

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLIAMINAS TRIPODALES PARA EL RECONOCIMIENTO DE ADN NO CANÓNICO

Curso 2024-2025

Trabajo Final de Grado

Autora

María Navarro Hernández

Tutores académicos

Enrique García-España Monsosís

Mario Alfonso Inclán Nafría

Cotutor académico

Luis Antonio Tortajada Genaro

Valencia, España

2024

Título: Síntesis y caracterización de poliaminas tripodales para el reconocimiento de ADN no canónico

Resumen

La molécula de ADN, conocida por almacenar la información genética de los seres vivos, no se limita a la clásica doble hélice dextrógira; también puede adoptar formas alternativas más allá de su reconocible estructura. Esta versatilidad se manifiesta en el ADN no canónico, que engloba a estructuras como la triple hélice, los motivos i, o los G-cuádruplex (G4). Este último tipo de configuración se encuentra en las regiones promotoras de ciertos genes y principalmente en los telómeros, lo que ha generado un gran interés debido a su rol en importantes procesos biológicos, como la regulación de la expresión génica, la estabilidad del genoma o el envejecimiento celular. Por ello, el ADN G4 se ha convertido en una diana potencial para la lucha contra el cáncer. En la actualidad, se está desarrollando una amplia área de investigación centrada en el diseño de pequeñas moléculas que puedan estabilizar e interactuar de manera selectiva con los G4s en las regiones teloméricas, abriendo nuevas vías en la terapia antitumoral.

Este proyecto se centra en el desarrollo de una nueva poliamina tripodal conjugada con la trifenilamina (TPA), diseñada específicamente para interactuar con las estructuras G-cuádruplex del ADN. El trabajo se enmarca dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030, subrayando la importancia de la química medicinal en el progreso hacia una salud global mejorada. El estudio abarca desde la síntesis y caracterización de la poliamina hasta la evaluación de su interacción con las estructuras G-cuádruplex mediante el uso de técnicas analíticas y estudios biológicos. Se han empleado métodos potenciométricos y fotoquímicos para caracterizar y determinar el comportamiento ácido base del ligando. Además, se han llevado a cabo estudios de agregación y de interacción con metales de transición para comprender aún mejor el comportamiento de la poliamina en diferentes contextos, que junto con los estudios biológicos, incluyendo ensayos de viabilidad celular, han permitido determinar la eficacia de la poliamina en el ámbito tumoral.

De esta forma, este estudio representa un paso adelante en la biotecnología aplicada a la química medicinal, proporcionando nuevas rutas para el desarrollo de terapias contra el cáncer, consolidándose como una base sólida para futuras investigaciones que permitan llevar al diseño de fármacos más eficientes y seguros enfocados en los G-cuádruplex y en su papel terapéutico.

Palabras clave: G-cuádruplex; terapia antitumoral; poliamina tripodal, regulación génica, química supramolecular.

María Navarro Hernández

Valencia, junio de 2024

Tutores académicos

Mario Alfonso Inclán Nafría

Enrique García-España Monsosís

Cotutor académico

Luis Antonio Tortajada Genaro

Title: Synthesis and characterization of tripodal polyamines for the recognition of non-canonical DNA

Summary

The DNA molecule, known for storing the genetic information of living beings, is not limited to the classic right-handed double helix; It can also take alternative forms beyond its recognizable structure. This versatility is manifested in non-canonical DNA, which encompasses structures such as the triple helix, i motifs, or G-quadruplexes (G4). This last type of configuration is found in the promoter regions of certain genes and mainly in the telomeres, which has generated great interest due to its role in important biological processes, such as the regulation of gene expression, genome stability or cellular aging. Therefore, G4 DNA has become a potential target for the fight against cancer. Currently, a broad area of research is being developed focused on the design of small molecules that can stabilize and interact selectively with G4s in telomeric regions, opening new avenues in antitumor therapy.

This project focuses on the development of a new tripodal polyamine conjugated to triphenylamine (TPA), specifically designed to interact with the G-quadruplex structures of DNA. The work is framed within the Sustainable Development Goals of the 2030 agenda, underlining the importance of medicinal chemistry in progress towards improved global health. The study ranges from the synthesis and characterization of the polyamine to the evaluation of its interaction with G-quadruplex structures through the use of analytical techniques and biological studies. Potentiometric and photochemical methods have been used to characterize and determine the acid-base behavior of the ligand. In addition, aggregation and interaction studies with transition metals have been carried out to even better understand the behavior of the polyamine in different contexts, which together with biological studies, including cell viability assays, have allowed us to determine the effectiveness of the polyamine in the tumor area.

In this way, this study represents a step forward in biotechnology applied to medicinal chemistry, providing new routes for the development of cancer therapies, consolidating itself as a solid basis for future research that leads to the design of more efficient and safe drugs. focused on G-quadruplexes and their therapeutic role.

Keywords: G-quadruplex; antitumor therapy; Tripodal polyamine, gene regulation, supramolecular chemistry.

Maria Navarro Hernandez

Valencia, June 2024

Academic tutors

Mario Alfonso Inclán Nafría

Enrique García-España Monsosís

Academic co-tutor

Luis Antonio Tortajada Genaro

Agradecimientos

Este trabajo final de grado representa para mí los cuatro años de esfuerzo, dedicación y entrega a mi carrera, pero tengo claro que si no hubiese contado con el apoyo, cariño y tiempo de muchas personas, no hubiera sido posible.

Primero, quiero dar las gracias a mis tutores académicos, Enrique y Mario. Tuvieron la confianza de acogerme en su grupo de Química Supramolecular en el Parque Científico de Valencia y de permitirme realizar este proyecto en el Instituto de Ciencia Molecular (ICMOL). Gracias a todo el aprendizaje y dedicación que me han otorgado, esta experiencia se ha convertido para mí en una oportunidad para seguir adelante en mi carrera científica, por lo que les estoy sumamente agradecida a los dos.

También me gustaría agradecer a Luis Antonio, por aceptar ser mi co-tutor en la Universidad Politécnica de Valencia y por su hospitalidad e interés durante mi estancia de prácticas.

A mis padres, José e Isabel, por haberme proporcionado la mejor educación, lecciones de vida, y sobre todo, por confiar en mí y hacerme ver que podía conseguir mi objetivo. Gracias por inculcarme el sentimiento de compromiso y entrega, que no me ha dejado tirar la toalla y luchar hasta el final.

Y no puedo olvidarme de mis abuelos, gracias por ser mis motores para continuar, por ser mi inspiración en todos estos años. Han sido y siguen siendo unos referentes para mí, que con su apoyo y cariño durante todo este tiempo, han logrado que este sueño se haga realidad.

Índice general

RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030 AL TRABAJO FINAL DE GRADO..... IX

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR Y MEDICINA.....	1
1.1.1. Contexto histórico.....	1
1.1.2. Enfoque supramolecular de la química medicinal.....	1
1.2. APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS POLIAMINAS.....	2
1.3. ADN-G-CUÁDRUPLEX (ADN G4).....	3
1.3.1. Configuración estructural.....	3
1.3.2. Papel biológico.....	4
1.3.2.1. G4s en la replicación del ADN.....	4
1.3.2.2. G4s en la transcripción del ADN.....	4
1.3.2.3. G4s y los telómeros.....	5
1.3.3. G4 como dianas terapéuticas.....	5
1.4. LIGANDOS-G4.....	6
1.4.1. Poliaminas tripodales.....	7
1.4.2. Trifenilamina (TPA).....	7
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. METODOLOGÍA GENERAL.....	9
3.1.1. Reactivos y disolventes para la síntesis.....	9
3.1.2. Análisis elemental.....	9
3.1.3. Espectrometría de masas.....	9
3.1.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).....	10
3.1.5. Potenciometría.....	10
3.1.5.1. Fundamento teórico.....	10
3.1.5.2. Sistema potenciométrico.....	11
3.1.5.3. Procedimiento y análisis de datos.....	11
3.1.6. Espectroscopia UV-Vis y fluorescencia.....	12
3.1.6.1. Procedimiento experimental.....	12
3.1.7. Estudios de interacción con metales de transición y metales postransición.....	13
3.1.7.1. Fundamento teórico.....	13
3.1.7.2. Disolución tampón, reactivos y disolvente.....	13
3.1.7.3. Procedimiento experimental.....	13
3.1.8. Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	14

3.1.8.1. Procedimiento experimental.....	14
3.1.9. Dinámica molecular.....	14
3.1.10. Ensayo de fusión por desnaturalización térmica FRET.....	14
3.1.10.1. Fundamento teórico.....	14
3.1.10.2. Secuencias investigadas de ADN.....	16
3.1.10.3. Procedimiento experimental.....	16
3.1.11. Estudios biológicos.....	18
3.1.11.1. Cultivo celular y mantenimiento.....	18
3.1.11.2. Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo MTT.....	18
3.1.11.2.1. Principio del ensayo.....	18
3.1.11.2.2. Procedimiento experimental.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. SÍNTESIS.....	19
4.1.1. Caracterización ligando.....	21
4.2. COMPORTAMIENTO ÁCIDO-BASE.....	22
4.2.1. Potenciometría	22
4.2.2. Fotofísica.....	23
4.2.2.1. Linealidad.....	23
4.2.2.2. Estudios espectroscopia de emisión fluorescencia y UV-Vis.....	24
4.2.2.3. Estudios de interacción con metales de transición y postransición.....	26
4.3. ESTUDIOS DE AGREGACIÓN.....	28
4.3.1. Efecto de la polaridad del medio.....	28
4.3.2. Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	29
4.3.3. Dinámica molecular.....	29
4.4. INTERACCIÓN CON ADN.....	30
4.4.1. Ensayos de fusión por desnaturalización térmica FRET.....	30
4.4.2. Dinámica molecular.....	31
4.5. ESTUDIOS BIOLÓGICOS.....	32
4.5.1. Evaluación viabilidad celular mediante ensayo MTT.....	32
6. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	33
7. BIBLIOGRAFÍA.....	35
8. ANEXOS	

Índice de tablas

Tabla 1.1. Estimación de energía de disociación para diferentes tipos de interacciones supramoleculares en relación con el enlace covalente.....	6
Tabla 3.1. Secuencias ADN empleadas en los ensayos.....	16
Tabla 4.1. Valores experimentales de los reactivos utilizados para la síntesis.....	21
Tabla 4.2. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, del compuesto TPA-tren.....	22

Índice de figuras

Figura 1.1. (a) Distribución de las bases de guanina en la tétada G, junto con un ion metálico situado en el centro .Adaptado de Burge et al., (2006). (b) Vista superior de una estructura cuádruple compuesta por tétadas G, con dG (en verde), dT (en azul) y con el canal central de iones K ⁺ (en morado).....	3
Figura 1.2. Conformación espacial del ligando sintetizado en su forma totalmente protonada, resultado, resultado de la combinación entre TPA (núcleo central) y tren (cadena lateral).....	8
Figura 3.1. Esquema de potenciómetro. 1: Sistema Informático, 2: NaOH 0.1M, 3: Bureta automática, 4: Entrada argón 5: Celda de medida, 6: Celda de referencia, 7: Electrodo de medida, 8: Electrodo de referencia, 9: Puente salino Wilhelm, 10: pH-metro.....	11
Figura 3.2. Representación del principio del ensayo por desnaturalización térmica.....	15
Figura 3.3. Gráfica de ΔT_m debido al efecto FRET.....	16
Figura 3.4. Ilustración del ligando y secuencias de ADN empleadas.....	17
Figura 3.5. Representación gráfica de la distribución de la placa ELISA para llevar a cabo el ensayo por desnaturalización térmica.....	17
Figura 3.6. Gráfica de ΔT_m debido al efecto FRET.....	18
Figura 4.1. Procedimiento general para la síntesis de los compuestos derivados de TPA con su posterior reducción a amina.....	20
Figura 4.2. Esquema de TPA-tren.....	21
Figura 4.3. Diagrama de distribución del ligando elaborado a partir de las constantes de protonación calculadas. Las cargas se han omitido.....	23
Figura 4.4. Recta de calibrado Absorbancia vs Concentración.....	24
Figura 4.5. Espectro UV-Vis de TPA-tren en función del pH.....	24
Figura 4.6. Espectro de excitación de TPA-tren.....	25
Figura 4.7. Espectro de emisión de fluorescencia del ligando en función del pH.....	25
Figura 4.8. Representación de la transferencia de electrones fotoinducida en un sistema aceptor-dador.....	26
Figura 4.9. Diagrama de distribución (líneas sólidas) y variación del máximo de emisión de fluorescencia (rombos rojos) del ligando TPA-tren en función del pH.....	26
Figura 4.10. Espectro de emisión de fluorescencia del ligando solo (curva roja), en combinación con Cu ²⁺ (curva gris), Zn ²⁺ (curva amarilla), Mn ²⁺ (curva azul) y Ni ²⁺ (curva verde).....	27
Figura 4.11. Variación del máximo de emisión a 368 nm del ligando en su interacción con diferentes cationes metálicos.....	27
Figura 4.12. Comparativa de espectro obtenido por resonancia magnética nuclear en una muestra recién preparada (arriba) y la misma muestra después de varios días de incubación (abajo).....	28
Figura 4.13. Espectro de emisión de fluorescencia en función del porcentaje de DMF empleado..	28
Figura 4.14. Diagrama de barras representando el tamaño hidrodinámico según el porcentaje de intensidad lumínica.....	29
Figura 4.15. Disposición espacial de tres moléculas neutras de nuestro ligando en un medio acuoso	29
Figura 4.16. Diagrama de barras ilustrando la ΔT_m en función de la concentración del ligando en combinación con ds26 (barra negra), 22CTA (barra verde claro), cmyc (barra azul oscuro), 26TTA (barra gris), 24TTG (barra verde oscuro) y TBA (barra azul claro).....	30

Figura 4.17. Estructura de rayos X del complejo entre la alfa trombina humana y el aptámero de unión a trombina en presencia de iones de potasio. una concentración de 0.4 μ M.....	31
Figura 4.18. Resultado de la simulación por dinámica molecular (5ns) del ligando con el G-cuádruplex.....	31
Figura 4.19. Placa Elisa del ligando a las 24 horas y a las 48 horas. Desde el borde superior, la primera fila corresponde con la concentración del ligando a 100 μ M, la segunda fila a 50 μ M, la tercera fila a 10 μ M y la cuarta fila a 1 μ M. Triplicado por cada concentración, con un cuarta columna que corresponde al control.....	32
Figura 4.20. Diagrama de barras de la viabilidad celular en función de la variación de la absorbancia con la concentración del ligando, tanto a las 24 horas (barras azules) como a las 48 horas (barras naranjas).....	32

Índice de abreviaturas y acrónimos

δ	Desplazamiento químico
γ	Coefficiente de actividad
ϵ	Coefficiente de extinción molar
λ	Longitud de onda
μL	Microlitro
μM	Micromolar
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN ds	Ácido desoxirribonucleico de doble hebra
AIE	Emisión Inducida por Agregación
ARN	Ácido ribonucleico
ΔT_m	Incremento de la temperatura de fusión
C	Citosina
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear de resonancia magnética nuclear
D ₂ O	Agua deuterada
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
ds	Hélice de doble hebra
E	Potencial de solución
FAM	6-carboxifluoresceína
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster

G	Guanina
G4	G-cuádruplex(singular)
G4s	G-cuádruplex(plural)
H	Horas
H ⁺	Catión hidrógeno
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina-sulfónico
HOMO	Orbital molecular ocupado más alto
HSQC	Experimento de coherencia cuántica única heteronuclear
IC ₅₀	Concentración de ligando necesaria para disminuir un 50% la viabilidad celular
J	Constante de acoplamiento
K	Grados Kelvin
<i>K</i>	Constante de equilibrio
KCl	Cloruro de potasio
L	Ligando
LUMO	Orbital molecular desocupado más bajo
ma	Monoaldehído
m/z	Relación masa-carga
MD	Dinámica molecular
mg	Miligramo
MHz	Megahercio
Milli-Q	Agua ultrapura de doble destilación
min	Minuto
mL	Mililitro
mmol	Milimol
mM	Milimolar
MTBP	Proteína implicada en el origen de la replicación
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

nm	Nanómetro
OD	Densidad óptica
OGRE	Elementos Repetidos de Origen ricos en Guanina
PBS	Tampón fosfato salino
PDB	Banco de datos de proteínas
PET	Transferencia de electrones fotoinducida
pKw	Producto iónico del agua
RMN	Resonancia magnética nuclear
RIF1	Proteína reguladora del tiempo de replicación
SCSIE	Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental
T	Timina
TAMRA	5-tetrametilrodamina
TMS	Tetrametilsilano
TPA	Trifenilamina
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030 al Trabajo final de grado

A. Indicar el grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad		X		
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico		X		
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables		X		
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.	X			

B. Describir brevemente la alineación del TFG con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

Mi trabajo final de grado presenta una relación notable con varios de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, de los cuales considero que los que se ven más influenciados son el ODS 3 (Salud y Bienestar), ODS 9 (Industria, innovación e infraestructuras) y ODS 17 (Alianzas para lograr objetivos).

Mi trabajo está directamente relacionado con el objetivo ODS 3, ya que se centra en el desarrollo de una molécula con potencial terapéutico contra el cáncer. Este ODS busca garantizar una vida sana y bienestar en las personas, por lo que mi investigación podría tener impacto en la mejora de los tratamientos contra el cáncer al abrir el camino para explotar una diana biomolecular nueva y, por ende, en la salud y bienestar de todos.

Además, mi trabajo también se relaciona con la industria, innovación e infraestructuras (ODS 9), ya que el uso de técnicas avanzadas de química supramolecular, así como técnicas espectroscópicas avanzadas para el estudio de la interacción con formas no canónicas de ADN podría tener implicación en la innovación farmacéutica.

Por último, aunque no menos importante, también se podría vincular con el ODS 17, ya que si consideramos el esfuerzo conjunto que se requiere para el desarrollo y la aplicación clínica de un nuevo fármaco, es necesario establecer alianzas y colaboraciones interdisciplinarias para lograr los objetivos planteados.

En definitiva, mi trabajo presenta una relación alta con los ODS 3, 9 y 17, ya que contribuye de manera significativa con la mejora de la salud y el bienestar, fomenta la innovación en la industria y promueve la colaboración y establecimiento de asociaciones para alcanzar los objetivos esperados.