

Interacción acetaminofén-bases nitrogenadas de DNA, un estudio electroquímico Acetaminophen-DNA nitrogenous bases interaction, an electrochemical study

M. G. Valencia-Valencia ^a, G. Alarcón-Ángeles ^{a,*}, M. T. Ramírez-Silva ^b, M. Gómez-Hernández ^a
M. Hurtado-y-de-la-Peña ^a

^a Farmacocinética y Farmacodinámica, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, 04960, Ciudad de México, México.

^b Área de Química Analítica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09310, Ciudad de México, México.

Resumen

En este trabajo, se expone por primera vez la interacción del acetaminofén con las bases púricas del DNA (guanina y adenina). El estudio de la interacción se realizó utilizando la voltamperometría diferencial de pulso (VDP), se encontró que, el acetaminofén, la guanina (G) y adenina (A) no presentan interferencia entre las diferentes especies, y sus señales puede ser analizadas de forma independiente. La interacción fue analizada con el efecto de la concentración del fármaco sobre los cambios de la corriente y el potencial y se observó una disminución significativa en la corriente de G y A lo que indica posibles interacciones químicas con las bases. Además, se analizó la interacción con el producto de oxidación de acetaminofén la N-acetil-para-benzoquinoneimina, a través su producción *in situ* por microelectrólisis, los resultados sugieren un daño sobre G y A inducido por la exposición al producto de la degradación oxidativa, la base más afectada es adenina.

Palabras Clave: interacción fármaco-bases nitrogenadas-DNA, daño-DNA, acetaminofén, guanina, adenina.

Abstract

The interaction of acetaminophen with the purine bases of DNA (guanine and adenine) is exposed for the first time. The study of the interaction was carried out through differential pulse voltammetry (VDP), there are not interference between acetaminophen, guanine (G) and adenine (A), so they can be analysed independently. The effect of the drug concentration was analysed from current and potential changes, as indicative of possible alterations in the bases, a significant decrease in the current of G and A was observed. In addition, interaction with oxidation product of acetaminophen, N-acetyl-para-benzoquinoneimine, was analysed through production *in situ* by electrodeposition of the oxidized species of the drug. the results show a damage on G and A induced by the exposure to the product of oxidative degradation, where the most affected base is adenine.

Keywords: drug-nitrogenous bases interaction, DNA-damage, acetaminophen, guanine, adenine.

1. Introducción

La adenina (A) y la guanina (G) forman parte de la estructura de los ácidos nucleicos, los cuales almacenan información genética y juegan un papel importante en la biosíntesis de proteínas, se sabe que tienen una gran variedad de funciones en el metabolismo de las células, por lo que los cambios en la estructura o en la concentración de A y G pueden desencadenar diversas enfermedades, como Parkinson, carcinoma y enfermedades hepáticas (McGill, H., 2012). Por otra parte, el acetaminofén (AFEN) es un fármaco usado frecuentemente como principio activo en una gran cantidad de medicamentos a nivel mundial y se ha reportado un sobreuso, así como algunos problemas de toxicidad. Sus productos de degradación con más relevancia son las N-acetil-para-

benzoquinoneimina (NAPQI) y el p-aminofenol, compuestos asociados con daño hepático y neurotóxico respectivamente (Jaeschke, *et al.*, 2012, Phillips & Arlt, 2009). Para identificar si hay un efecto nocivo a nivel DNA es necesario tener un método eficaz, en este caso, los métodos electroquímicos son una muy buena opción debido a su alta selectividad y sensibilidad, además de su costo relativamente bajo y facilidad de uso en comparación de otras técnicas (Hasanzadeh, *et al.*, 2016, Rehman, *et al.*, 2015).

Dado que, el AFEN puede degradarse por estrés oxidativo con H₂O₂, es posible usar como alternativa las técnicas electroquímicas para producir los productos de oxidación a partir de la aplicación de un potencial electroquímico adecuado, la producción de la especie oxidada dependerá del tiempo y del valor del potencial, en este caso el producto de

*Autor para la correspondencia: galarcon@correo.xoc.uam.mx

Correo electrónico: 2173065419@alumnos.xoc.uam.mx (María Guadalupe Valencia-Valencia), galarcon@correo.xoc.uam.mx (Georgina Alarcón-Ángeles), mtrs218@xanum.uam.mx (María Teresa Ramírez-Silva), mgomez@correo.xoc.uam.mx (Martín Gómez Hernández), mhurtado@correo.xoc.uam.mx (Marcela Hurtado-y-de-la-Peña).

oxidación se genera y acumula sobre la superficie del electrodo, este método resulta más amigable en comparación con el uso de H_2O_2 como agente oxidante, además tanto el fármaco como el producto pueden ser cuantificados por la misma técnica. Una vez generada la oxidación del AFEN, entonces es posible evaluar su interacción con las bases púricas.

Es así que, en este trabajo se estudia la interacción del AFEN con adenina y guanina, además se estudia la interacción de la especie oxidada NAPQI con adenina y guanina aplicando la voltamperometría diferencial de pulso. Se analiza el comportamiento electroquímico de cada especie, se evalúan las señales electroquímicas de guanina y adenina y se detecta cambios en los voltamperogramas de las bases púricas cuando están en presencia del AFEN en concentraciones altas o cuando están en presencia del producto de oxidación, NAPQI, se detectan cambios en la corriente y en los potenciales de pico.

2. Material y métodos

2.1. Reactivos

Se utilizó acetato de sodio, cloruro de sodio, ácido acético, guanina (porcentaje de pureza $\geq 98\%$), adenina (porcentaje de pureza $\geq 99\%$) y AFEN grado analítico. La solución amortiguadora de acetatos (SAA, 0.1 M) a pH 4.5 fue preparada con CH_3COOH y $C_2H_3NaO_2$, el pH fue ajustado con NaOH (1.0 M). Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada (MiliQ 18M Ω). Todos los reactivos usados son de la marca Sigma Aldrich.

2.2. Mediciones electroquímicas

Todas las mediciones electroquímicas se realizaron con un potencióstato portátil (Dropsens μ Stad400), para el estudio se usaron electrodos serigrafados (SPE) comerciales (Dropsens) que integran un electrodo de referencia (Ag/AgCl), un electrodo auxiliar (carbono) y de trabajo (carbono). La caracterización de AFEN, se realizó por voltamperometría cíclica (VC), mientras que, el estudio de la interacción se realizó por voltamperometría diferencial de pulso (VDP) en la ventana de potencial de 0 a 1.4 V, con un pulso de potencial de 0.06V, un tiempo de pulso de 75ms y velocidad 30mV/s. Para todas las mediciones se verificó que la superficie de electrodo no estuviera contaminada utilizando un sistema blanco.

El análisis cuantitativo de cada analito se realizó a partir de las curvas de calibración de los estándares. Los productos de oxidación de acetaminofén se obtuvieron de forma electroquímica aplicando un voltaje de 0.55 V, durante un tiempo establecido. El potencial de 0.55V corresponde a un sobre-potencial respecto a la oxidación de AFEN por DPV, lo cual permite la generación de la especie NAPQI, potenciales mayores podrían propiciar la oxidación de G y A.

2.3. Interacción fármaco-base púrica

Se prepararon sistemas electroquímicos mezclando acetaminofén-guanina, acetaminofén-adenina, acetaminofén-guanina-adenina, variando la concentración del acetaminofén, y se eligió una relación de concentraciones para la interacción por 4, 24 y 48 horas. Para cada experimento se realizó un sistema control y de forma individual se analizaron las soluciones de AFEN, G y A bajo las mismas condiciones.

2.4. Condiciones oxidantes

Se prepararon mezclas de acetaminofén-guanina, acetaminofén-adenina, acetaminofén-guanina-adenina, y utilizando el sistema de tres electrodos se realizó un microelectrólisis un potencial de oxidación aplicado de 0.55V en el intervalo 0 a 5min. El mismo tratamiento se aplicó a las disoluciones de cada uno de los analitos (AFEN, G y A). Posterior a la electrólisis se monitoreo los valores de potencial y de corriente de pico anódico. Se caracterizó la interacción entre G-AFEN y A-AFEN, a través de los desplazamientos de potencial y/o cambios en la señal analítica (corriente). Se considerará una posible interacción entre las especies cuando se tiene un cambio en la concentración mayor o igual 10% o cuando el potencial de las señales de oxidación se desplaza más de 50 mV.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización electroquímica

Como se ha informado el AFEN se oxida electroquímicamente a N-acetil-para-benzoquinoneimina (NAPQI) (Salehzadeh, H., 2021,), en la Figura 1a se presenta el comportamiento electroquímico de AFEN por voltamperometría cíclica, en el cual se observan las señales de los procesos de oxidación y reducción, la relación de corriente entre los picos anódico y catódico superior a 1.0, así como la diferencia entre los potenciales superior a 60 mV, es un indicativo de que el proceso redox del fármaco presenta una cinética de transferencia electrónica lenta (Bard, 2004). Por otra parte, el estudio de velocidad mostró que la oxidación de AFEN está controlado por difusión, se demuestra con el análisis de corriente en función de la raíz de velocidad de barrido de potencial ($v^{1/2}$), con $r^2 = 0.99$, la ecuación que representa el comportamiento es $I_a = 402.02v^{1/2} - 5.14$, $I_c = 205.89v^{1/2} + 19.54$. En el voltamperograma de la Figura 1 se muestra que el AFEN tiene una corriente de oxidación máxima a 0.61V.

La interacción fármaco-bases púricas se analizó a partir de las variaciones en los VDPs, en la Figura 2A, se muestra las señales características de los procesos de oxidación de AFEN, G y A, a 0.41 V, 0.78V y 1.10 V respectivamente. La separación de los potenciales de pico es cercana a 300 mV, por lo que se puede deducir que no existe interferencia entre las señales de los analitos y es factible la determinación de cada uno de los tres presentes en una mezcla (Figura 2B).

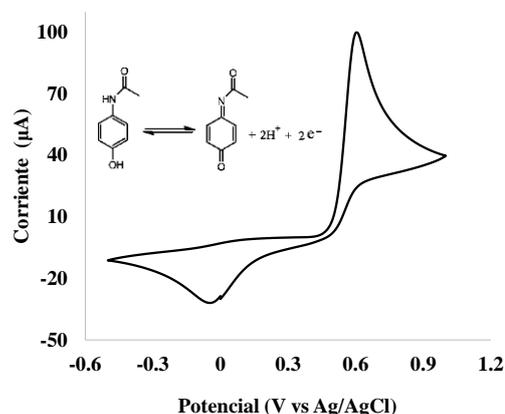


Figura 1: VC de AFEN [50 μ g/ml] a 100mV/s, en SAA, 0.1 M, pH 4.5, electrodo SPE.

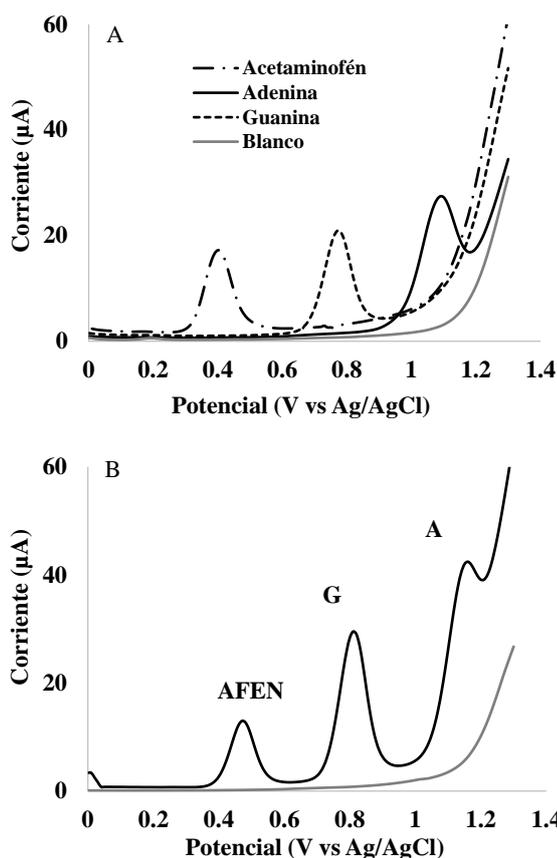


Figura 2: A) VDPs de soluciones de AFEN, G y A individuales, a una concentración de 0.3mM, y B) Mezcla de AFEN, G y A. Analizados a pH 4.5 y con un electrodo SPE.

3.2. Análisis cuantitativo

Para la determinación cuantitativa de las bases púricas se obtuvieron los VDPs y se evaluó la relación lineal entre la corriente de pico anódica (I_{pa}) y la concentración, en el intervalo de 20 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Las ecuaciones que representan las curvas de calibración son:

$$\text{Guanina: } I_{pa}(\mu\text{A}) = 0.461C (\mu\text{g/mL}) + 1.26; r^2=0.996$$

$$\text{Adenina: } I_{pa}(\mu\text{A}) = 0.517C (\mu\text{g/mL}) + 0.921; r^2=0.995$$

El coeficiente de variación sobre el factor respuesta de guanina fue 1.13%, mientras que para adenina fue de 2.93%, para $n=3$.

3.3. Efecto de la concentración de acetaminofén sobre guanina

Con el fin de conocer la interacción entre el fármaco y su producto de oxidación con la guanina, se analizó el efecto de la concentración de AFEN sobre la intensidad y potencial de la señal de la G (Figura 3A). Se observa que la señal de la G disminuye y no es cuantificable, mientras que el potencial de la señal de oxidación de la guanina se desplaza 80mV más positivo (Figura 3A). Un aspecto importante es que la señal de la guanina disminuye y se enmascara cuando la concentración del fármaco es 20 veces mayor que la de la base G (Figura 3). Por lo anterior se elige un sistema con una relación molar 5:1 AFEN/G para poder hacer el seguimiento en la interacción en función del tiempo de oxidación de AFEN, en estas condiciones los cambios producidos por la concentración de AFEN sobre la corriente de G corresponde a un cambio de corriente de pico anódico (ΔI_{pa}) menor al 10% y un desplazamiento del potencial (ΔE) menor a 50mV.

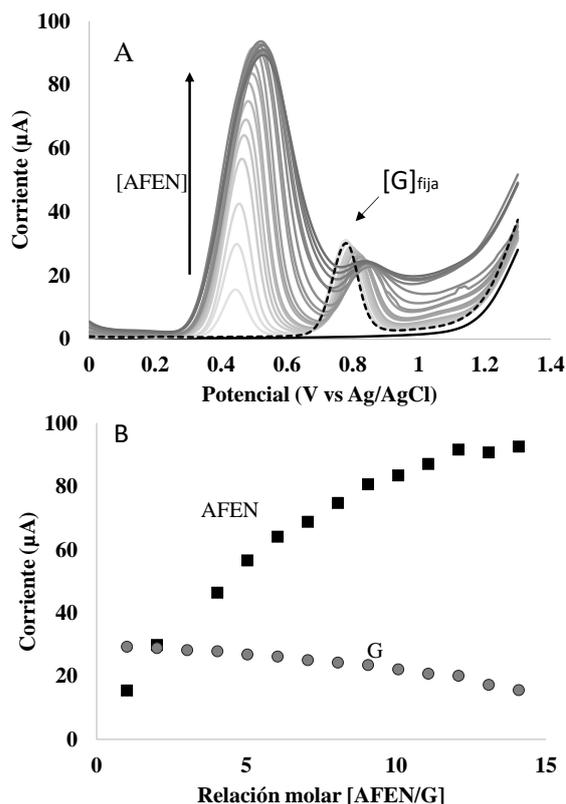


Figura 3: A) VDPs de la interacción G con AFEN a diferentes concentraciones. B) Efecto de la concentración de AFEN [de 0.3 a 6 mM] sobre guanina [0.3 mM].

3.4. Efecto de la concentración de acetaminofén sobre adenina

El efecto del incremento de la concentración de AFEN sobre la señal de adenina (Figura 4A), no tiene impacto a concentraciones bajas, donde la señal de A permanece sin cambios significativos. Cuando la concentración del fármaco es 8 veces mayor respecto a la de la base, la señal de la adenina no es cuantificable, es decir la adenina es enmascarada por el fármaco. Para el AFEN se presenta un comportamiento lineal de la corriente en función del incremento en la concentración, y a concentraciones altas se presenta un desplazamiento en el potencial de 50mV. Cabe mencionar que el tiempo de interacción es de 1.25min para cada concentración.

Para el seguimiento de la interacción fármaco-adenina bajo condiciones de potencial de oxidación impuesto se seleccionó un sistema con una relación molar 5:1 AFEN/A (Figura 4B), donde el cambio en la corriente es del 6% y el desplazamiento del potencial de pico anódico es de 20mV sobre A.

3.5. Estrés oxidativo

Para la producción de NAPQI, producto de la oxidación de AFEN, y establecer así el estrés oxidativo, se impuso al electrodo un potencial de oxidación superior al E_{pa} de AFEN para garantizar sólo la oxidación del fármaco, por lo que se eligió 0.55V, el potencial fue aplicado durante diferentes tiempos. Cuando el potencial se aplica por tres minutos y después se evalúa el VDP, la señal del AFEN disminuye significativamente (42%) por lo que, se considera que la especie oxidada incrementa su concentración sobre la superficie del electrodo, la variación en la señal está indicada en la Figura 5. Otros parámetros indicativos de la presencia de

la especie oxidada de AFEN es el desplazamiento del potencial (40mV), el cambio en la amplitud del pico, así como el desplazamiento en la línea base.

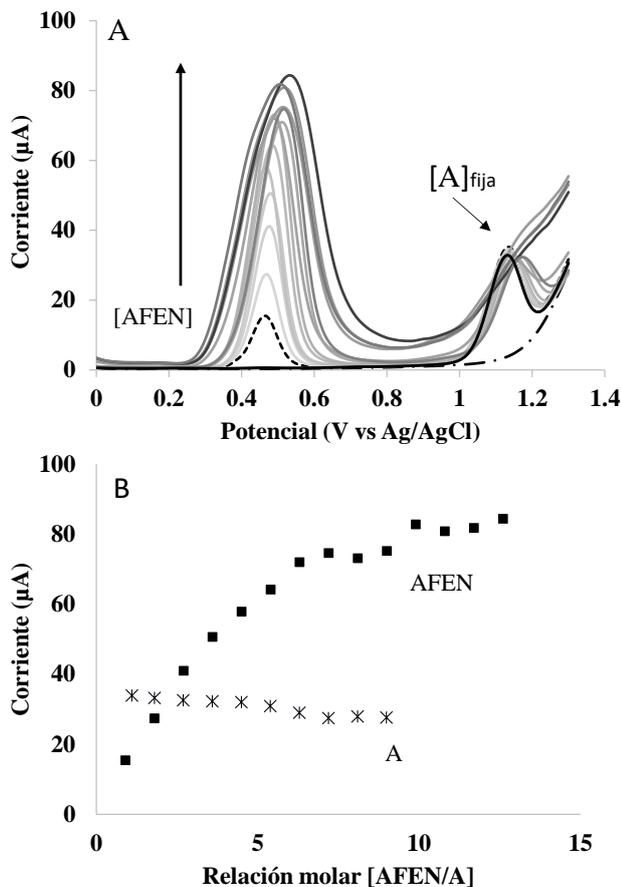


Figura 4: A) VDPs de la interacción A con AFEN a diferentes concentraciones. B) Efecto de la concentración de AFEN [de 0.3 a 4.5 mM] sobre Adenina [0.3 mM].

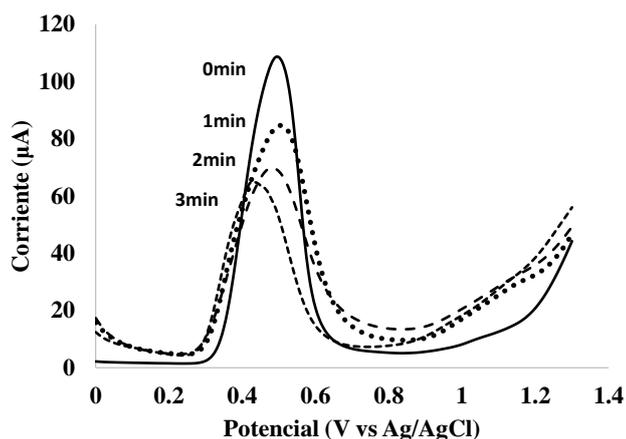


Figura 5: VDP AFEN (2.2 mM) con estrés oxidativo a diferentes tiempos de potencial de aplicación ($E_{pa} = 0.55V$).

3.6. Interacción Acetaminofén guanina y Acetaminofén adenina

Para analizar el efecto de la N-acetil-para-benzoquinoneimina sobre la guanina, primero se evaluó el potencial aplicado (0.55 V) sobre guanina en ausencia del AFEN. La Figura 6A, muestra que la guanina no presenta ninguna alteración sobre el potencial de oxidación, y el valor de la corriente del pico tiende a disminuir ligeramente

proporcional con el tiempo de aplicación de potencial (25% en 15 min). La disminución en la corriente se asocia a la disminución en la concentración de la guanina; que se puede oxidar en condiciones de subpotencial. Por otra parte, en el estudio de la interacción del fármaco con guanina ($[AFEN/G] = 5:1$) en condiciones de estrés oxidativo, ver Figura 6B, se encontró que, al aplicar el potencial por 5min, tanto la señal del AFEN como de la G disminuyen de forma significativa, la aparición de una nueva señal en la ventana de potencial de 0.2 a 0.35V sugiere la formación de una nueva especie. Considerando que la corriente de la nueva señal aumenta con el tiempo de exposición de la guanina ante el producto de oxidación del fármaco, entonces en $E_{pa} = 0.34V$ se propone que el producto se genera a partir de la interacción AFEN-guanina, en particular se ha reportado que la guanina puede formar puentes de hidrógeno entre los grupos amino de la base y grupos funcionales como C=O de otras especies, por lo que se propone este tipo de interacción entre el NAPQI y la guanina. La inhibición de la señal de la guanina es otro indicativo de esta posible asociación NAPQI-G.

En el análisis de la interacción del AFEN con adenina, primero se evaluó el efecto de imponer el potencial de oxidación de 0.55V sobre la señal de adenina y se encontró que no hay cambios significativos sobre la corriente ó sobre el potencial de oxidación (Figura 7A). En el caso de la relación molar AFEN/A 5:1, Figura 7B, la señal de adenina disminuye hasta desaparecer después del primer minuto de imponer el potencial (oxidación del fármaco). Los cambios en la corriente de oxidación del AFEN sugieren que disminuye su concentración y que su proceso de oxidación está cambiando ya que el potencial de pico se desplaza y el ancho aumenta.

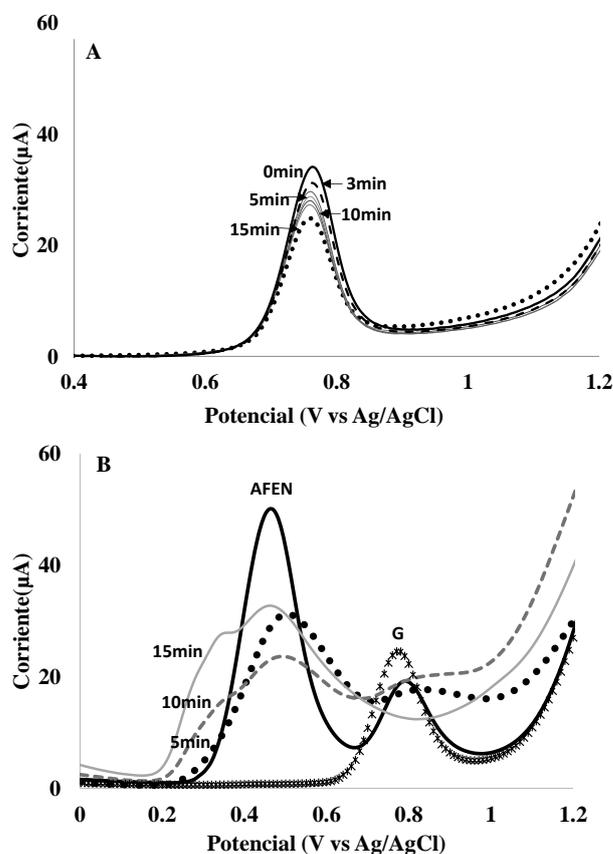


Figura 6: Efecto del potencial (0.55V) aplicado A) guanina B) guanina en presencia de AFEN (1.5mM) durante 0.5 y 15min.

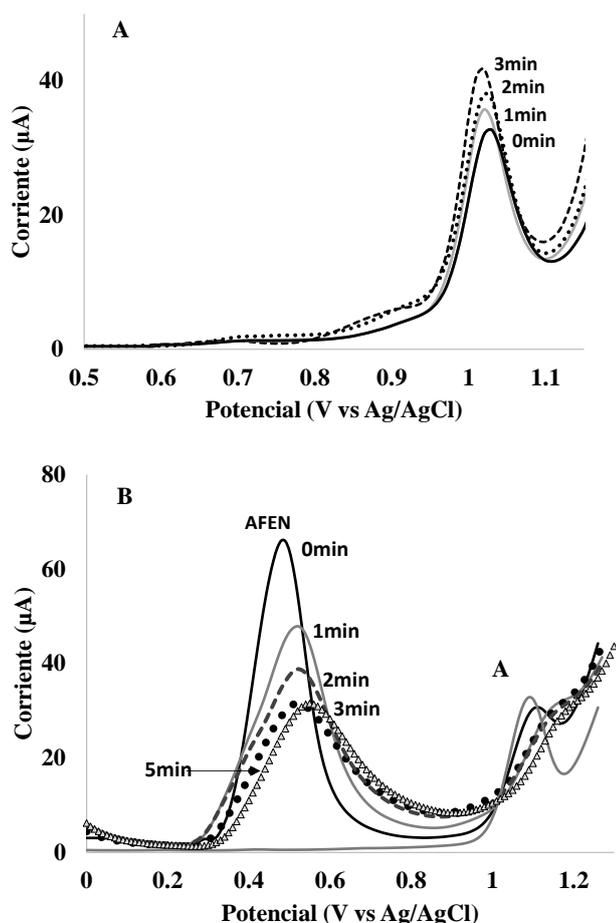


Figura 7: VDPs Efecto del potencial (0.55V) aplicado sobre A) adenina B) adenina en presencia de AFEN (2mM) durante 0. 5 y 15min.

3.7. Interacción de la NAPQI con mezcla guanina-adenina en condiciones de estrés

En el estudio de la interacción AFEN: A: G (Figura 8) a una relación molar 10:1:1, a través de los VDPs muestra que la especie oxidada del fármaco y las bases púricas interactúan, y que la señal de guanina y adenina son enmascaradas cuando están expuestas por más tiempo al producto de oxidación del AFEN, la base púrica que sufre mayor efecto es la adenina, pues su señal de oxidación ya no es detectada en los primeros 5 min. de interacción con la especie NAPQI (ver Figura 8).

En la Figura 8, se observa un comportamiento similar al mostrado en la Figura 6, la interacción entre el AFEN, NAPQI y guanina, genera una señal de oxidación en la ventana de potencial 0.2 a 0.42 V. Considerando las interacciones individuales de las bases púricas con el fármaco, se conoce que la guanina contribuye fuertemente a la formación de la especie que se oxida en 0.34V, así también se observa que la línea base (corriente capacitiva) tiende a incrementar como un resultado de la interacción, lo que no se observa en las Figuras 6 y 7.

Las interacciones entre el AFEN y la especie oxidada NAPQI con las bases púricas pueden asociarse a la formación de enlaces tipo puente de hidrógeno siendo mayores en el producto de oxidación del fármaco con la base, ya que la formación de la quinona facilita la interacción con la base a través de los grupos C=O, C=N, y NH de los 4 compuestos. Otro mecanismo reportado en estudios electroquímicos indica

la presencia de especies degradadas de guanina a valores de potencial menos positivos al valor de oxidación de la base púrica. Este proceso involucra la formación de radicales libres que dan origen a la formación de 8-oxoguanina o bien 8-oxoadenina (Hassani *et al.*, 2021, Oliveira-Brett *et al.*, 2002, 2002); es así como en los sistemas evaluados se puede considerar que al oxidarse el AFEN se generen radicales libres que oxidan en fase homogénea a las bases púricas antes mencionadas, generando la nueva señal de oxidación de las bases púricas a un potencial de 0.38V.

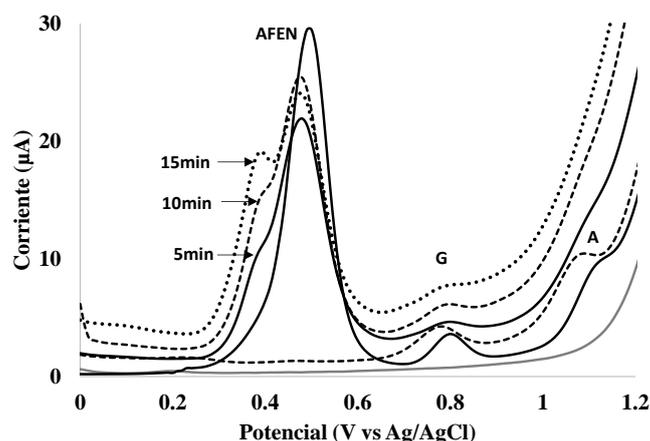


Figura 8: Interacción AFEN (5×10^{-5} M) guanina, adenina (relación molar 10:1:1) con aplicación de potencial 0.55V, en solución amortiguadora pH = 4.5.

4. Conclusión

La oxidación del AFEN a NAPQI en presencia de Guanina origina una nueva señal voltamperométrica a 0.34 V, así como la disminución de la concentración interfacial del fármaco.

A partir de los desplazamientos de potencial y los cambios en la corriente (concentración), se propone una interacción del AFEN y NAPQI con las bases púricas, una posible asociación por puentes de hidrógeno.

Los mecanismos de interacción pueden originarse por una oxidación de AFEN a subpotencial, por la oxidación de AFEN catalizada por la formación de puentes de hidrógeno con la Adenina y Guanina, o por una oxidación en fase homogénea de la guanina por radicales libres provenientes del NAPQI.

El estudio revela que es posible monitorear el daño u oxidación de las bases púricas de DNA causado por el fármaco y por su metabolito oxidado, por lo que podría desarrollarse un método para poder analizar el daño que generan los productos oxidación de cualquier fármaco a las bases púricas de DNA.

Agradecimientos

Los autores MTRS y GAA desean expresar su agradecimiento al SNI por el reconocimiento y estímulo otorgado.

Referencias

- Bard, A. & Faulkner, L., (2004) *Electrochemical Methods Fundamentals and Application*. 2nd ed. New York: Wiley.
- Bermúdez, R., Quesada Vargas, M., Esquivel Rodríguez, N. (2019). Intoxicación por acetaminofén: diagnóstico y abordaje en el adulto. *Revista Médica Sinergia*, 4, e257. DOI: 10.31434/rms.v4i7.257

- De la Cruz Morales, K., Alarcón-Angeles, G., Merkoçi, A., (2019). Nanomaterial-based Sensors for the Study of DNA Interaction with Drugs 31, 1845-1867.
DOI: 10.1002/elan.201900286
- Jaeschke, H., McGill, M. R., Ramachandran, A., (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews*, 44, 88–106.
DOI: 10.3109/03602532.2011.602688
- Hassani Moghadam, F., Taher, M.A., Karimi-Maleh, H., (2021). Doxorubicin Anticancer Drug Monitoring by ds-DNA-Based Electrochemical Biosensor in Clinical Samples. *Micromachines* 12, 808.
DOI:10.3390/mi12070808
- Hasanzadeh, M., Shadjou, N., (2016). Pharmacogenomic Study Using Bio- and Nanobioelectrochemistry: Drug–DNA Interaction. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 1002–1017.
DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.020
- McGill, H., Ramachandran, A. (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews*, 44(1), 88–106
DOI:10.3109/03602532.2011.602688
- Oliveira-Brett, A.M., Diculescu V., Piedade, J.A.P., (2002). Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode *Bioelectrochemistry* 55, 61-62.
DOI: 10.1016/S1567-5394(01)00147-5
- Oliveira-Brett, A.M., Diculescu V., (2004). Electrochemical study of quercetin–DNA interactions: Part II. In situ sensing with DNA biosensors. *Bioelectrochemistry* 64, 143-150.
DOI: 10.1016/j.bioelechem.2004.05.002
- Phillips, D. H., & Arlt, V. M., (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. In A. Luch (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. 1, 87-110.
DOI: 10.1007/978-3-7643-8336-7_4
- Rehman, S.U., Sarwar, T., Husain, M.A., Ishqi, H.M., Tabish, M., (2015) Studying Non-Covalent Drug–DNA Interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 576, 49–60.
DOI: 10.1016/j.abb.2015.03.024
- Salehzadeh, H., (2020) Tunable oxidative release of N-acetyl-p-benzoquinone-imine and acetamide from electrochemically derived sub-monolayer acetaminophen modified glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 880:1572-6657.
DOI: 10.1016/j.jelechem.2020.114845.