucleic Acid-Metal Ion Interactions*, edited by Spiro, T. J., New York, 1980, pp 3-29.

Sherman, S. E. y Lippard, S. J., Structural aspects of platinum anticancer drug interaction with DNA. *Chem. Rev.* 87, 1153 (1987).

Skov, K. A., Adomat, H., Chaplin, D. J., Farrell, N. P., Toxicity of $[PtCl_2(NH_3)L]$ in hypoxi; L= misonidazole or metronidazole. *Anti-cancer Drug Design* 5, 121-128 (1990).

Sunquist, W. I., Lippard, S. J., Stollar, B. D., Binding of *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum (II) to deoxyribonucleic acid exposes nucleosides as measured immunochemically with antinucleoside antibodies. *Biochemistry* 25(7), 1520 (1986).



Sunquist, W. I. y Lippard, S. J., The coordination chemistry of platinum anticancer drugs and related compounds with DNA. *Coordination Chemistry Reviews* 100, 293 (1990).

Takayara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A. y Lippard, S. J., Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* 377, 649-652 (1995).

Tullius, T. D., Lippard, S. J., *cis*-Diamminedichloroplatinum (II) binds in a unique manner to oligo (dG) . oligo (dC) sequences in DNA-a new assay using exonucleases (III). *J. Am. Chem. Soc.* 103, 4620 (1981).

Ushay, H. M., Tullius, T. D., Lippard, S. J., Inhibition of the BamHI cleavage and unwinding of pBR3322 deoxyreosucleic acid by the antitumor drug *cis*-dichlorodiammineplatinum (II). *Biochemistry* 20, 37-44 (1981).

Van Beusichem, M. y Farrell, N., Activation of the *trans* geometry in platinum antitumor complexes. Synthesis, characterization and biological activity of complexes with planar ligands pyridine, N-methylimidazole, thiazole, and quinoline. Crystal and molecular structure of *trans*-dichlorobis (thiazole) platinum (II). *Inorg. Chem.* 31, 634 (1992).

Weaver, J. A.; Hambright, P.; Talbert, P. T.; Kang, E. y Thorpi, A. N., Complexes of thiazoles I Zinc (II), Cobalt (II), Copper (II), Nickel (II), and Platinum (II) derivatives of alkyl-substituted thiazoles. *Inorg. Chem.* 9, 268-273 (1970).

Zwelling, L. A.; Anderson, T. y Kohn, K. W., DNA-protein and DNA interstrand cross-linking by *cis* and *trans* platinum (II) diamminedichloride in L1210 mouse leukemia cells and relation to cytotoxicity. *Cancer Research* 39, 365 (1979).

... of ... (1990)

... of ... (1991)

... of ... (1992)

... of ... (1993)

... of ... (1994)

... of ... (1995)

... of ... (1996)

APENDICE I

GRAFICAS DE TEMPERATURA DE DESNATURALIZACION: ABSORBANCIA VERSUS TEMPERATURA Y $\Delta A/\Delta T$ VERSUS TEMPERATURA

* Nitrato de *cis*-diaminocloro(2,5-dimetilbenzotiazol) platino II - Gráficas 1-10

* Cisplatin - Gráficas 11-20

* Nitrato de *cis*-diaminocloro(1-metilimidazol) platino II - Gráficas 21-30

* Las razones utilizadas para cada compuesto fueron: 0.00, 0.17, 0.33, 0.50 y 0.67 respectivamente.

INDEX

ALGEBRAIC GEOMETRY 1-10

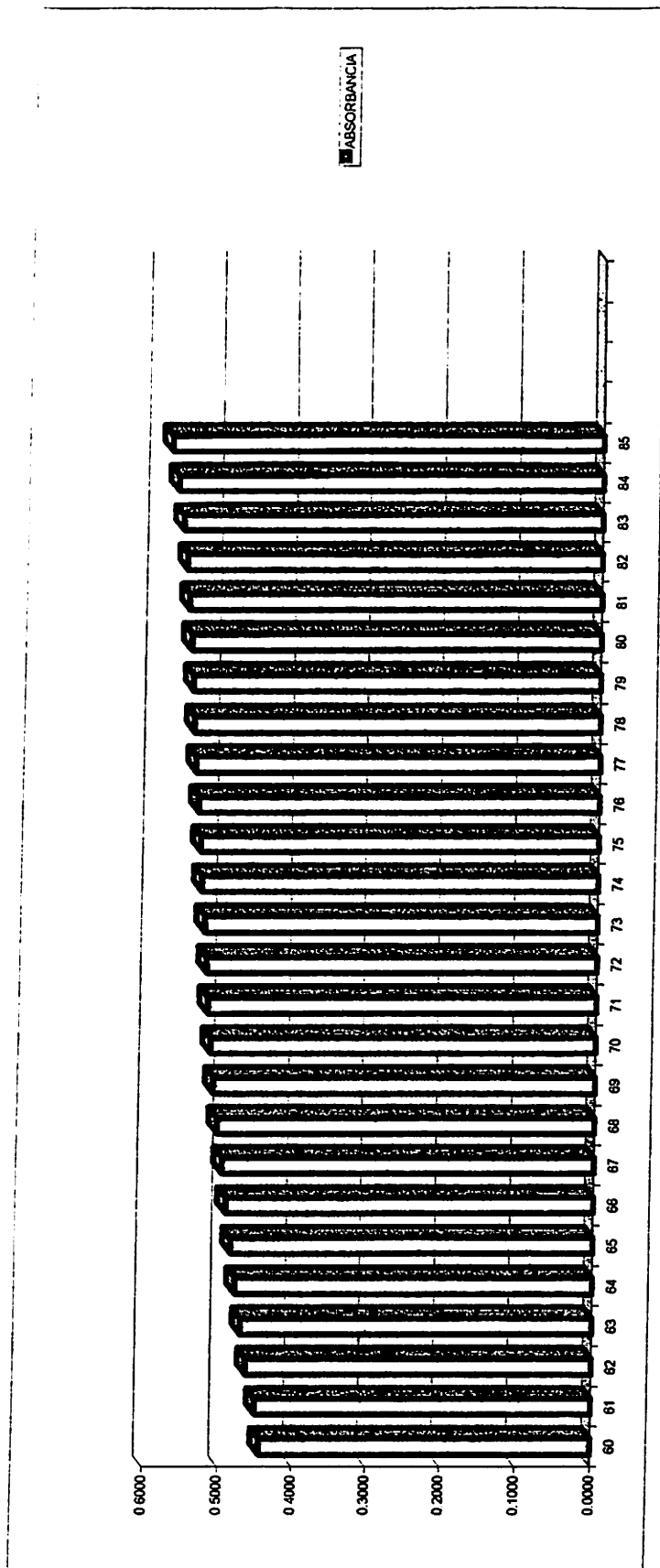
ALGEBRAIC TOPOLOGY 1-10

ALGEBRAIC TOPOLOGY 1-10

ALGEBRAIC TOPOLOGY 1-10

ALGEBRAIC TOPOLOGY 1-10

TEMPERATURA	ABSORBANCIA
60	0.4453
61	0.4511
62	0.4638
63	0.4718
64	0.4801
65	0.4862
66	0.4935
67	0.4998
68	0.5065
69	0.5123
70	0.5168
71	0.5212
72	0.5240
73	0.5289
74	0.5315
75	0.5339
76	0.5373
77	0.5415
78	0.5441
79	0.5467
80	0.5497
81	0.5533
82	0.5572
83	0.5632
84	0.5703
85	0.5795



1917

1918

1919

1920

1921

1922

1923

1924

1925

1926

1927

1928

1929

1930

1931

1932

1933

1934

1935

1936

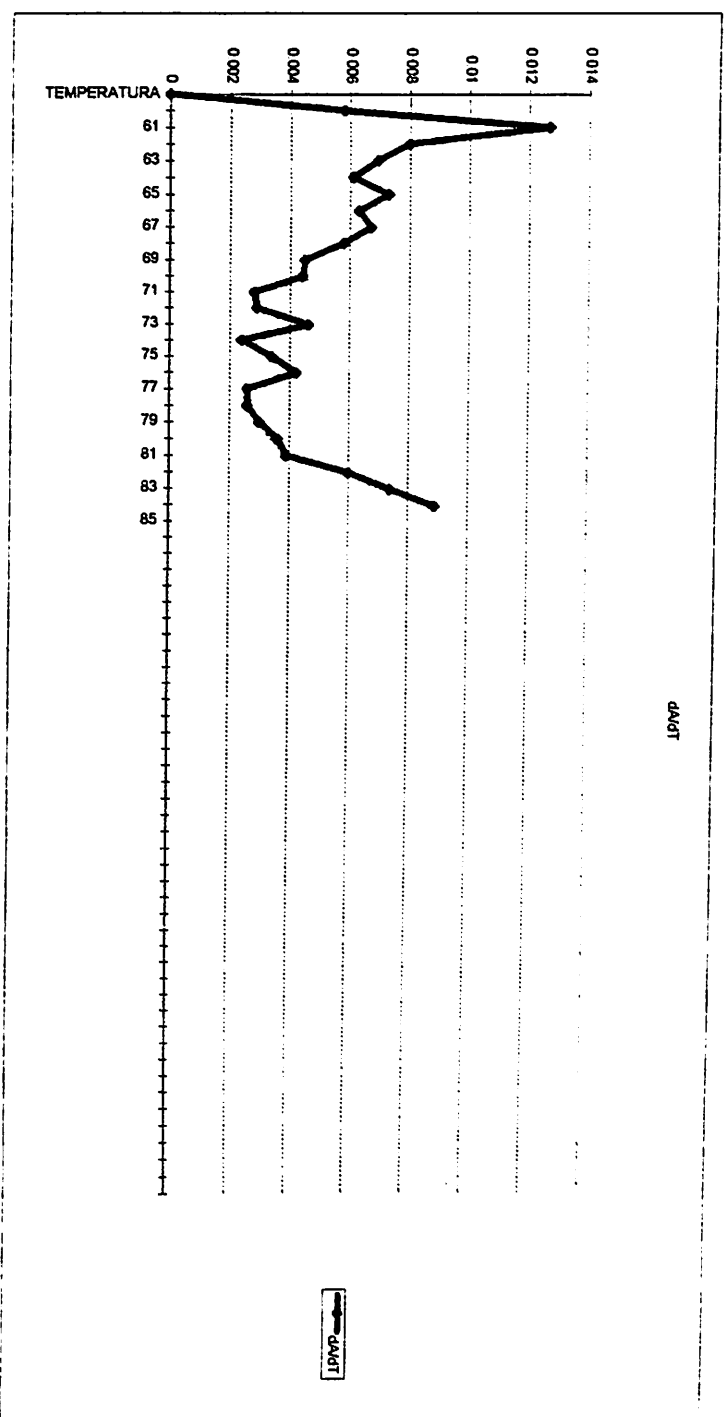
1937

1938

1939

dA/dT DNA

TEMPERATURA	dA/dT	ABSORBANCIA
60	0.0058	0.4453
61	0.0127	0.4511
62	0.008	0.4638
63	0.00694	0.4718
64	0.0061	0.4801
65	0.0073	0.4862
66	0.0063	0.4935
67	0.0067	0.4988
68	0.0058	0.5065
69	0.0045	0.5123
70	0.0044	0.5188
71	0.0028	0.5212
72	0.0029	0.5240
73	0.0046	0.5269
74	0.0024	0.5315
75	0.0034	0.5339
76	0.0042	0.5373
77	0.0026	0.5415
78	0.0030	0.5441
79	0.0036	0.5467
80	0.0039	0.5497
81	0.0060	0.5533
82	0.0074	0.5572
83	0.0074	0.5632
84	0.0089	0.5706
85		0.5795



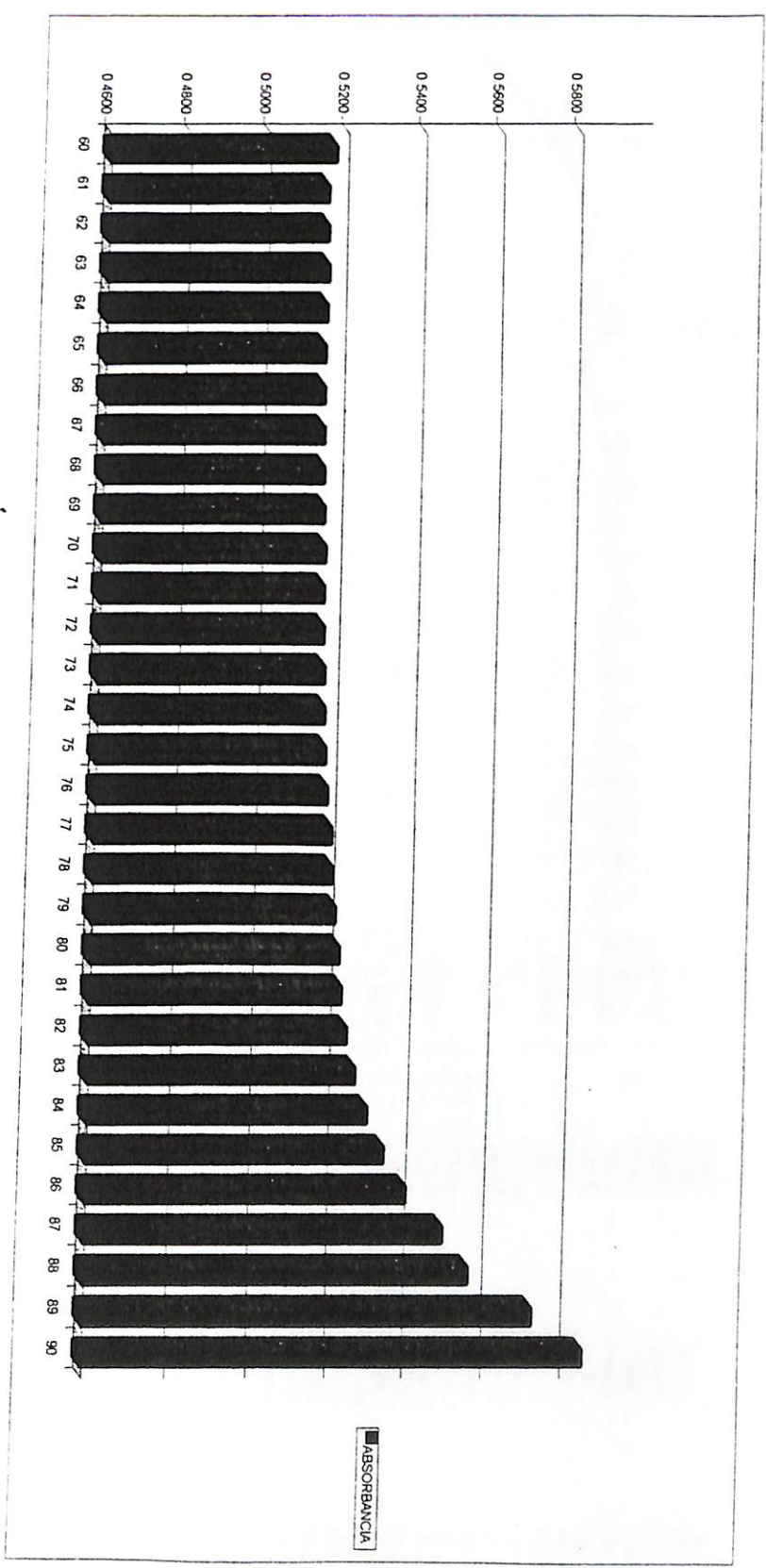
AMD TblAb

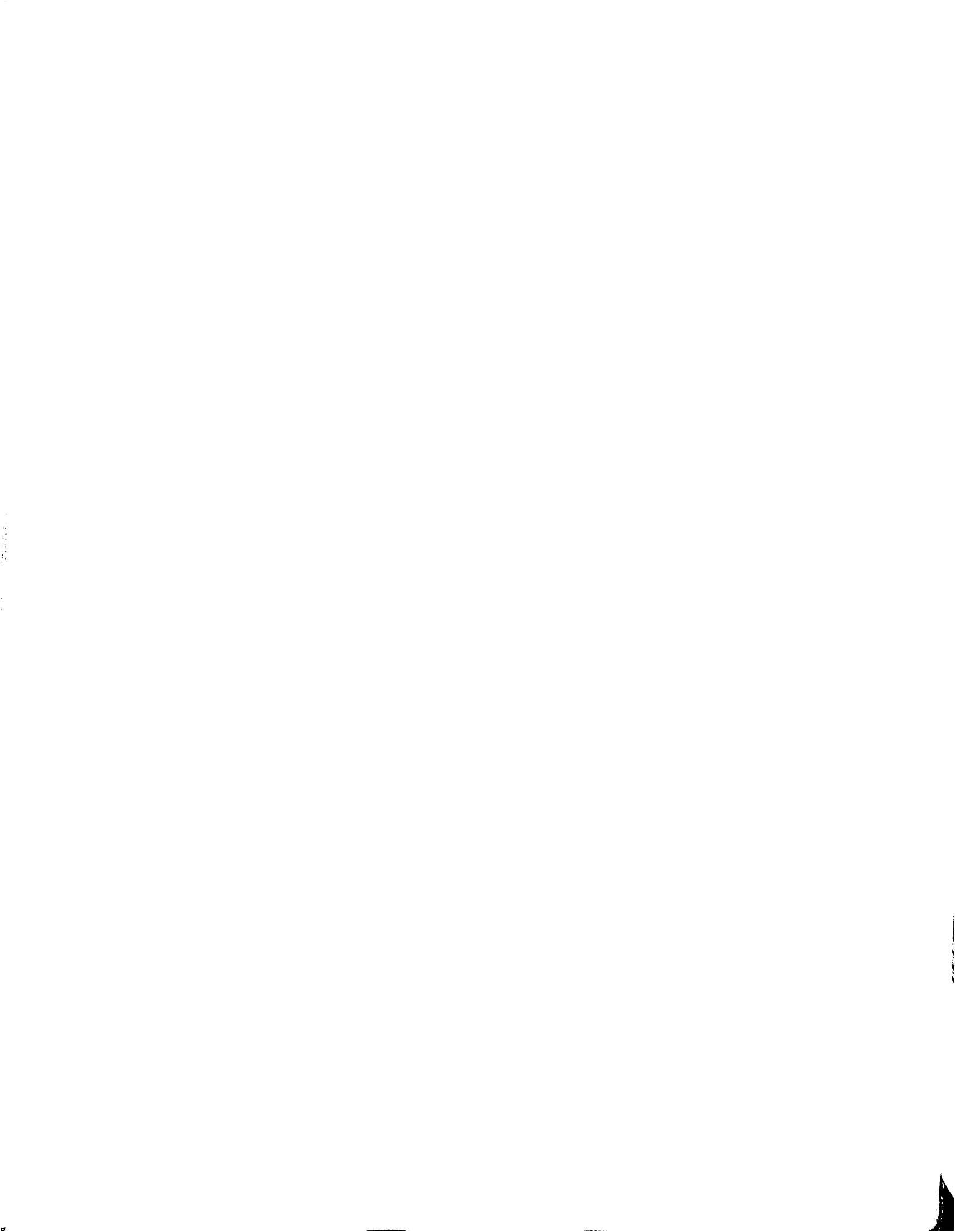
1/1/2000



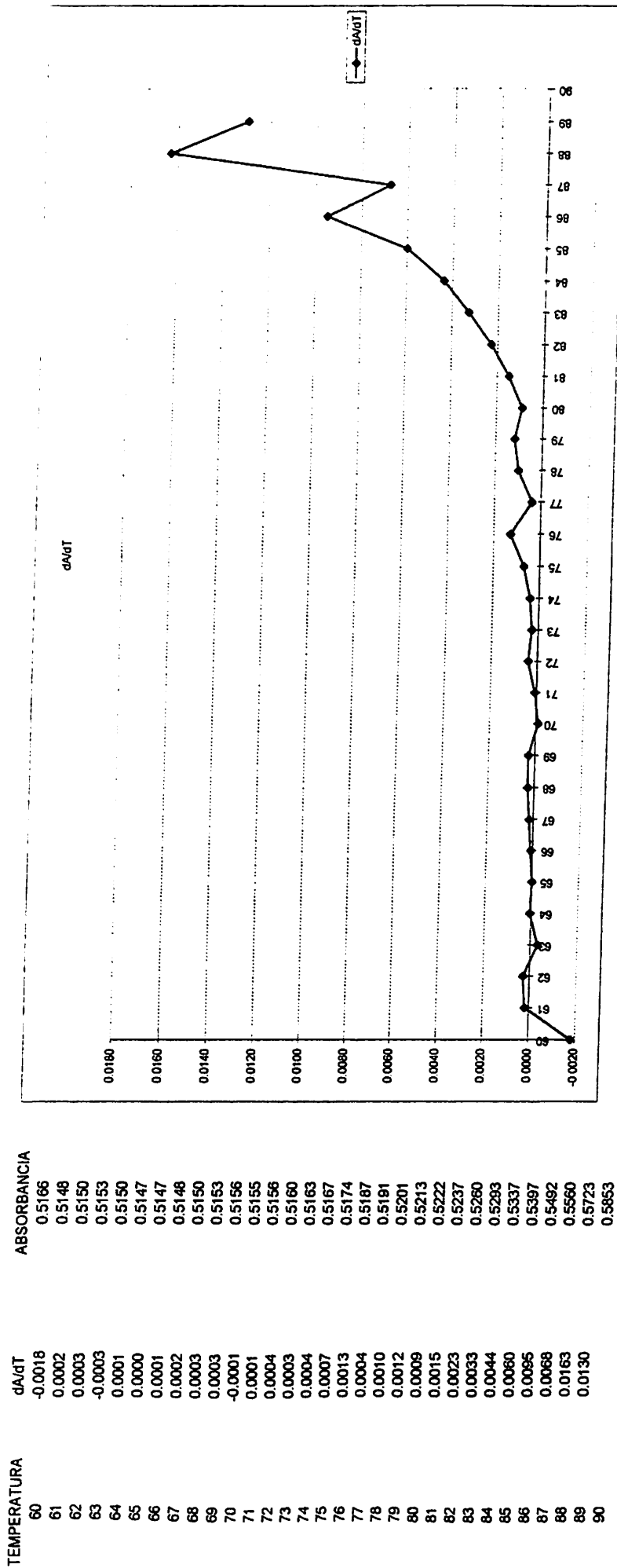
Tm DNA+Complejo de Cisplatin con 2,5-Dimetilbenzotiazol (como ligando)

TEMPERATURA	ABSORBANCIA
60	0.5186
61	0.5148
62	0.5150
63	0.5153
64	0.5150
65	0.5147
66	0.5147
67	0.5148
68	0.5150
69	0.5153
70	0.5156
71	0.5155
72	0.5156
73	0.5160
74	0.5163
75	0.5167
76	0.5174
77	0.5187
78	0.5191
79	0.5201
80	0.5213
81	0.5222
82	0.5237
83	0.5260
84	0.5293
85	0.5337
86	0.5397
87	0.5492
88	0.5560
89	0.5723
90	0.5853





AAAT-DNA-Complejo de Cisplatín con 2,5-Dimetilbenzotiazol (como ligando)





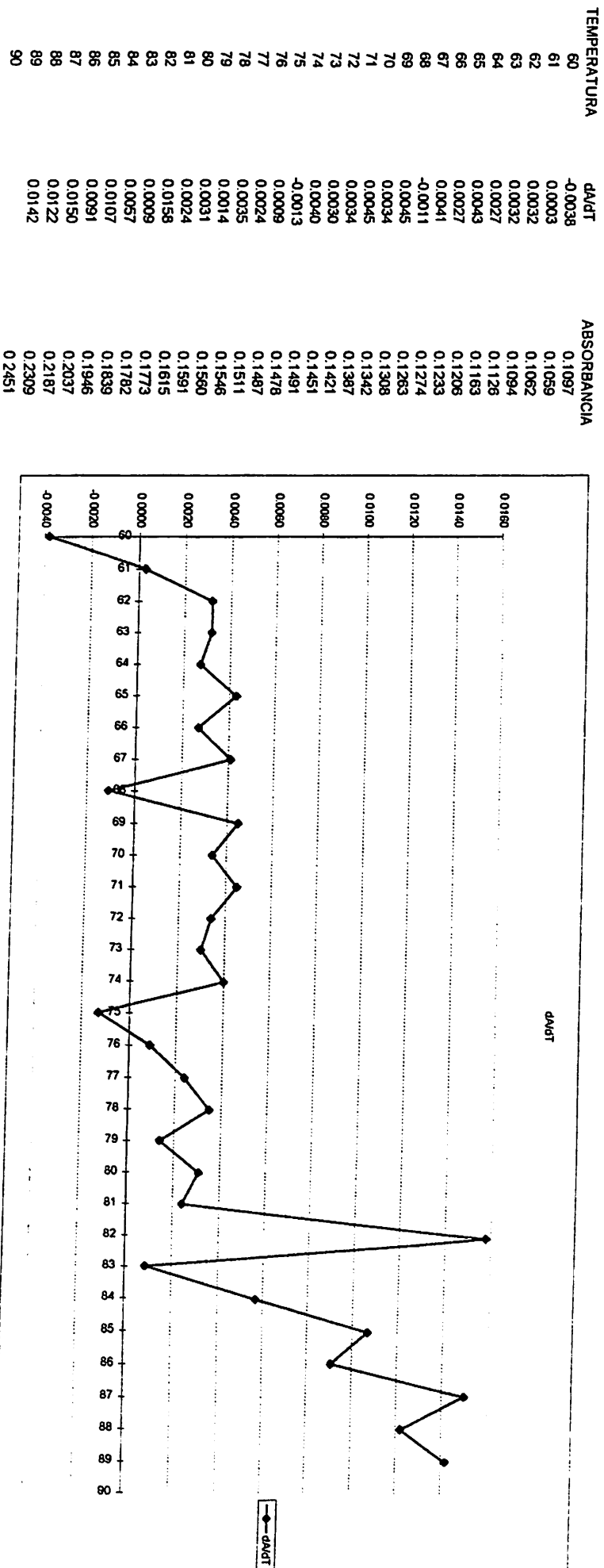
(cont. page 10)

Tm DNA+Complejo de Cisplatin con 2,5-Dimetilbenzotiazol (como ligando)

TEMPERATURA	ABSORBANCIA
60	0.1097
61	0.1059
62	0.1062
63	0.1094
64	0.1126
65	0.1163
66	0.1206
67	0.1233
68	0.1274
69	0.1263
70	0.1308
71	0.1342
72	0.1387
73	0.1421
74	0.1451
75	0.1491
76	0.1478
77	0.1487
78	0.1511
79	0.1546
80	0.1560
81	0.1591
82	0.1615
83	0.1773
84	0.1782
85	0.1839
86	0.1946
87	0.2037
88	0.2187
89	0.2309
90	0.2451



dA/dT DNA+Complejo de Cisplatin con 2,5-Dimetilbenzotiazol (como ligando)



CHICAGO, ILLINOIS

1954

1955

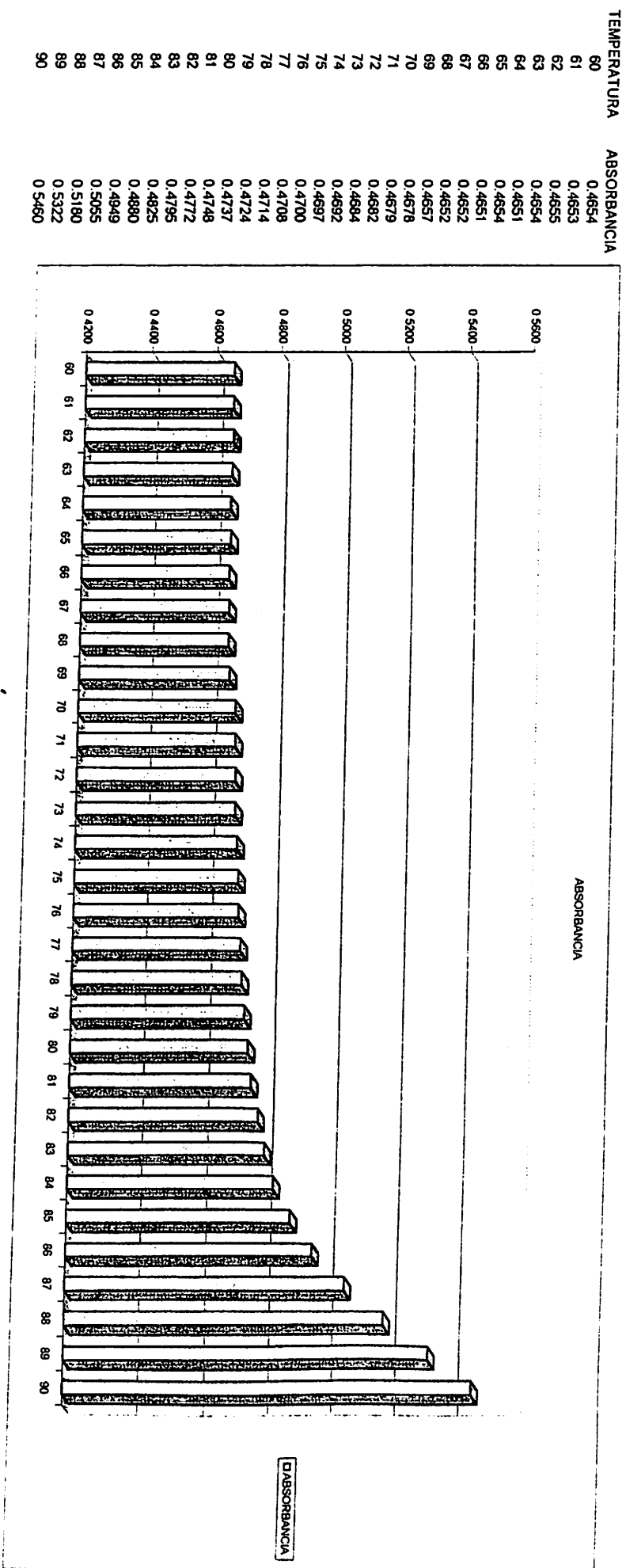
1956

1957

1958

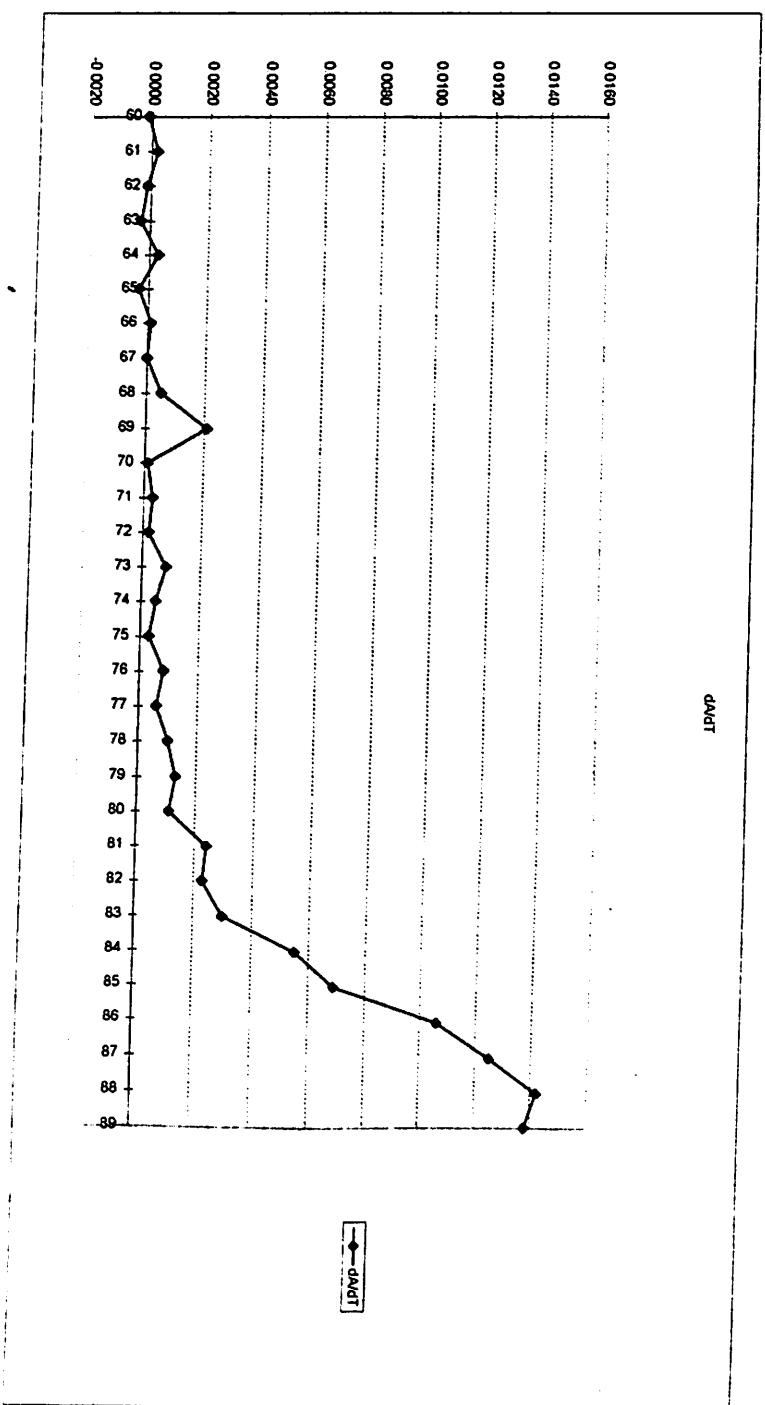
1959

Tm DNA+Complejo de Cisplatin con 2,5-Dimetilbenzotiazol (como ligando)



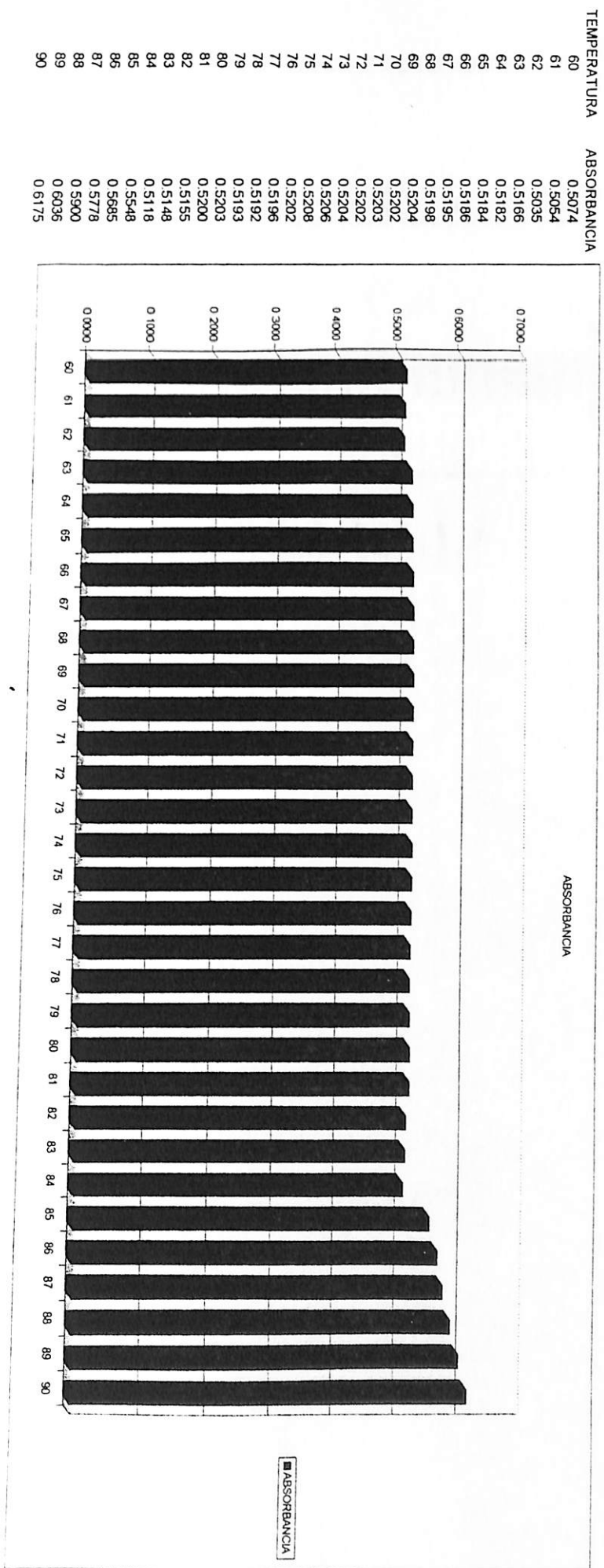
dA/dT DNA+Complejo de Cisplatin con 2,5-Dimetilbenzotiazol (como ligando)

TEMPERATURA	dA/dT	ABSORBANCIA
60	-0.0001	0.4654
61	0.0002	0.4653
62	-0.0001	0.4655
63	-0.0003	0.4654
64	0.0003	0.4651
65	-0.0003	0.4654
66	0.0001	0.4651
67	0.0000	0.4652
68	0.0005	0.4652
69	0.0021	0.4657
70	0.0001	0.4678
71	0.0003	0.4679
72	0.0002	0.4682
73	0.0008	0.4684
74	0.0005	0.4682
75	0.0003	0.4697
76	0.0008	0.4700
77	0.0010	0.4708
78	0.0006	0.4714
79	0.0013	0.4724
80	0.0011	0.4737
81	0.0024	0.4748
82	0.0023	0.4772
83	0.0030	0.4795
84	0.0055	0.4825
85	0.0069	0.4880
86	0.0106	0.4948
87	0.0125	0.5055
88	0.0142	0.5180
89	0.0138	0.5322
90		0.5460





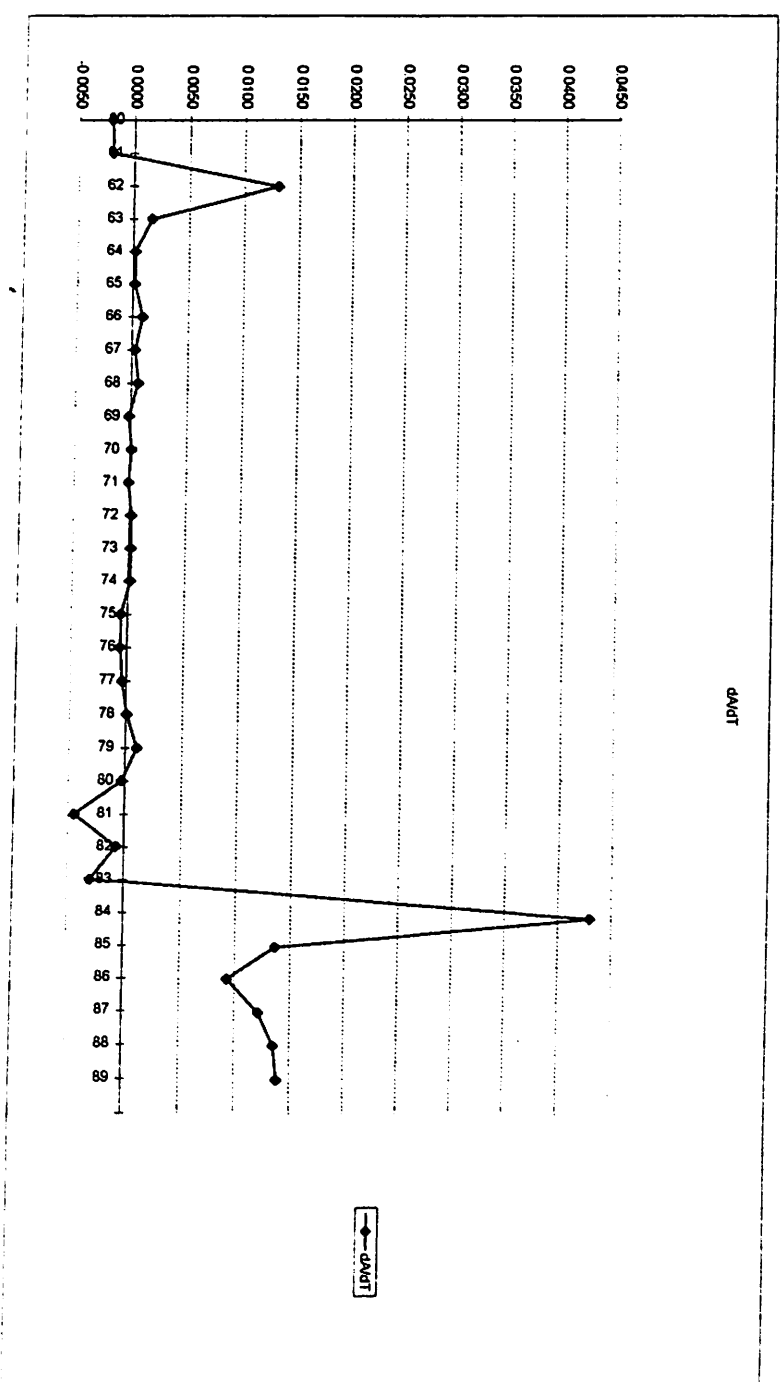
Tm DNA+Complejo de Cisplatin con 2,5-Dimetilbenzotiazol (como ligando)

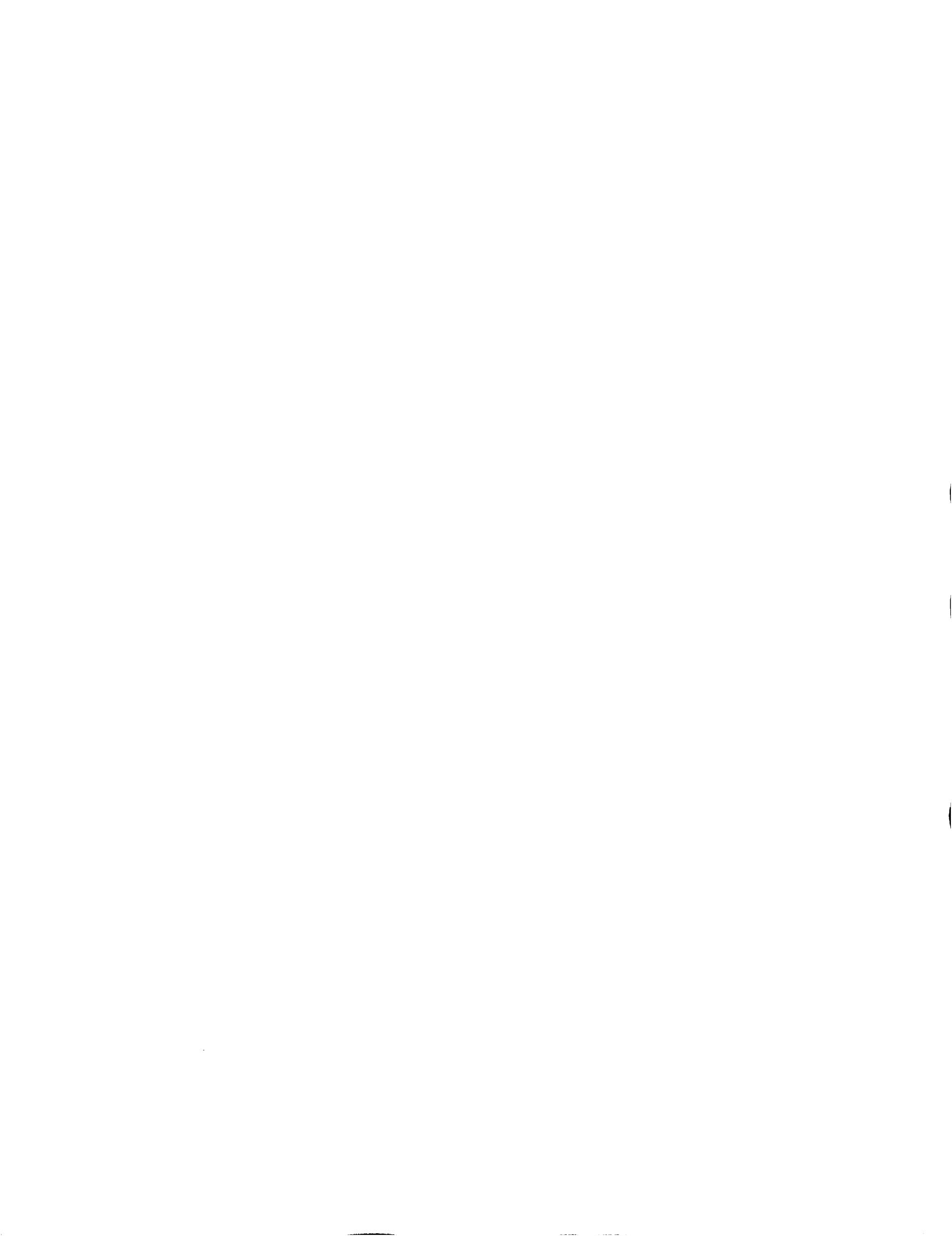


1
2
3
4

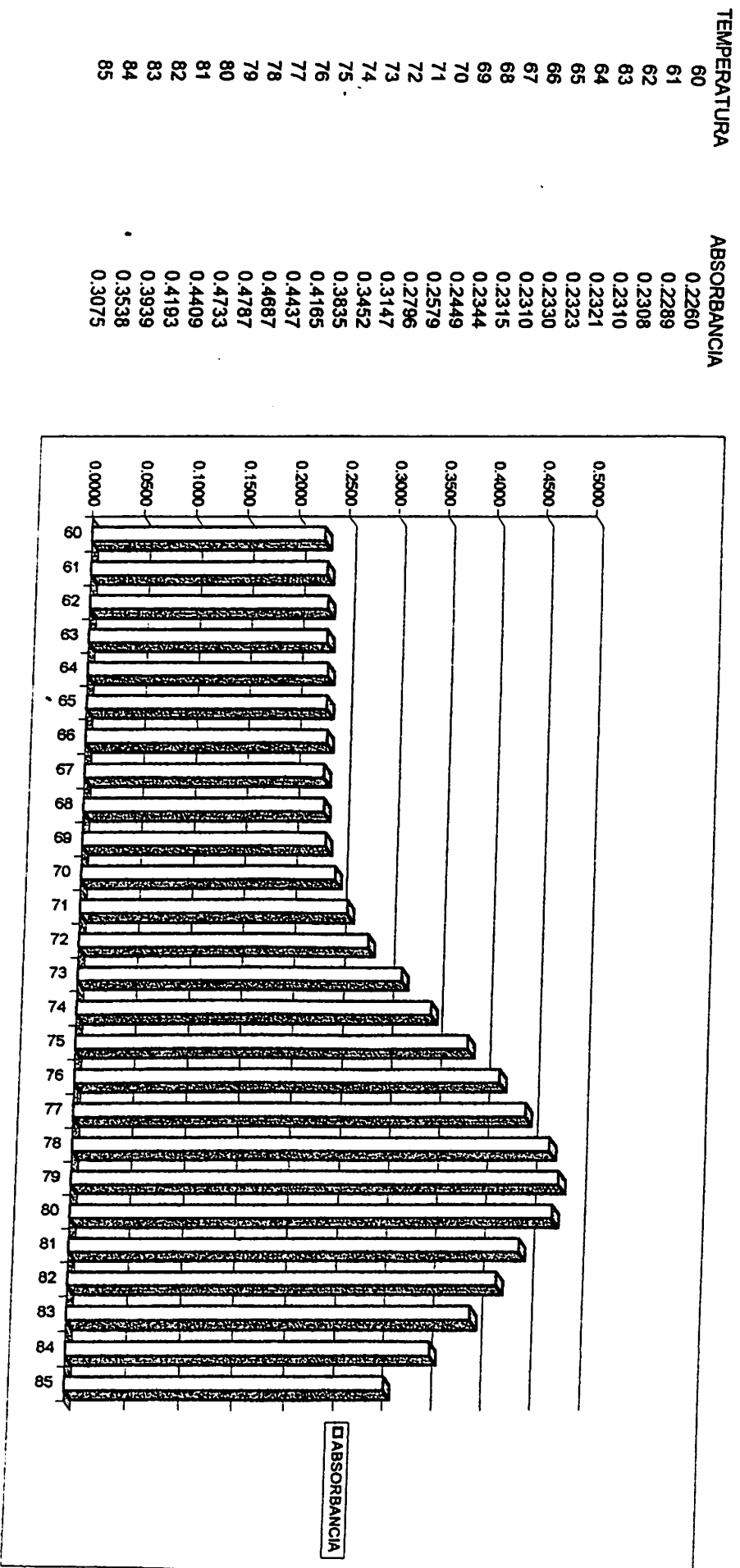
da/dT DNA+Complejo de Cisplatin con 2,5-Dimetilbenzotiazol (como ligando)

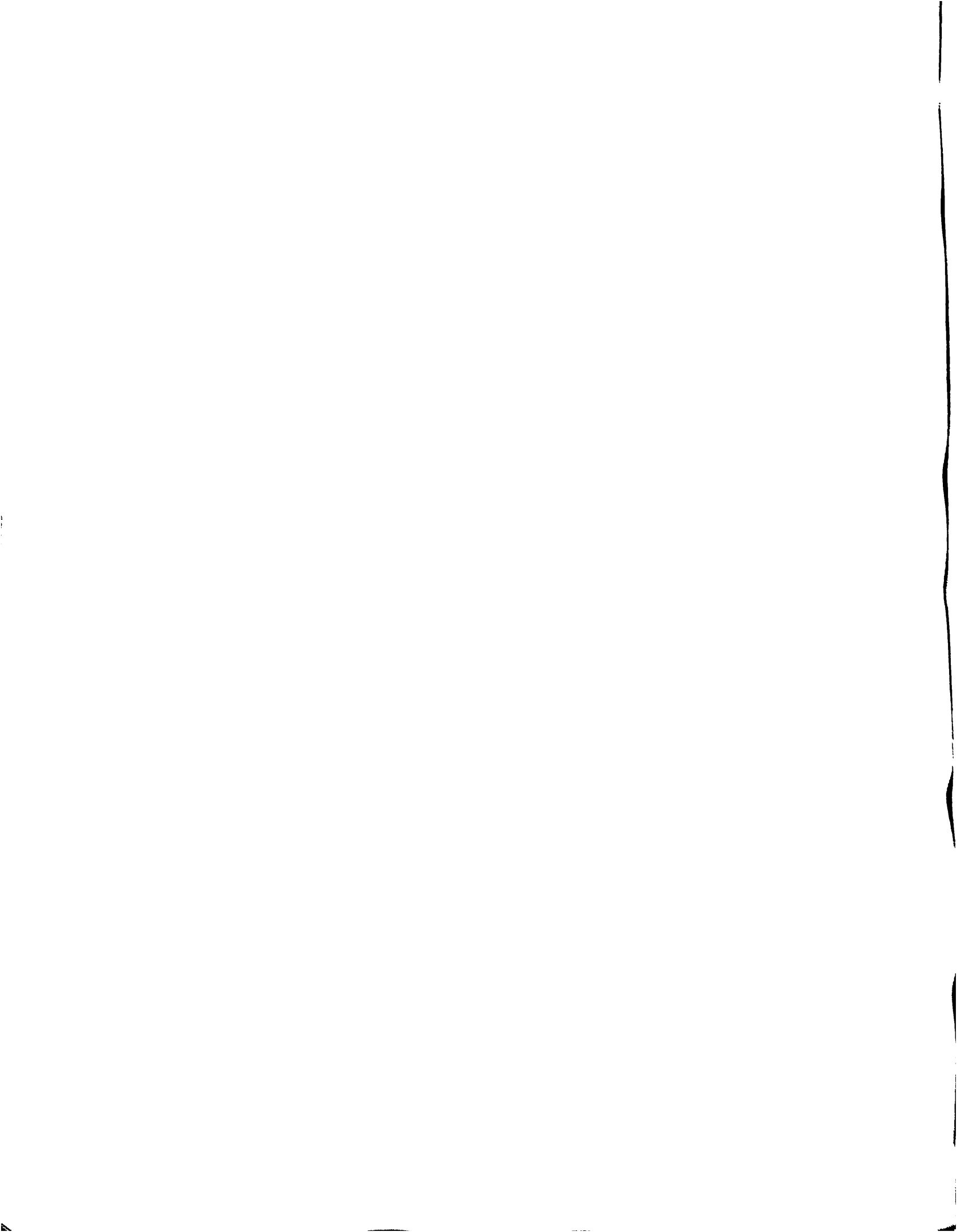
TEMPERATURA	da/dT	ABSORBANCIA
60	-0.0020	0.5074
61	-0.0019	0.5054
62	0.0131	0.5035
63	0.0016	0.5166
64	0.0002	0.5182
65	0.0002	0.5184
66	0.0009	0.5186
67	0.0003	0.5195
68	0.0006	0.5198
69	-0.0002	0.5204
70	0.0001	0.5202
71	-0.0001	0.5203
72	0.0002	0.5202
73	0.0002	0.5204
74	0.0002	0.5206
75	-0.0006	0.5208
76	-0.0006	0.5202
77	-0.0004	0.5196
78	0.0001	0.5192
79	0.0010	0.5193
80	-0.0003	0.5203
81	-0.0045	0.5200
82	-0.0007	0.5155
83	-0.0030	0.5148
84	0.0430	0.5118
85	0.0137	0.5548
86	0.0093	0.5685
87	0.0122	0.5778
88	0.0136	0.5900
89	0.0139	0.6036
90		0.6175





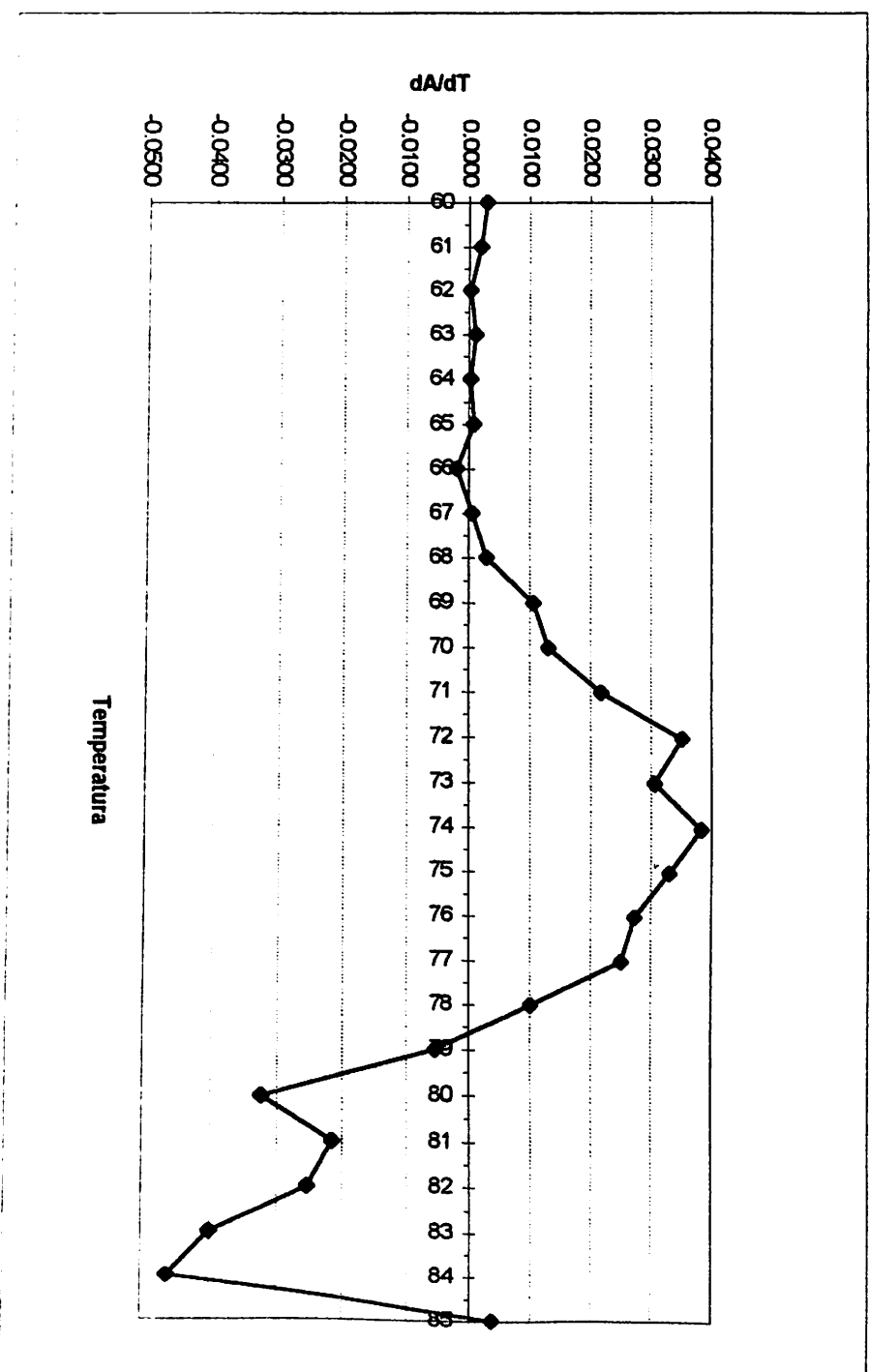
T_m DNA

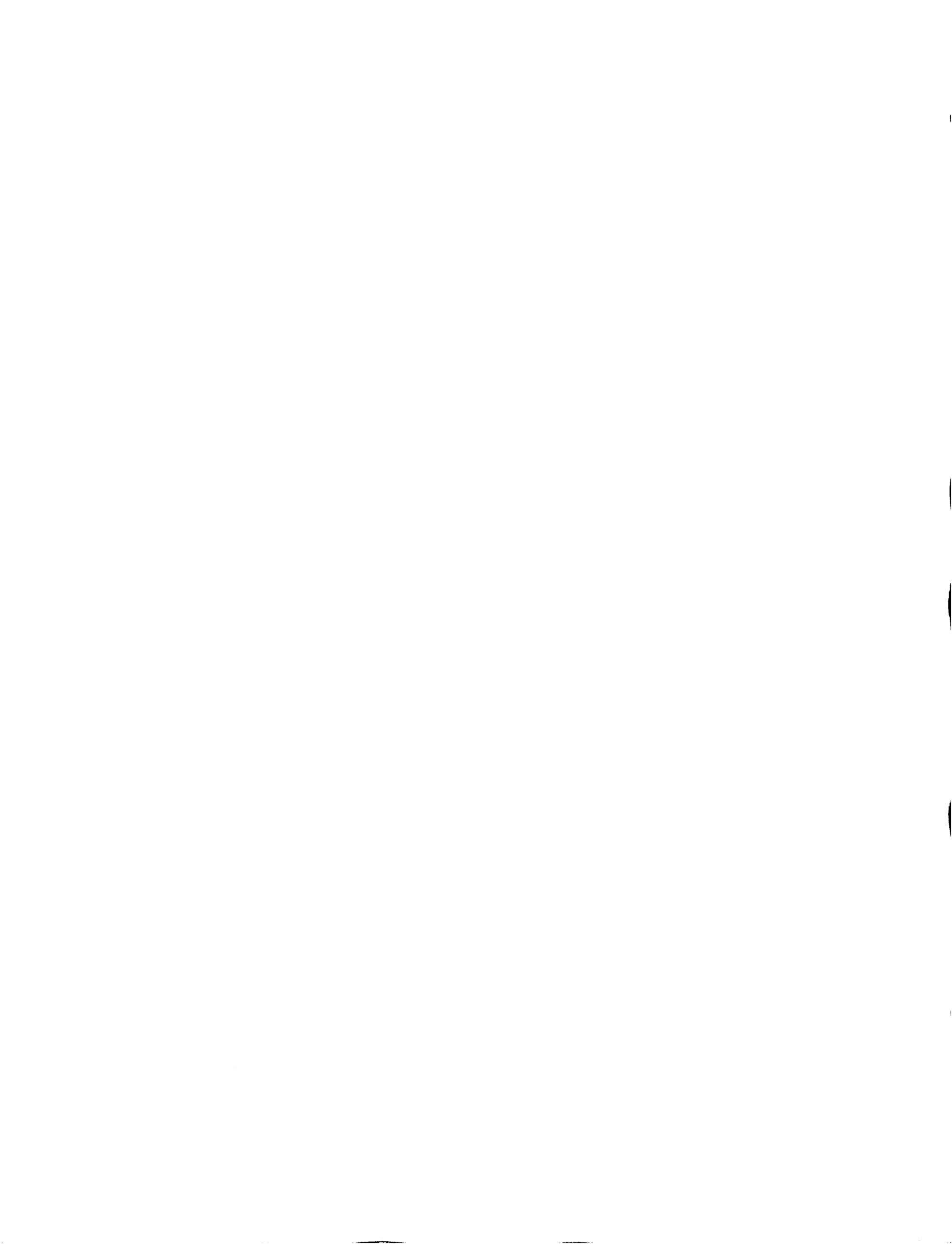




T_m DNA

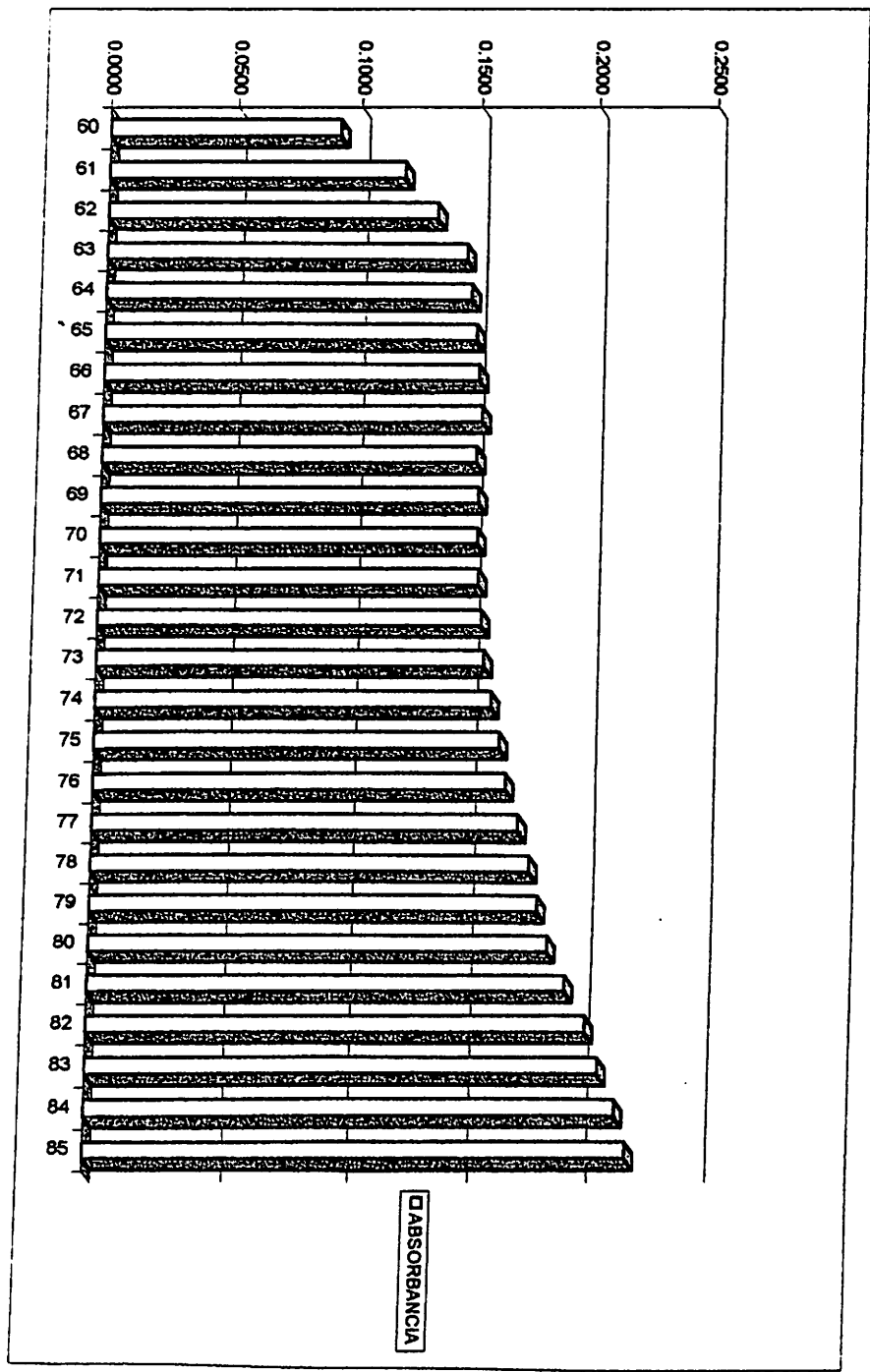
TEMPERATURA	dA/dT	ABSORBANCIA
60	0.0029	0.2260
61	0.0019	0.2289
62	0.0002	0.2308
63	0.0011	0.2310
64	0.0002	0.2321
65	0.0007	0.2323
66	-0.0020	0.2330
67	0.0005	0.2310
68	0.0029	0.2315
69	0.0105	0.2344
70	0.0130	0.2449
71	0.0217	0.2579
72	0.0361	0.2796
73	0.0305	0.3147
74	0.0383	0.3452
75	0.0330	0.3835
76	0.0272	0.4165
77	0.0250	0.4437
78	0.0100	0.4687
79	-0.0054	0.4787
80	-0.0324	0.4733
81	-0.0216	0.4409
82	-0.0254	0.4193
83	-0.0401	0.3939
84	-0.0463	0.3538
85	0.0036	0.3075

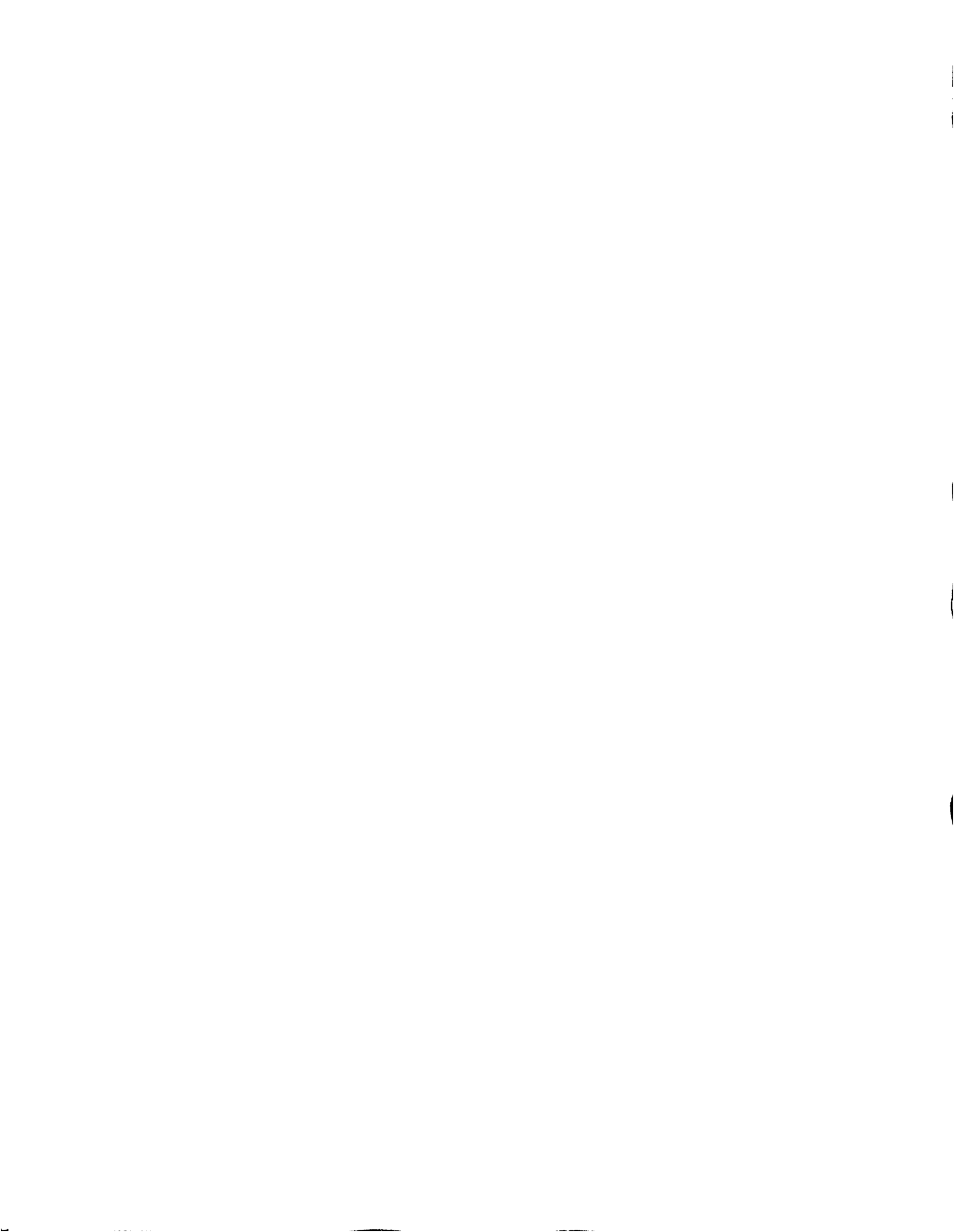




T_m DNA + CISPLATIN

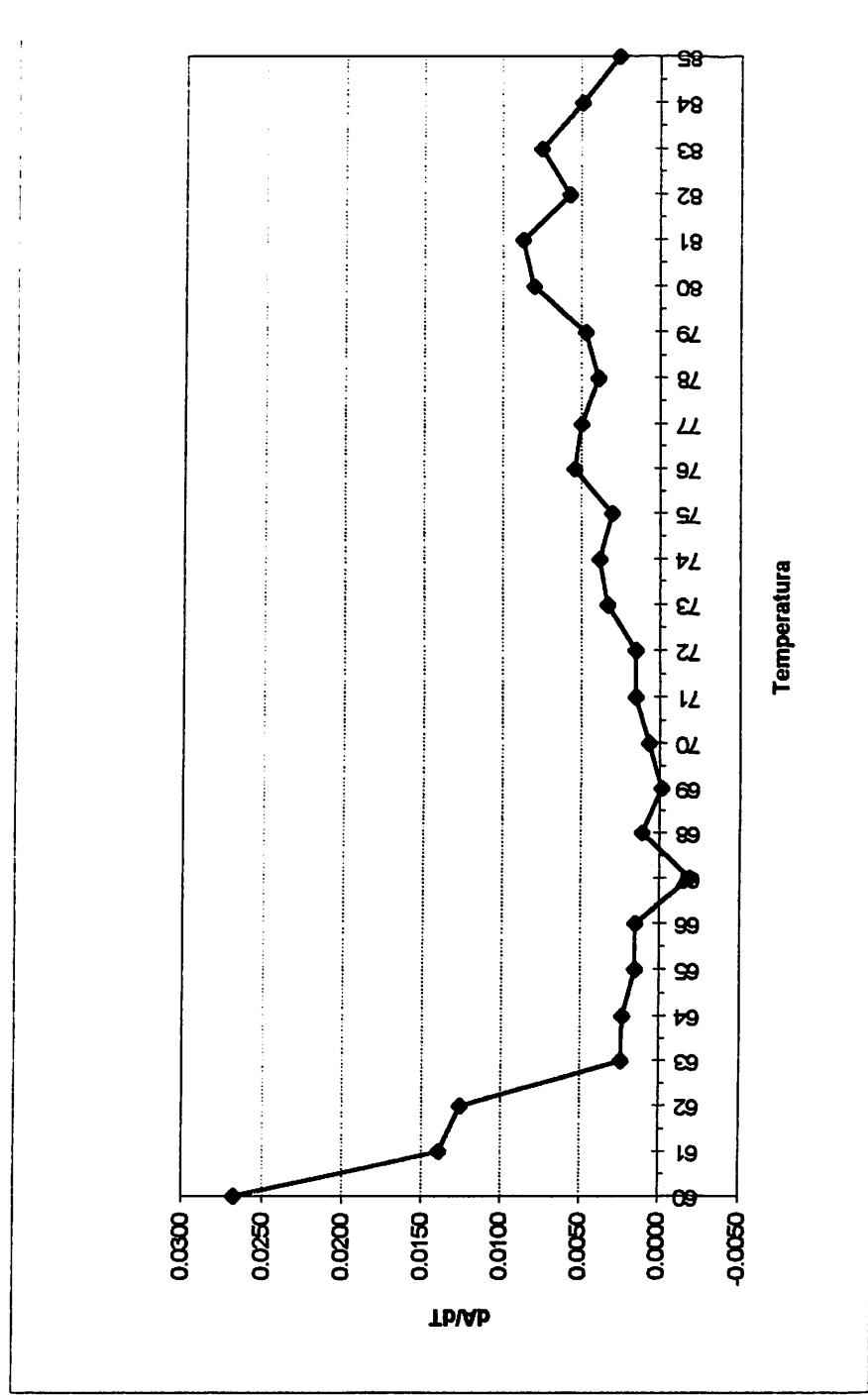
TEMPERATURA	ABSORBANCIA
60	0.0915
61	0.1183
62	0.1322
63	0.1448
64	0.1472
65	0.1495
66	0.1510
67	0.1525
68	0.1506
69	0.1517
70	0.1516
71	0.1523
72	0.1538
73	0.1553
74	0.1586
75	0.1624
76	0.1654
77	0.1708
78	0.1758
79	0.1797
80	0.1844
81	0.1924
82	0.2011
83	0.2068
84	0.2143
85	0.2192





Tm DNA + CISPLATIN

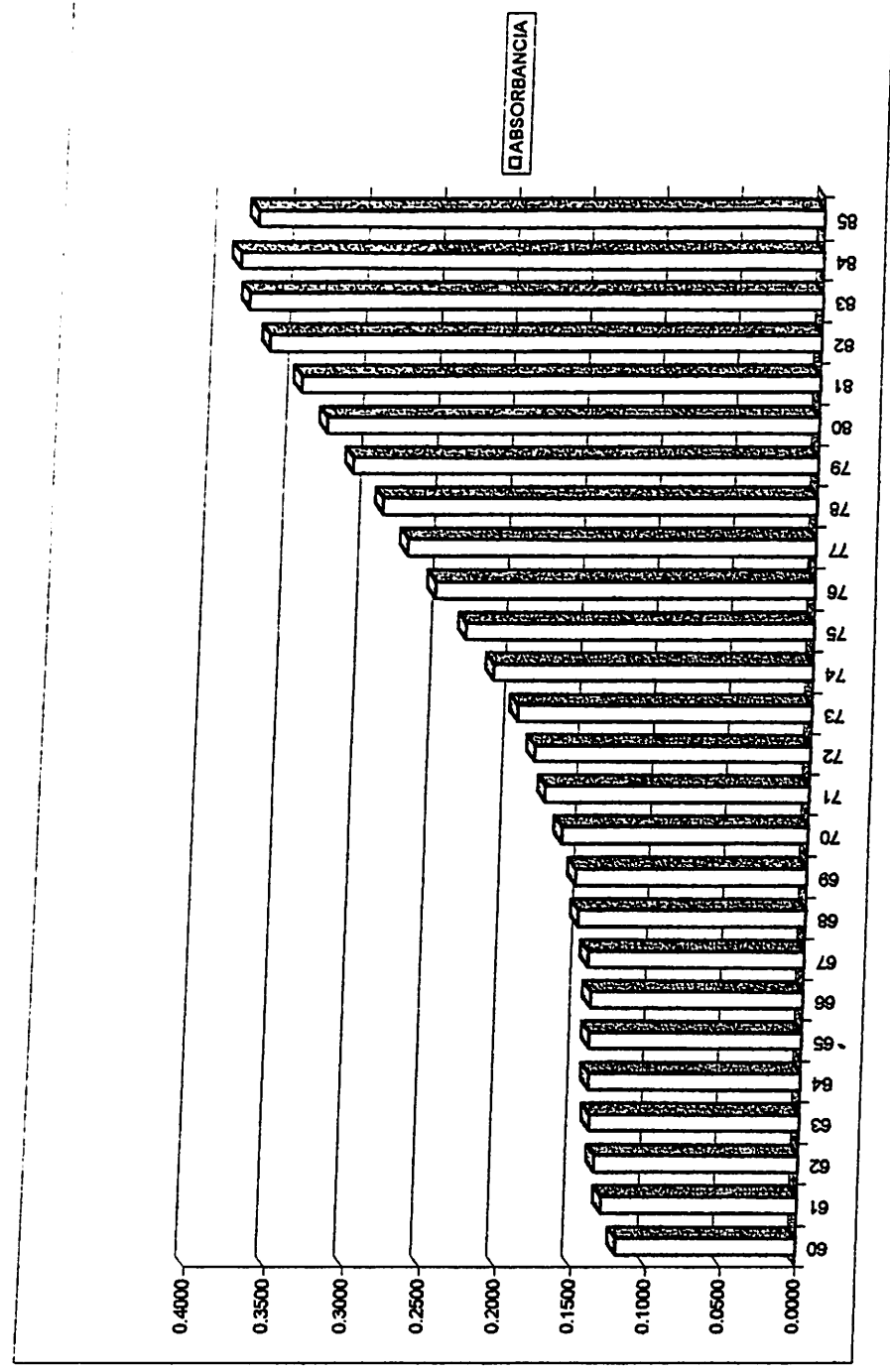
TEMPERATURA	dA/dT	ABSORBANCIA
60	0.0268	0.0915
61	0.0139	0.1183
62	0.0126	0.1322
63	0.0024	0.1448
64	0.0023	0.1472
65	0.0015	0.1485
66	0.0015	0.1510
67	-0.0019	0.1525
68	0.0011	0.1506
69	-0.0001	0.1517
70	0.0007	0.1516
71	0.0015	0.1523
72	0.0015	0.1538
73	0.0033	0.1553
74	0.0038	0.1586
75	0.0030	0.1624
76	0.0054	0.1664
77	0.0050	0.1708
78	0.0039	0.1758
79	0.0047	0.1797
80	0.0080	0.1844
81	0.0087	0.1924
82	0.0057	0.2011
83	0.0075	0.2068
84	0.0049	0.2143
85	0.0026	0.2192

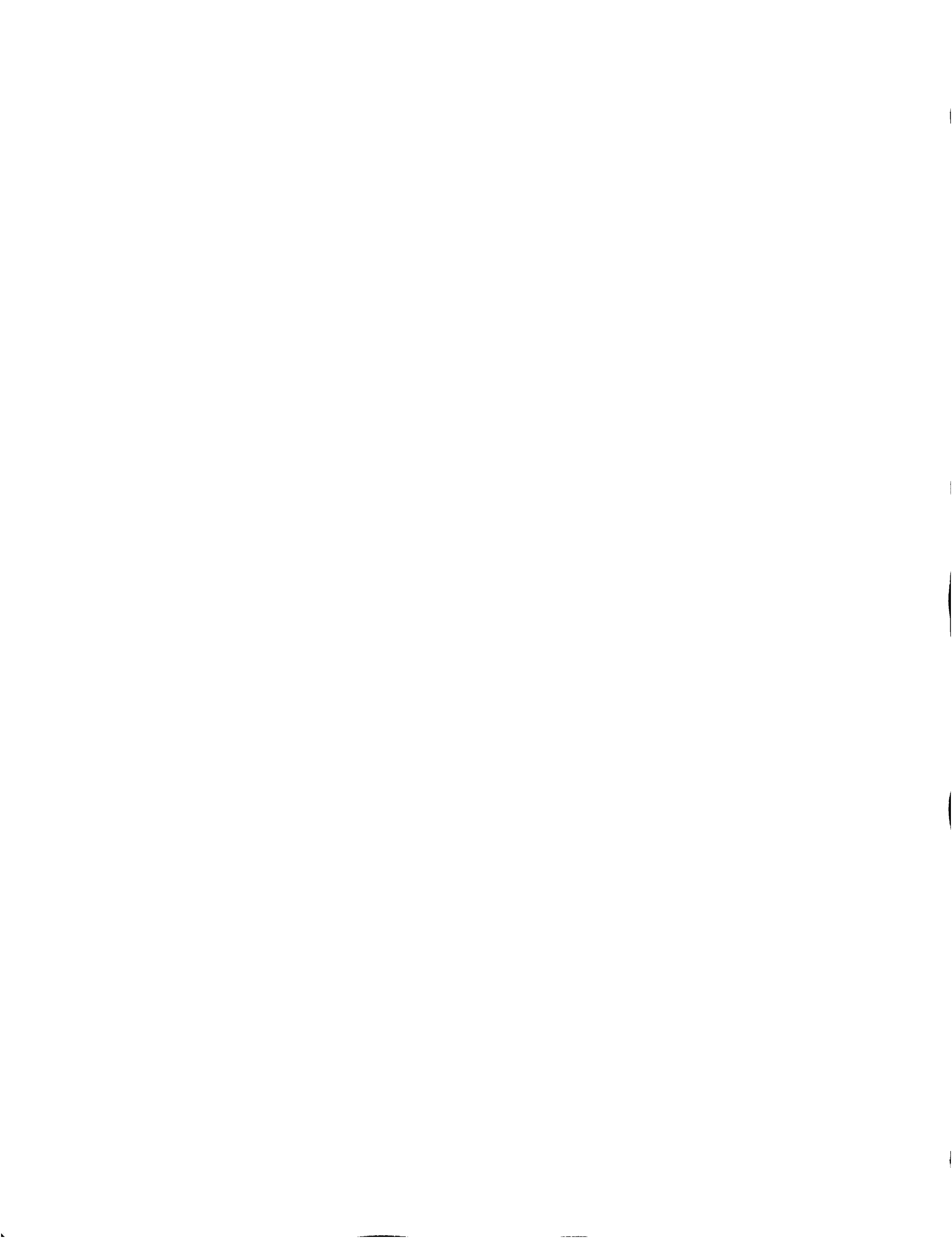




Tm DNA + CISPLATIN

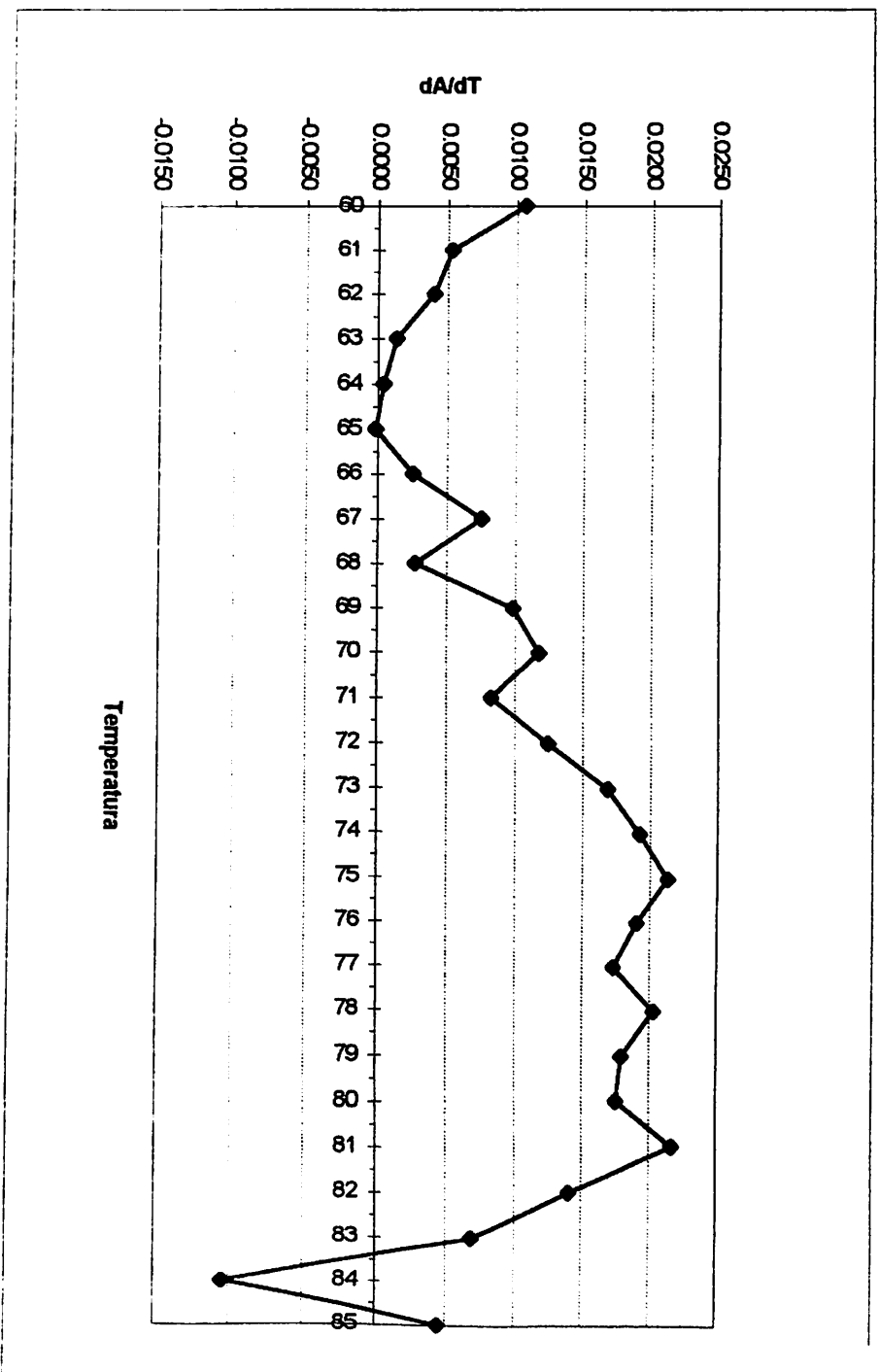
TEMPERATURA	ABSORBANCIA
60	0.1202
61	0.1308
62	0.1361
63	0.1401
64	0.1414
65	0.1418
66	0.1416
67	0.1441
68	0.1516
69	0.1543
70	0.1641
71	0.1758
72	0.1840
73	0.1964
74	0.2132
75	0.2324
76	0.2537
77	0.2727
78	0.2900
79	0.3103
80	0.3282
81	0.3457
82	0.3674
83	0.3814
84	0.3882
85	0.3777

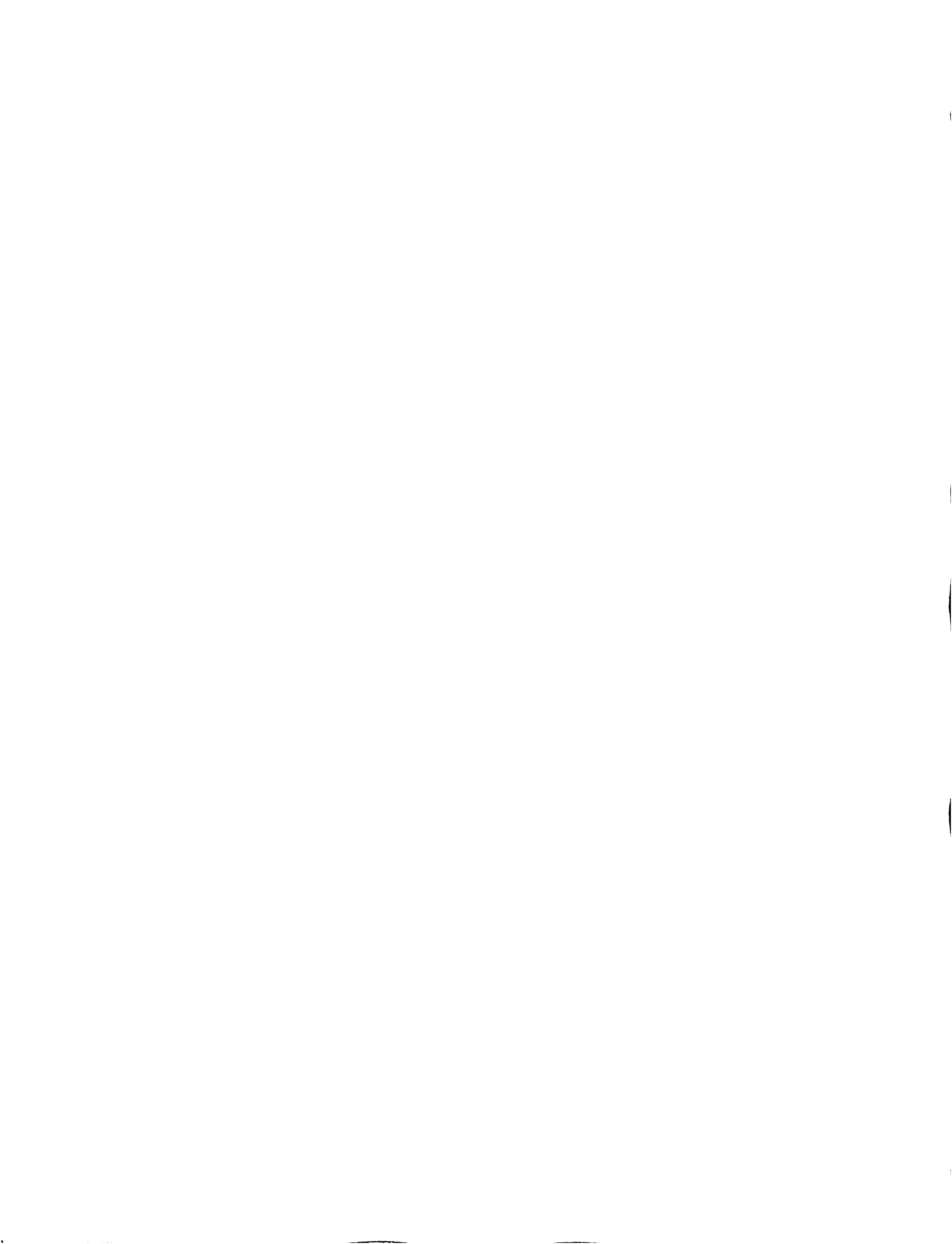




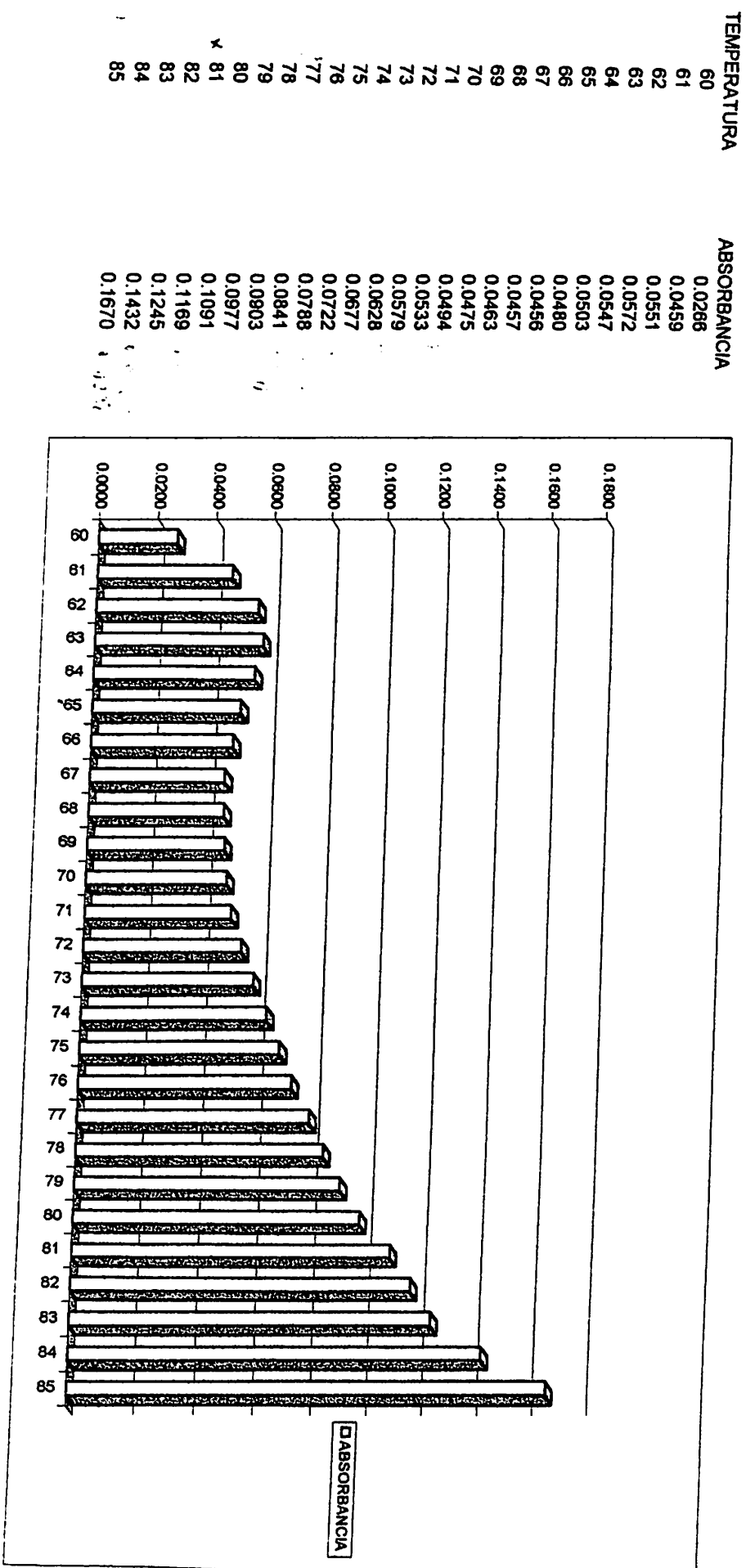
T_m DNA + CISPLATIN

TEMPERATURA	ΔA/ΔT	ABSORBANCIA
60	0.0106	0.1202
61	0.0053	0.1308
62	0.0040	0.1361
63	0.0013	0.1401
64	0.0004	0.1414
65	-0.0002	0.1418
66	0.0025	0.1416
67	0.0075	0.1441
68	0.0027	0.1516
69	0.0098	0.1543
70	0.0117	0.1641
71	0.0082	0.1758
72	0.0124	0.1840
73	0.0168	0.1964
74	0.0192	0.2132
75	0.0213	0.2324
76	0.0190	0.2537
77	0.0173	0.2727
78	0.0203	0.2900
79	0.0179	0.3103
80	0.0175	0.3282
81	0.0217	0.3457
82	0.0140	0.3674
83	0.0068	0.3814
84	-0.0105	0.3882
85	0.0044	0.3777





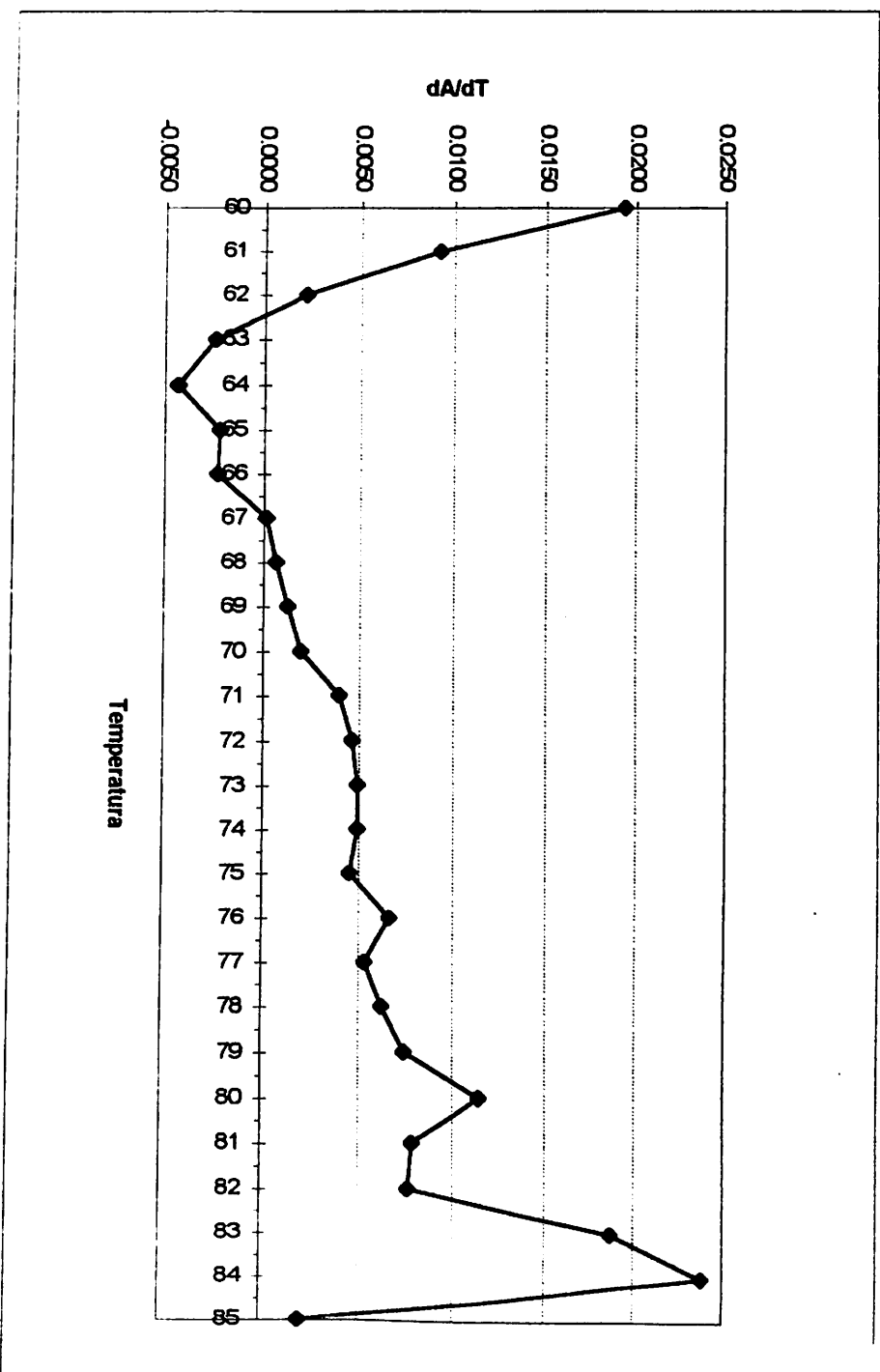
T_m DNA + CISPLATIN





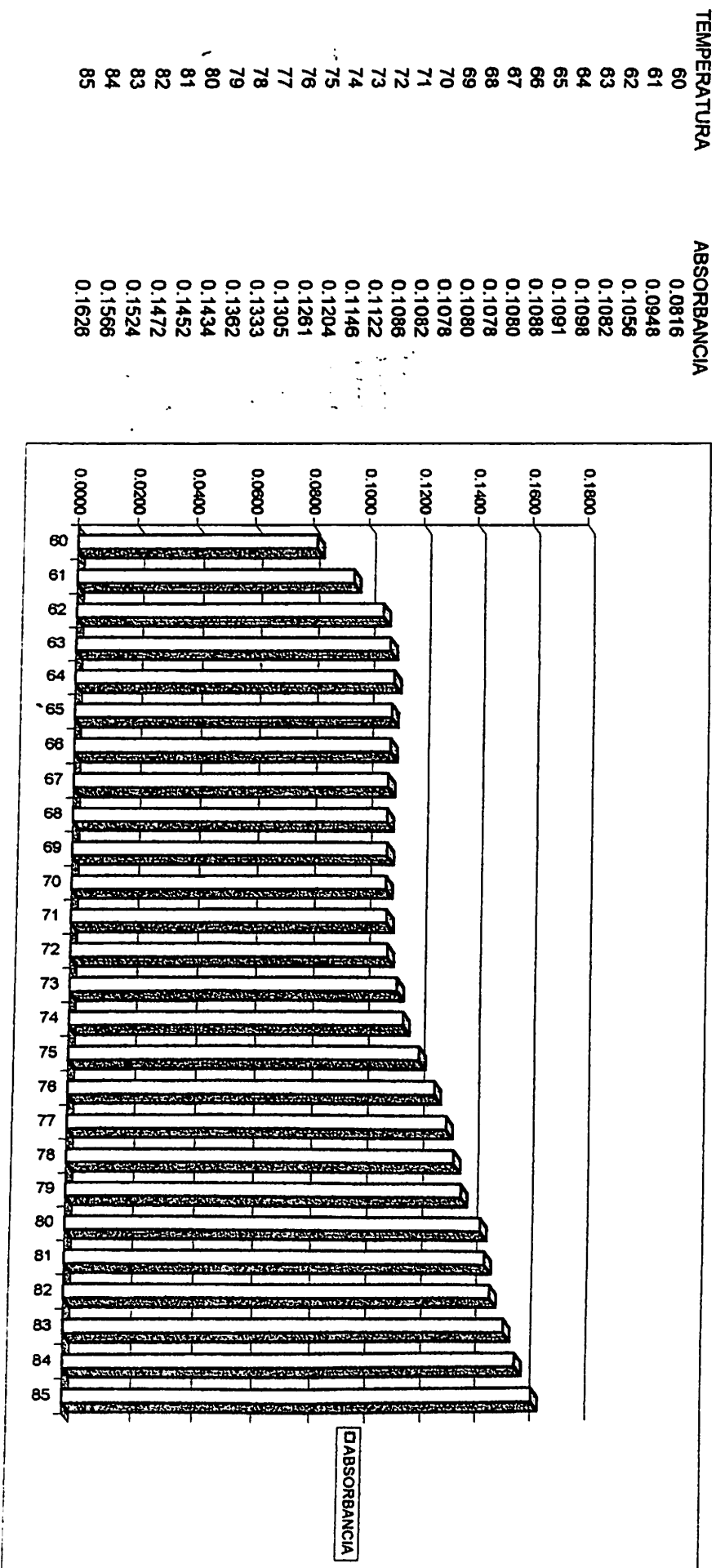
T_m DNA + CISPLATIN

TEMPERATURA	dA/dT	ABSORBANCIA
60	0.0193	0.0266
61	0.0092	0.0459
62	0.0021	0.0551
63	-0.0025	0.0572
64	-0.0044	0.0547
66	-0.0023	0.0503
66	-0.0024	0.0480
67	0.0001	0.0456
68	0.0006	0.0457
69	0.0012	0.0463
70	0.0019	0.0475
71	0.0039	0.0494
72	0.0046	0.0533
73	0.0049	0.0579
74	0.0049	0.0628
75	0.0045	0.0677
76	0.0066	0.0722
77	0.0053	0.0788
78	0.0062	0.0841
79	0.0074	0.0903
80	0.0114	0.0977
81	0.0078	0.1091
82	0.0076	0.1169
83	0.0187	0.1245
84	0.0238	0.1432
85	0.0020	0.1670





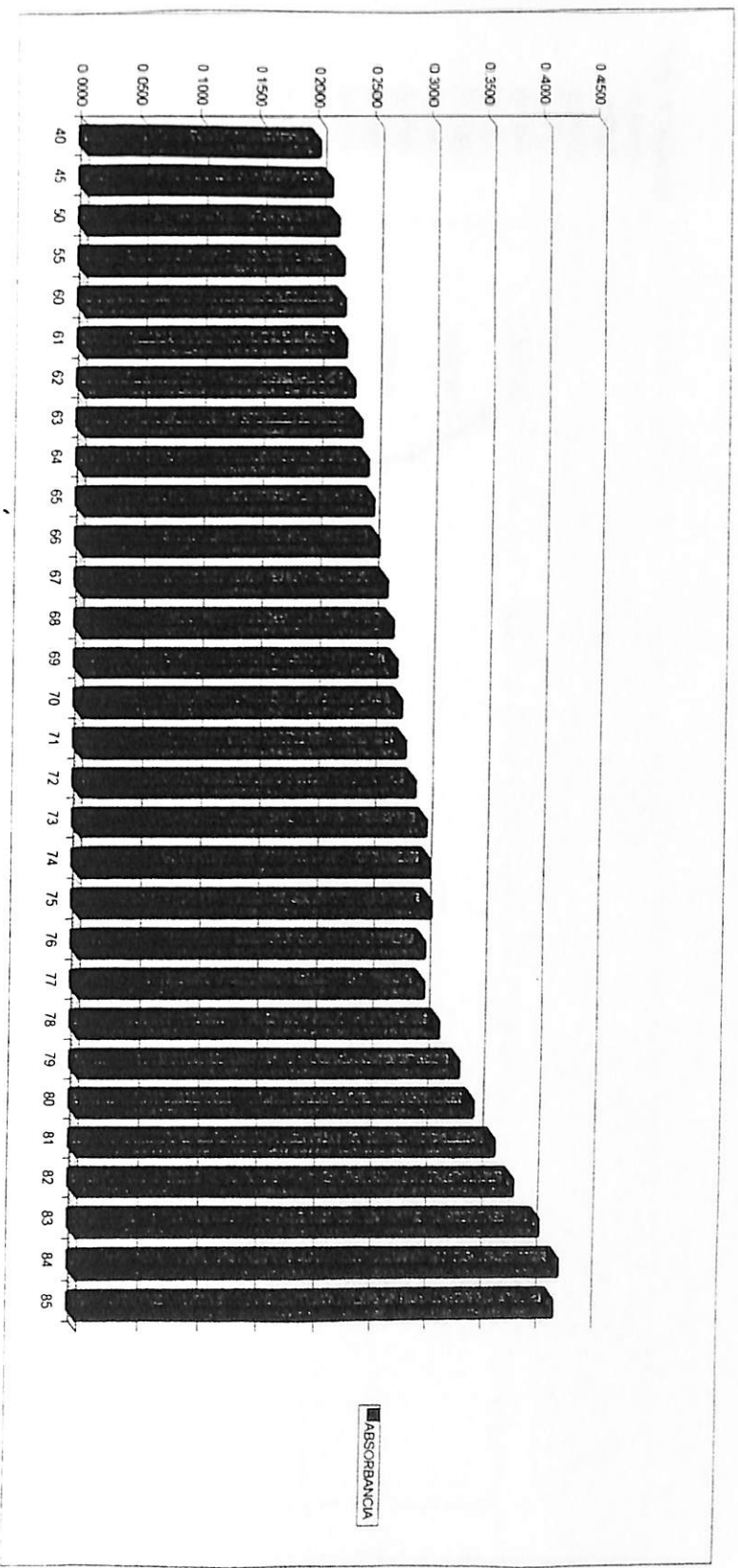
T_m DNA + CISPLATIN

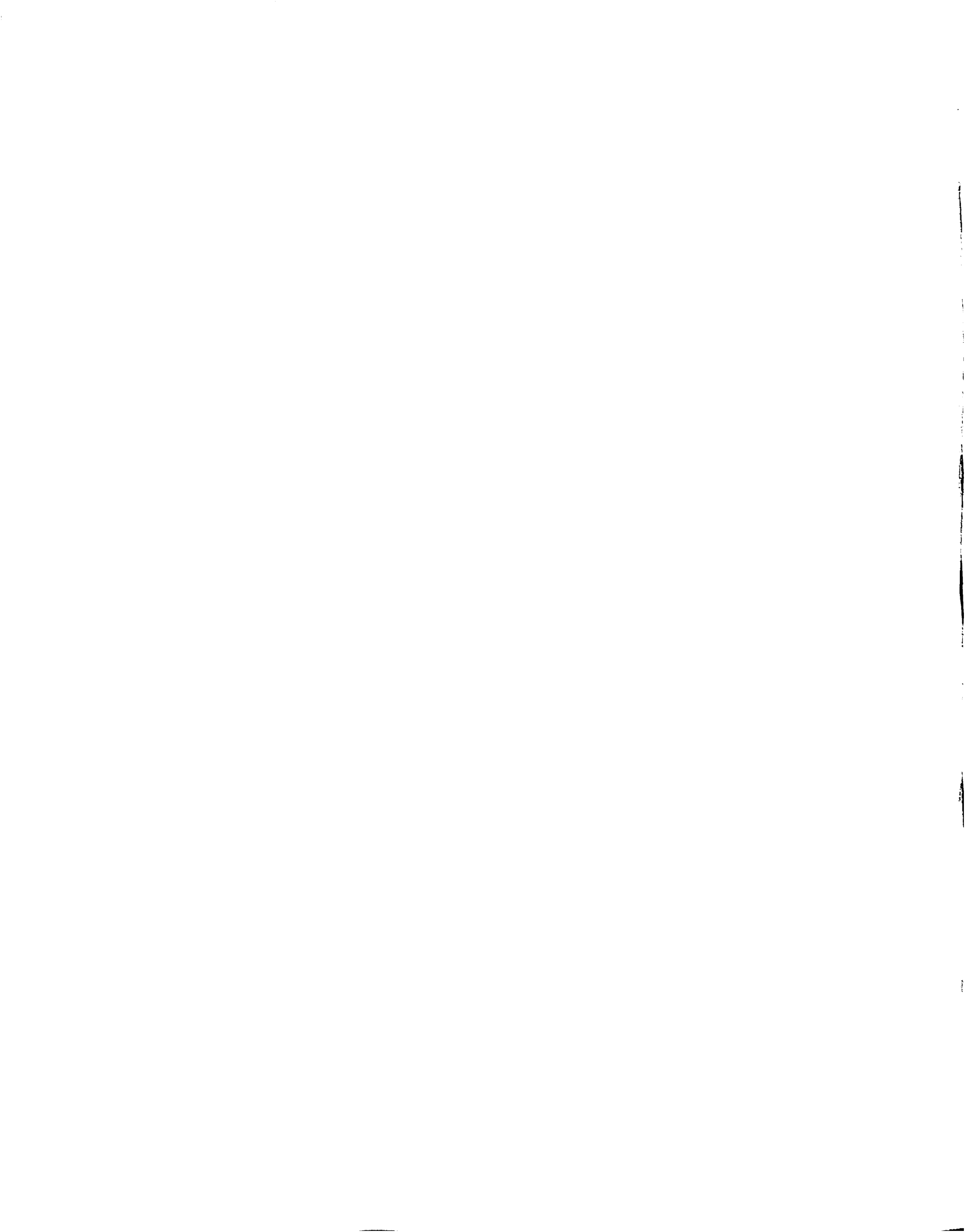




T_m DNA

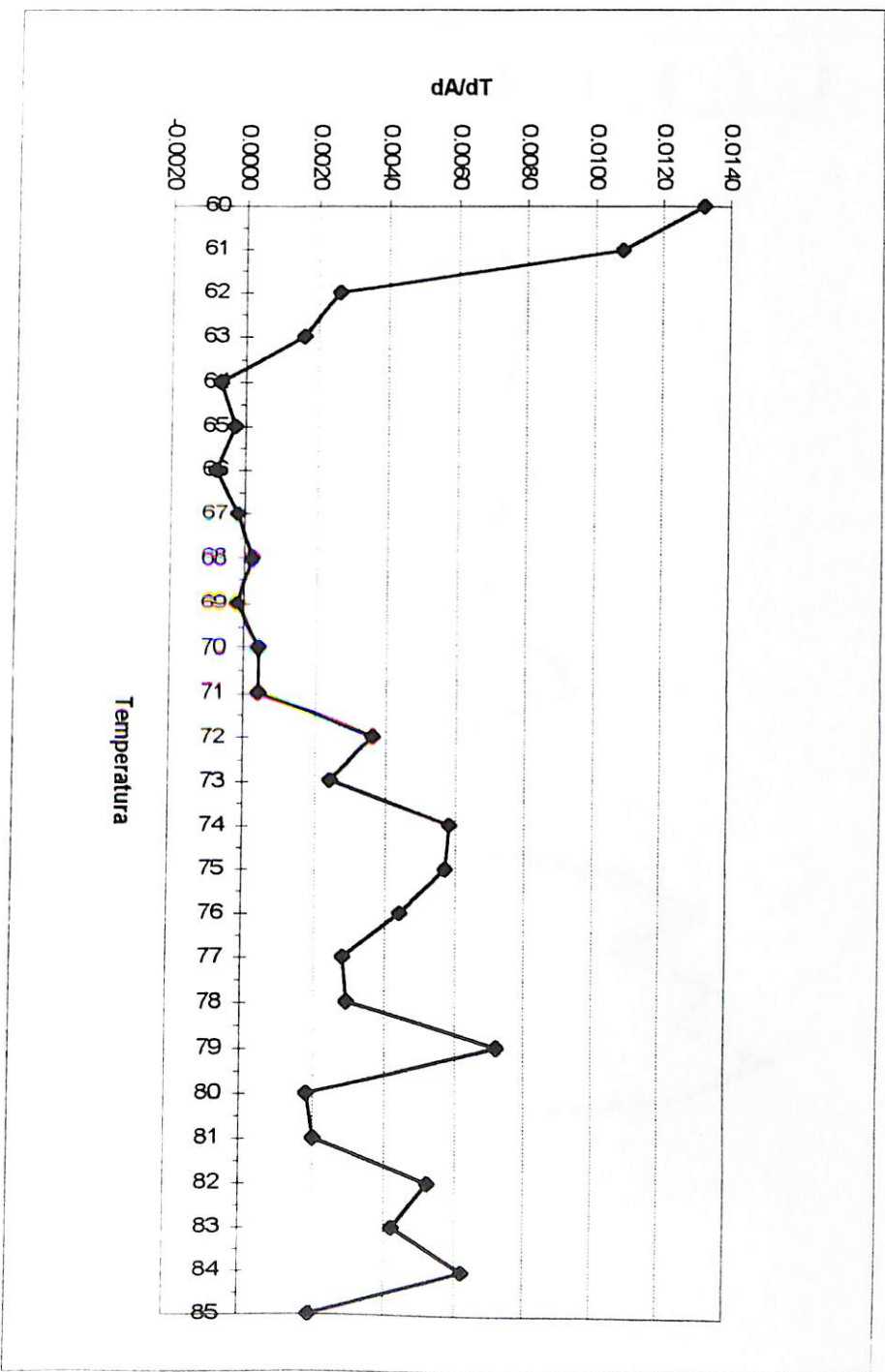
TEMPERATURA	ABSORBANCIA
40	0.1935
45	0.2046
50	0.2110
55	0.2156
60	0.2169
61	0.2187
62	0.2258
63	0.2324
64	0.2366
65	0.2440
66	0.2491
67	0.2567
68	0.2623
69	0.2659
70	0.2709
71	0.2745
72	0.2832
73	0.2937
74	0.2977
75	0.2989
76	0.2938
77	0.2931
78	0.3076
79	0.3264
80	0.3396
81	0.3594
82	0.3766
83	0.4000
84	0.4182
85	0.4140

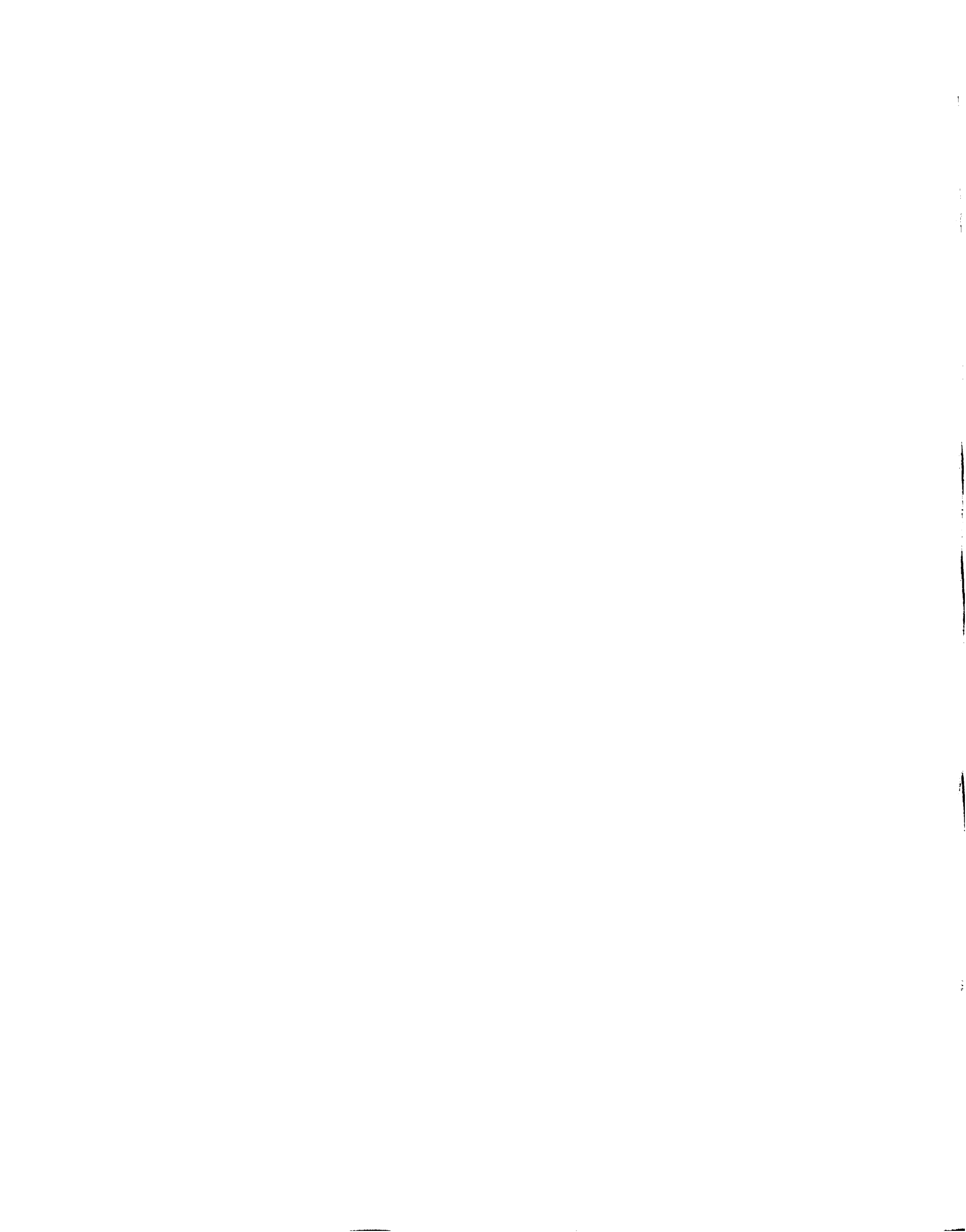




T_m DNA + CISPLATIN

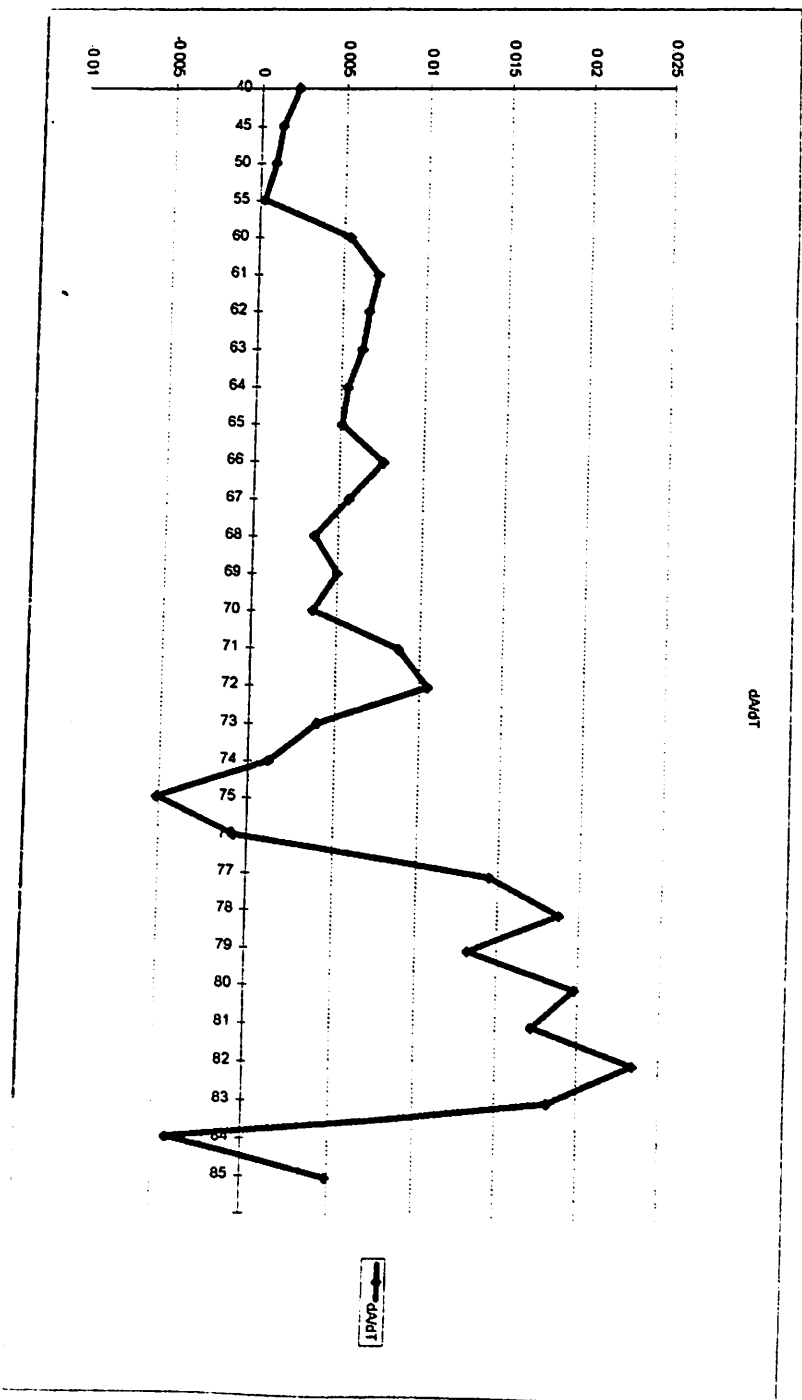
TEMPERATURA	dA/dT	ABSORBANCIA
60	0.0132	0.0816
61	0.0108	0.0948
62	0.0026	0.1056
63	0.0016	0.1082
64	-0.0007	0.1098
65	-0.0003	0.1091
66	-0.0008	0.1088
67	-0.0002	0.1080
68	0.0002	0.1078
69	-0.0002	0.1080
70	0.0004	0.1078
71	0.0004	0.1082
72	0.0036	0.1086
73	0.0024	0.1122
74	0.0058	0.1146
75	0.0057	0.1204
76	0.0044	0.1261
77	0.0028	0.1305
78	0.0029	0.1333
79	0.0072	0.1362
80	0.0018	0.1434
81	0.0020	0.1452
82	0.0052	0.1472
83	0.0042	0.1524
84	0.0062	0.1566
85	0.0019	0.1628

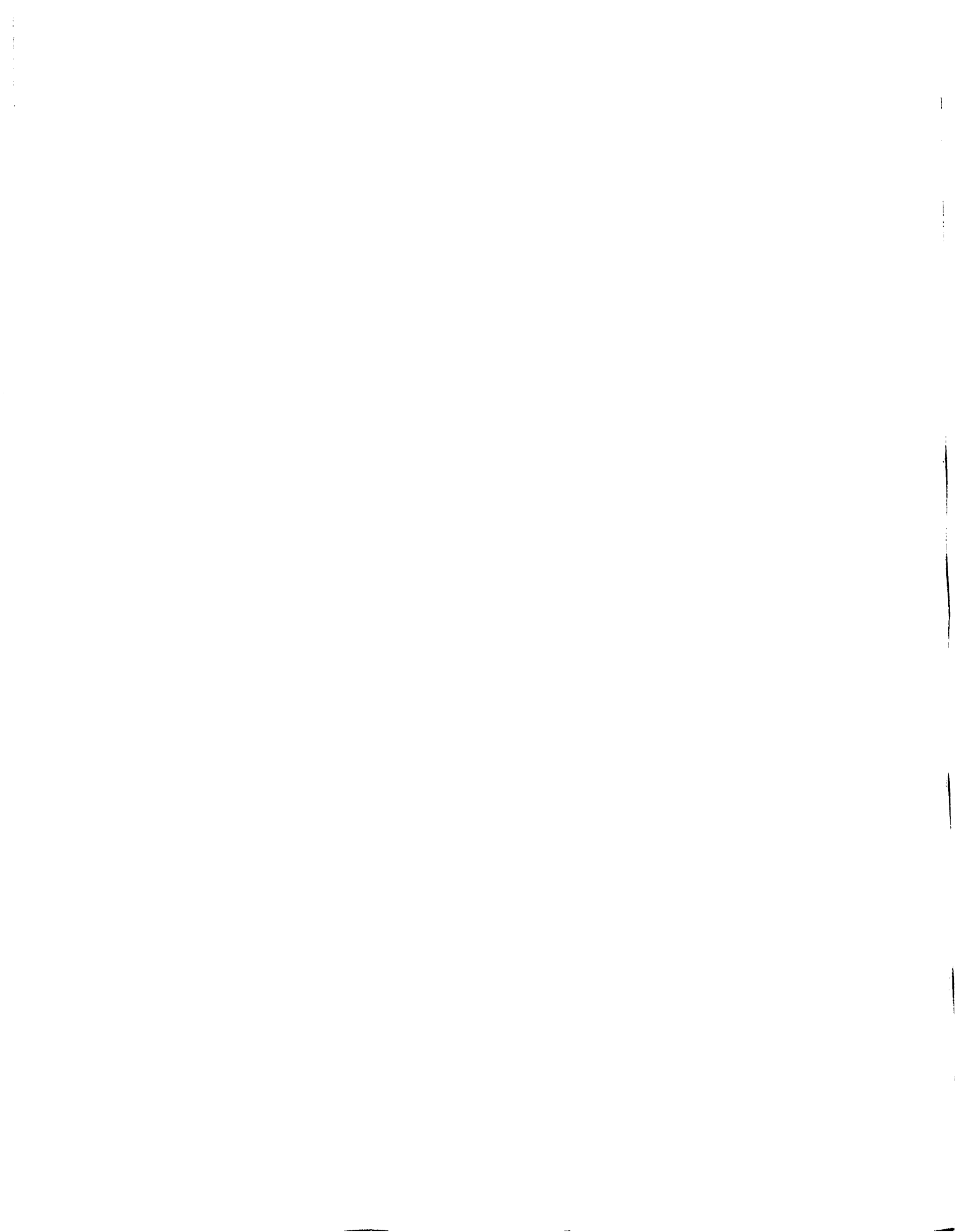




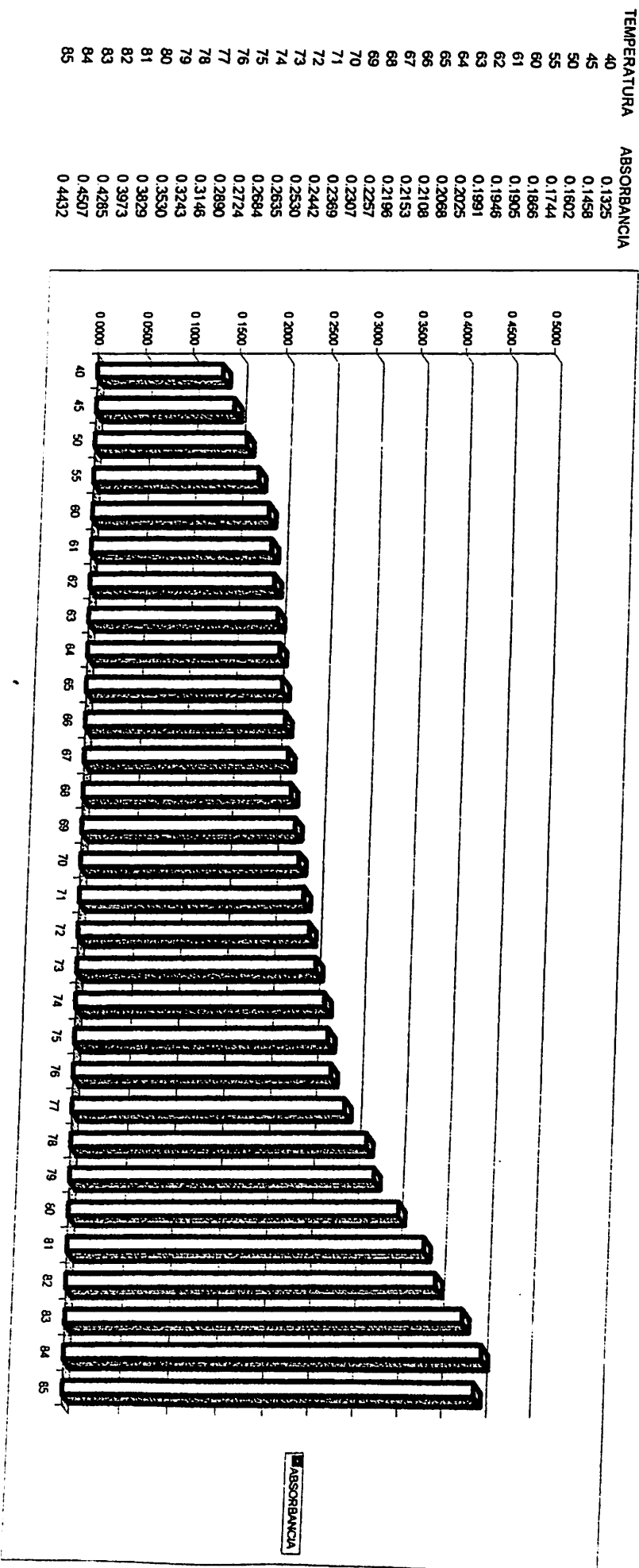
Tm DNA

TEMPERATURA	DA/DT	ABSORBANCIA
40	0.00222	0.1935
45	0.00128	0.2046
50	0.00092	0.2110
55	0.00026	0.2156
60	0.00542	0.2169
61	0.0071	0.2187
62	0.0066	0.2258
63	0.0062	0.2324
64	0.0054	0.2386
65	0.0051	0.2440
66	0.0076	0.2491
67	0.0056	0.2567
68	0.0036	0.2623
69	0.005	0.2659
70	0.0036	0.2709
71	0.0087	0.2745
72	0.0105	0.2832
73	0.004	0.2937
74	0.0012	0.2977
75	-0.0051	0.2889
76	-0.0007	0.2938
77	0.0145	0.2931
78	0.0188	0.3076
79	0.0132	0.3284
80	0.0198	0.3396
81	0.0172	0.3594
82	0.0234	0.3766
83	0.0182	0.4000
84	-0.0042	0.4182
85	0.00487	0.4140





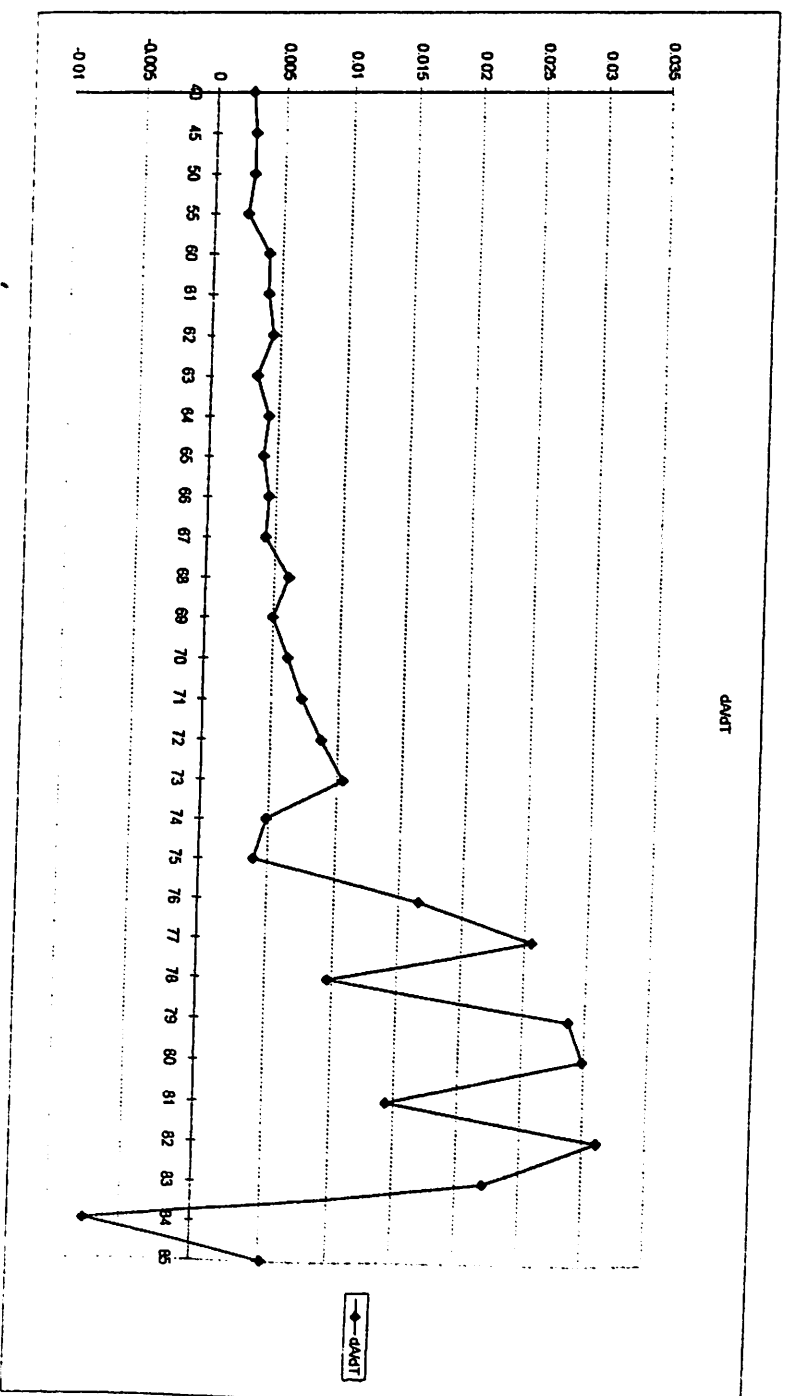
Tm DNA + Pt





Tm DNA + Pt

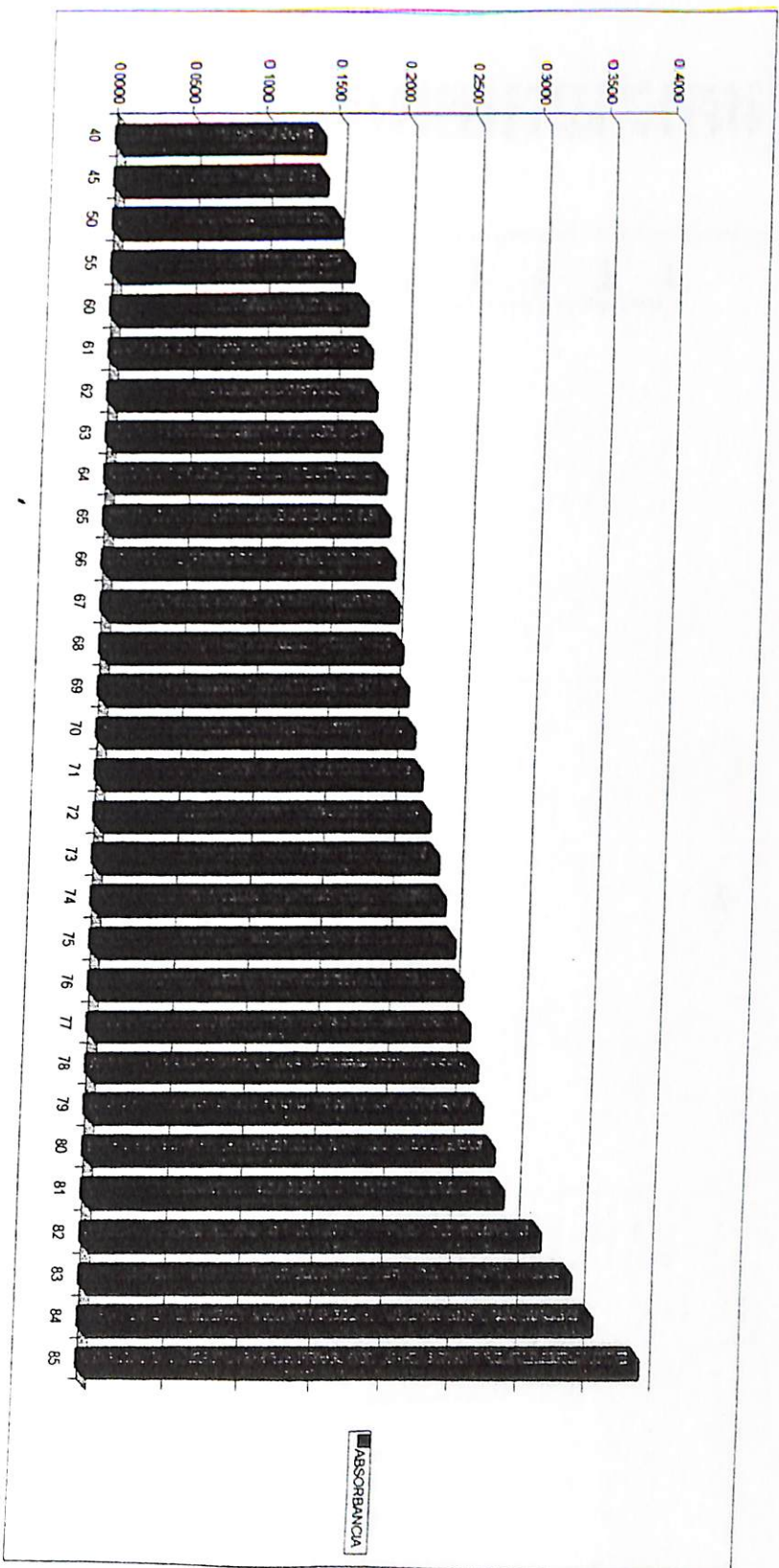
TEMPERATURA	dADT	ABSORBANCIA
40	0.00286	0.1325
45	0.00288	0.1458
50	0.00284	0.1602
55	0.00244	0.1744
60	0.00404	0.1868
61	0.0041	0.1905
62	0.0045	0.1946
63	0.0034	0.1991
64	0.0043	0.2025
65	0.004	0.2068
66	0.0045	0.2108
67	0.0043	0.2153
68	0.0061	0.2198
69	0.005	0.2257
70	0.0062	0.2307
71	0.0073	0.2369
72	0.0088	0.2442
73	0.0105	0.2530
74	0.0049	0.2635
75	0.004	0.2684
76	0.0166	0.2724
77	0.0256	0.2890
78	0.0097	0.3146
79	0.0287	0.3243
80	0.0299	0.3530
81	0.0144	0.3829
82	0.0312	0.3973
83	0.0222	0.4285
84	-0.0075	0.4507
85	0.00521	0.4432

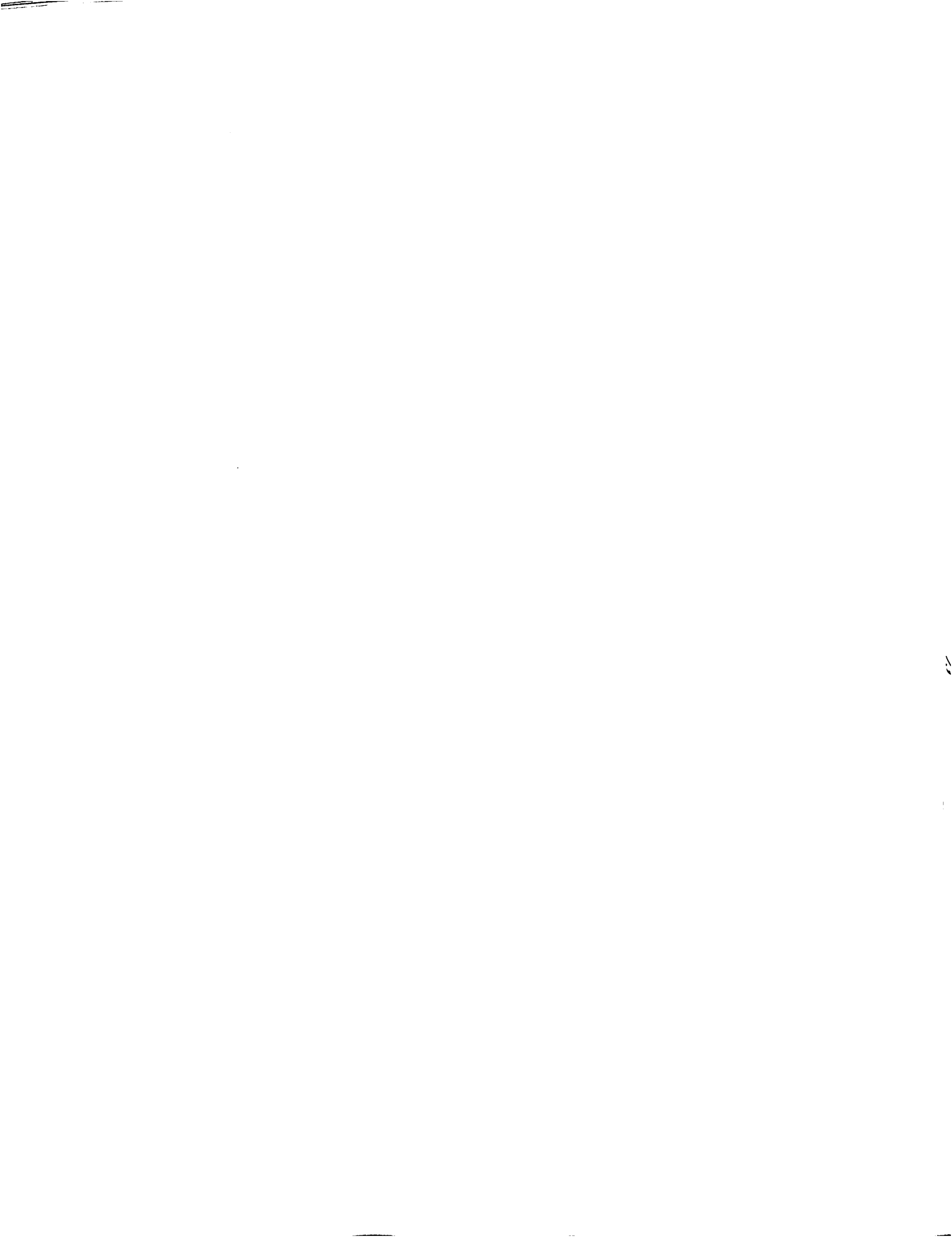




T_m DNA + Pt

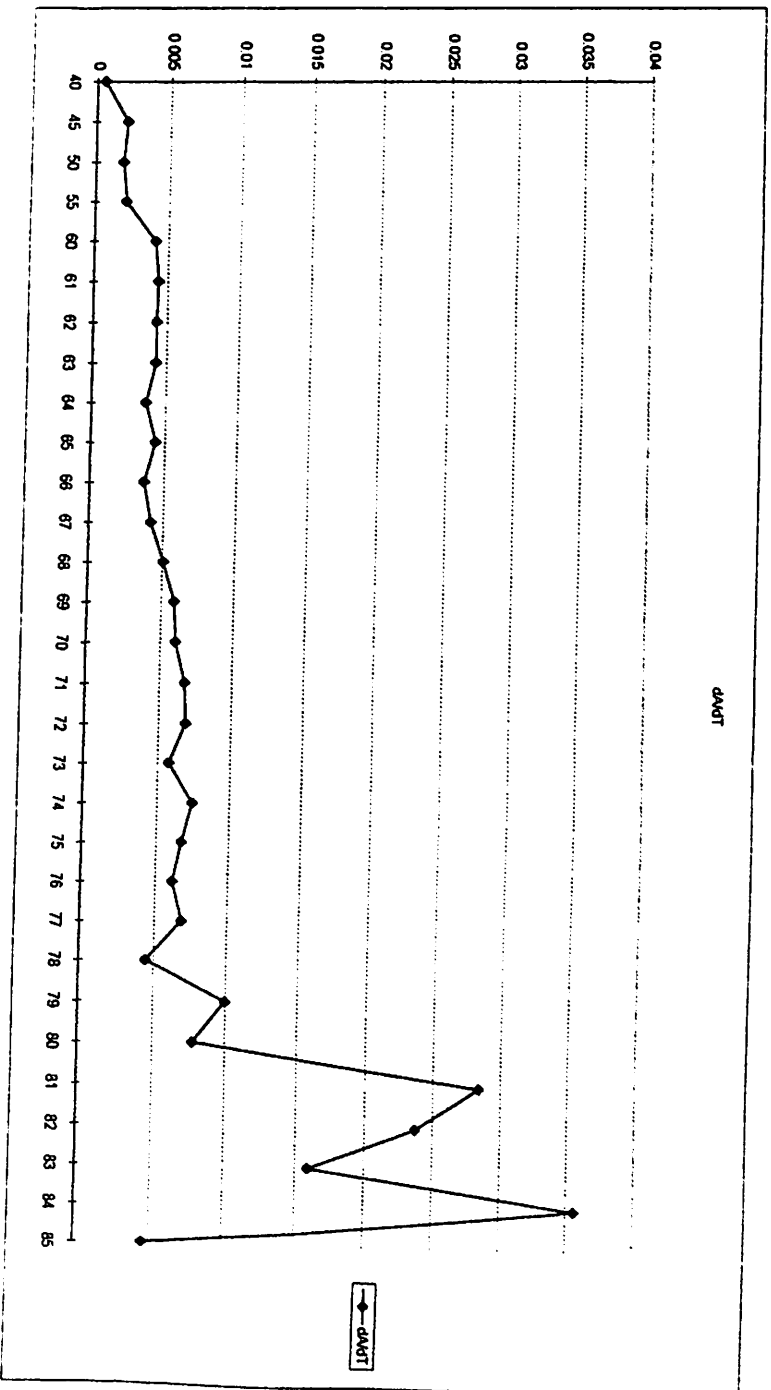
TEMPERATURA	ABSORBANCIA
40	0.1338
45	0.1367
50	0.1474
55	0.1589
60	0.1675
61	0.1715
62	0.1759
63	0.1802
64	0.1845
65	0.1882
66	0.1926
67	0.1963
68	0.2005
69	0.2056
70	0.2115
71	0.2176
72	0.2244
73	0.2313
74	0.2371
75	0.2446
76	0.2514
77	0.2576
78	0.2645
79	0.2690
80	0.2730
81	0.2868
82	0.3152
83	0.3389
84	0.3548
85	0.3904





Tm DNA + Pt

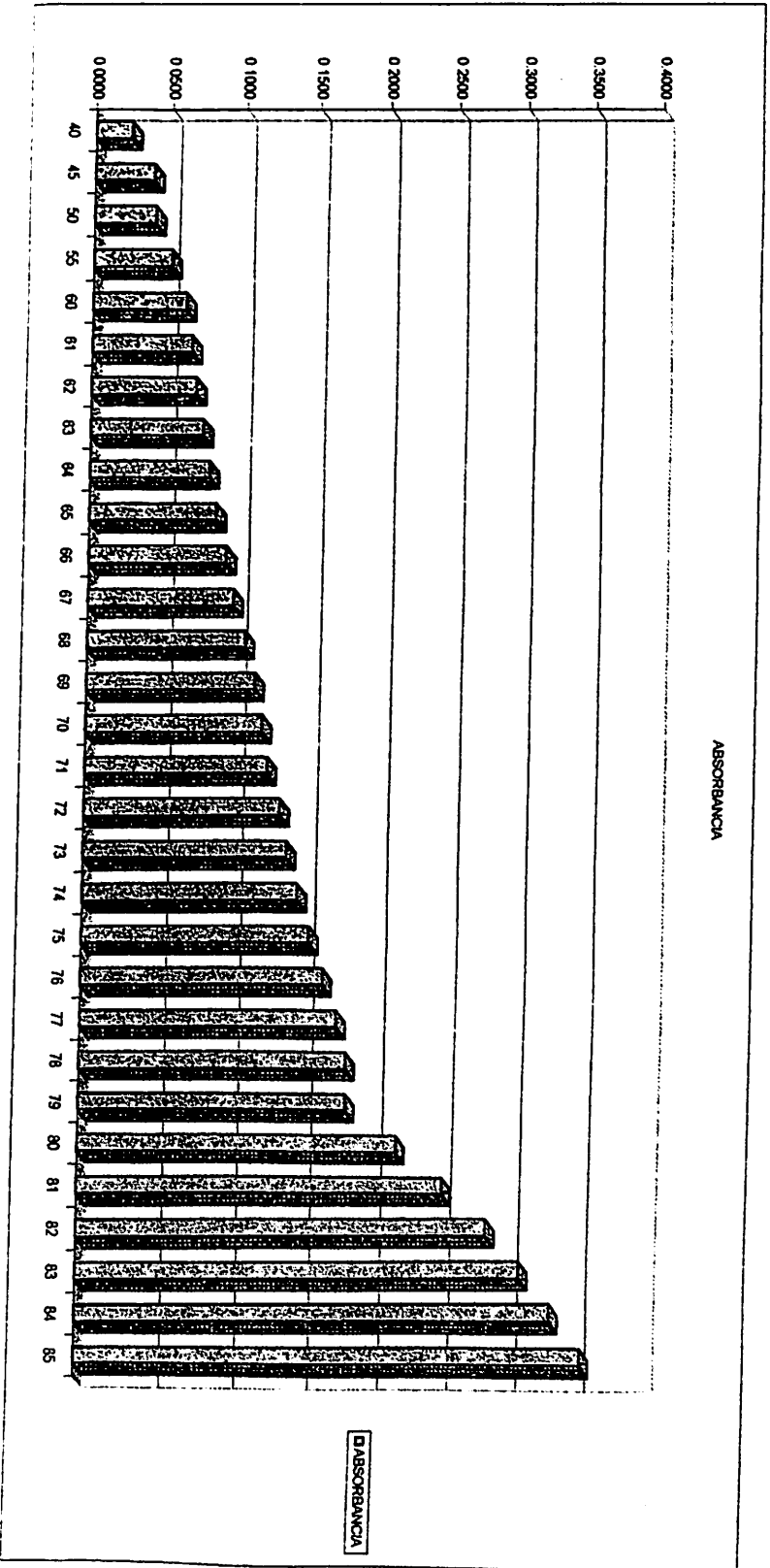
TEMPERATURA	DAVT	ABSORBANCIA
40	0.00058	0.1338
45	0.00214	0.1367
50	0.0019	0.1474
55	0.00212	0.1569
60	0.00414	0.1675
61	0.0044	0.1715
62	0.0043	0.1759
63	0.0043	0.1802
64	0.0037	0.1845
65	0.0044	0.1882
66	0.0037	0.1926
67	0.0042	0.1963
68	0.0051	0.2005
69	0.0059	0.2056
70	0.0061	0.2115
71	0.0068	0.2176
72	0.0069	0.2244
73	0.0058	0.2313
74	0.0075	0.2371
75	0.0068	0.2448
76	0.0062	0.2514
77	0.0069	0.2576
78	0.0045	0.2645
79	0.01	0.2690
80	0.0078	0.2790
81	0.0284	0.2868
82	0.0237	0.3152
83	0.0159	0.3389
84	0.0356	0.3548
85	0.00459	0.3904





Tm DNA + Pt

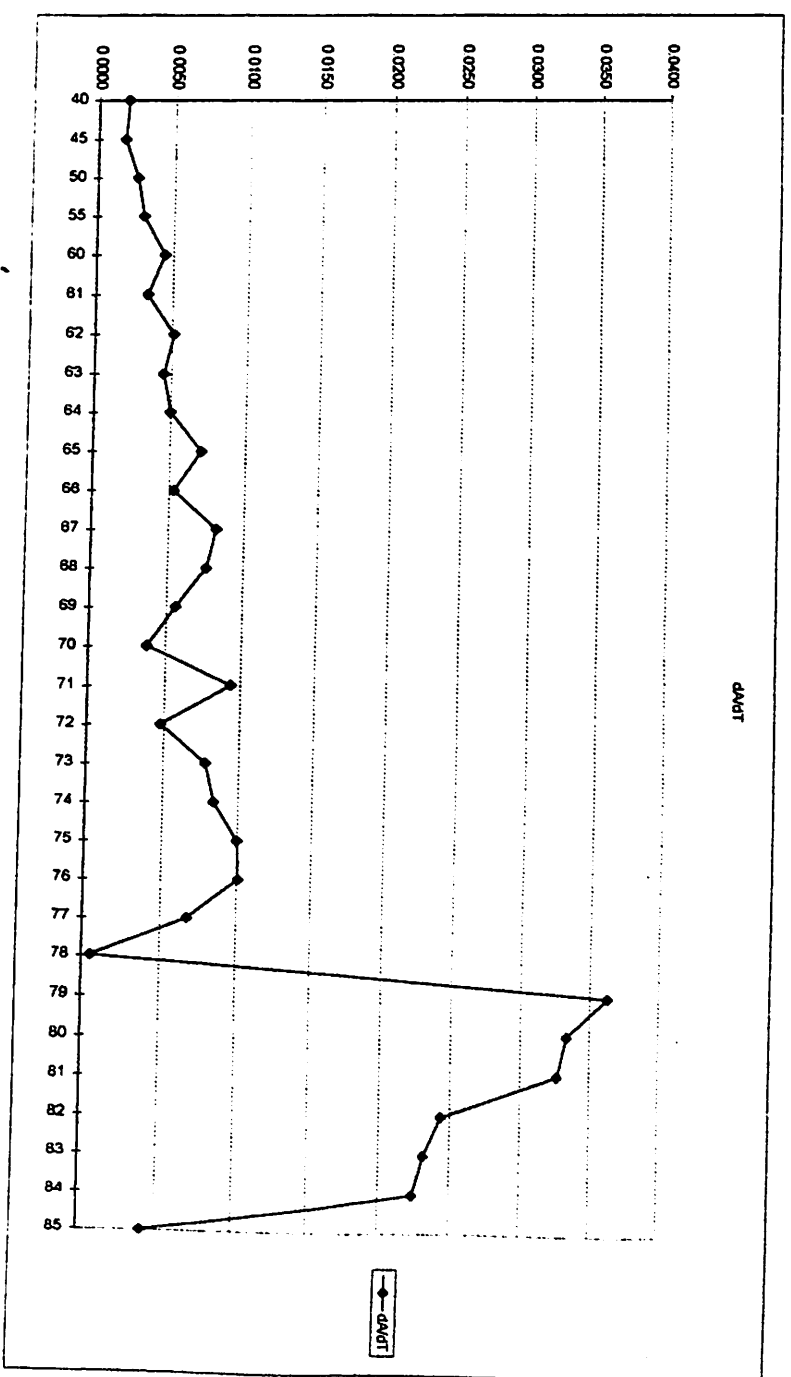
TEMPERATURA	ABSORBANCIA
40	0.0239
45	0.0390
50	0.0405
55	0.0515
60	0.0818
61	0.0691
62	0.0695
63	0.0746
64	0.0791
65	0.0841
66	0.0912
67	0.0985
68	0.1047
69	0.1123
70	0.1179
71	0.1217
72	0.1311
73	0.1359
74	0.1437
75	0.1521
76	0.1621
77	0.1722
78	0.1790
79	0.1796
80	0.2159
81	0.2493
82	0.2820
83	0.3084
84	0.3296
85	0.3520

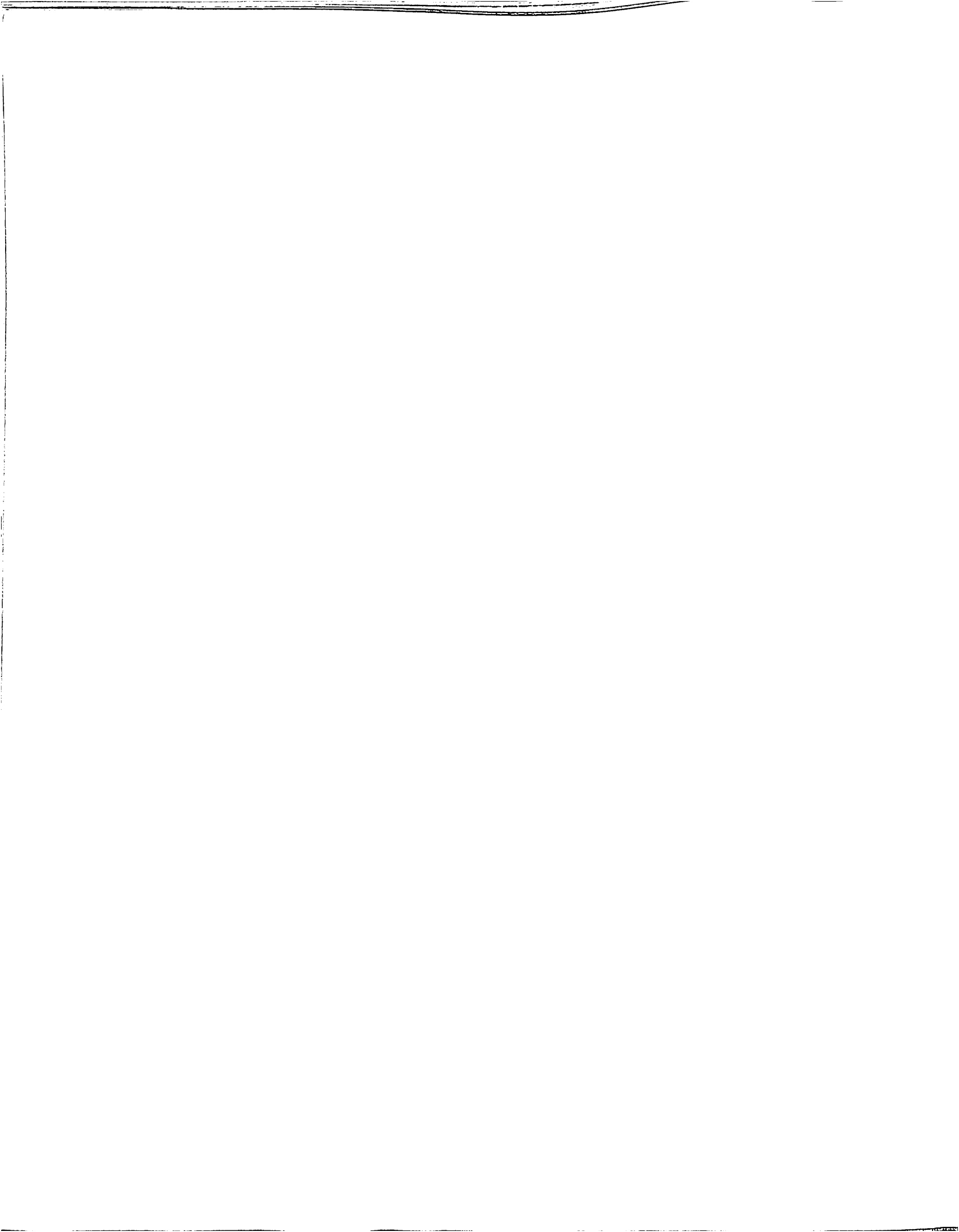




Tm DNA + Pt

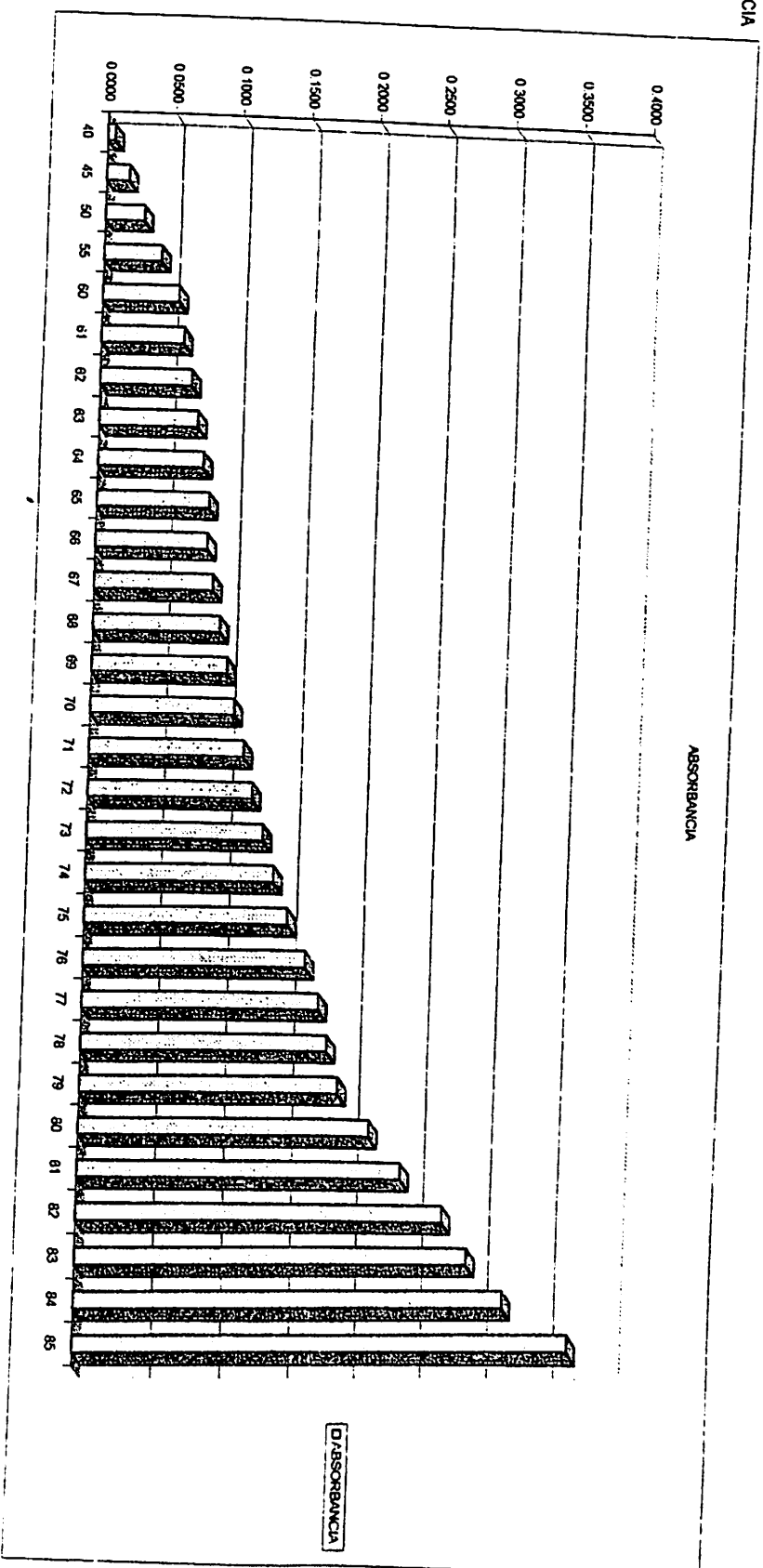
TEMPERATURA	dA/dT	ABSORBANCIA
40	0.0020	0.0239
45	0.0018	0.0390
50	0.0028	0.0405
55	0.0031	0.0515
60	0.00446	0.0818
61	0.0034	0.0881
62	0.0051	0.0895
63	0.0045	0.0746
64	0.005	0.0791
65	0.0071	0.0841
66	0.0053	0.0912
67	0.0082	0.0965
68	0.0076	0.1047
69	0.0056	0.1123
70	0.0038	0.1179
71	0.0094	0.1217
72	0.0048	0.1311
73	0.0078	0.1359
74	0.0084	0.1437
75	0.0100	0.1521
76	0.0101	0.1621
77	0.0068	0.1722
78	0.0006	0.1790
79	0.0363	0.1796
80	0.0334	0.2159
81	0.0327	0.2483
82	0.0244	0.2820
83	0.0232	0.3064
84	0.0224	0.3296
85	0.00414	0.3520





T_m DNA + Pt

TEMPERATURA	ABSORBANCIA
40	0.0060
45	0.0174
50	0.0294
55	0.0428
60	0.0568
61	0.0612
62	0.0681
63	0.0732
64	0.0782
65	0.0830
66	0.0825
67	0.0876
68	0.0933
69	0.0994
70	0.1056
71	0.1136
72	0.1210
73	0.1298
74	0.1384
75	0.1492
76	0.1632
77	0.1738
78	0.1807
79	0.1897
80	0.2137
81	0.2382
82	0.2706
83	0.2896
84	0.3169
85	0.3659





Tm DNA + Pt

TEMPERATURA	dA/dT	ABSORBANCIA
40	#REF!	0.0080
45	#REF!	0.0174
50	#REF!	0.0294
55	#REF!	0.0428
60	0.01104	0.0568
61	0.012	0.0612
62	0.0134	0.0681
63	0.014	0.0732
64	0.0044	0.0782
65	0.0069	0.0830
66	0.0051	0.0825
67	0.00500	0.0876
68	0.0048	0.0933
69	-0.0005	0.0994
70	0.0051	0.1056
71	0.0057	0.1136
72	0.0061	0.1210
73	0.0062	0.1298
74	0.008	0.1384
75	0.0074	0.1482
76	0.0088	0.1632
77	0.0086	0.1738
78	0.0108	0.1807
79	0.014	0.1897
80	0.0108	0.2137
81	0.0069	0.2382
82	0.009	0.2706
83	0.024	0.2896
84	0.0245	0.3169
85	-0.00038	0.3659

