



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

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

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Navarro Hernández, María

Tutor/a: Tortajada Genaro, Luis Antonio

Cotutor/a externo: Garcia-España Monsonis, Enrique

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

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 0.4μM.....	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 μM, la segunda fila a 50 μM, la tercera fila a 10 μM y la cuarta fila a 1 μM. 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.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Química supramolecular y medicina

1.1.1. Contexto histórico

Desde el comienzo de la civilización, ha habido una gran preocupación por comprender y manipular las transformaciones de los elementos en la naturaleza. Entre los mayores esfuerzos realizados en esta búsqueda figuran los destinados a la domesticación del fuego y la conversión de metales comunes en oro. Este último avance fue el principal objetivo de los alquimistas, convirtiendo a la alquimia en pionera de la metalurgia.

Culturas milenarias como la china, la hindú y la mediterránea, utilizaron plantas y minerales con fines curativos, mientras que los griegos reconocieron el uso de ciertos minerales como terapéuticos (Lemke et al., 2012). Tras siglos de historia, en los que la alquimia se dividió en dos corrientes distintas, una dedicada a la transmutación de metales y otra a la curación, la alquimia se orientó finalmente hacia la curación de enfermedades, allanado el camino a la química medicinal y por ende, a la química moderna. Gracias a los logros obtenidos a lo largo del siglo XIX en la síntesis de determinados compuestos, así como el aislamiento de alcaloides en plantas medicinales, se produjo un gran desarrollo en la industria farmacéutica, siendo el siglo XX testigo de una era de crecimiento exponencial en la producción de fármacos (Asimov, 2007).

Históricamente, los fármacos se han obtenido a partir de fuentes naturales; de hecho, un caso emblemático que tuvo lugar en la Grecia clásica fue el uso de la corteza de sauce, conocida por aliviar los dolores de cabeza, que inspiró la creación de la aspirina hacia finales del siglo XIX (Smith, 2005). Sin embargo, aunque los productos naturales constituyen el 50% de fármacos descubiertos entre 1981 y 2002 (Newman et al., 2003), sus limitaciones han llevado a la industria a centrarse en la química combinatoria, para generar colecciones de compuestos sintéticos con mayor potencial (Smith, 2005).

1.1.2. Enfoque supramolecular de la química medicinal

La química supramolecular, una disciplina destacada según Jean-Marie Lehn, se enfoca en el estudio de entidades químicas más complejas que las moléculas simples, y que permanecen unidas mediante fuerzas intermoleculares. Este campo juega un papel primordial en la optimización del descubrimiento de medicamentos, permitiendo el desarrollo y análisis de estructuras químicas más avanzadas. Como es notorio, la mayoría de interacciones clave en los sistemas biológicos son de tipo supramolecular, y no covalente, por lo que tienen naturaleza supramolecular (Chapman & Sherman, 1997). Es más, la interacción de cualquier medicamento con el organismo en algún nivel será de este tipo (García-España et al., 2012). Es evidente, por tanto, que la química supramolecular tiene mucho que contribuir al avance de la química médica.

Por otro lado, la medicina es un campo apasionante para explorar las aplicaciones de la química. De hecho la química supramolecular ha revolucionado nuestra perspectiva sobre los mecanismos de las enfermedades y sus aproximaciones terapéuticas. Por lo que, tanto la química medicinal como la supramolecular han expandido sus horizontes, influenciándose y beneficiándose mutuamente.

Por ello, descubrir las interrelaciones entre la química y la medicina puede ser un estímulo para demostrar lo importante y relevante que es estudiar química a un nivel más profundo y avanzado, mostrando cómo el conocimiento de la química tiene aplicaciones significativas en la medicina (Smith, 2005).

1.2. Aplicaciones biomédicas de las poliaminas

El cáncer continúa siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial. De acuerdo con datos recientes, en 2020 se registraron unos 19,3 millones de nuevos casos de cáncer y aproximadamente 10 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad. Factores como el envejecimiento, la contaminación ambiental, y la prevalencia de ciertos estilos de vida, entre otros riesgos, sugieren que la incidencia del cáncer podría incrementarse en los próximos 20 años. Por lo tanto, se necesita desarrollar con urgencia intervenciones médicas efectivas para disminuir la mortalidad por cáncer (Fan et al., 2023).

Durante las últimas cuatro décadas, se han conseguido progresos notables en la comprensión de las bases moleculares del cáncer. Se ha reconocido que esta enfermedad neoplásica surge de alteraciones genéticas que afectan a la proliferación, diferenciación, metástasis y senescencia celular. Asimismo, estas modificaciones genéticas tienen orígenes distintos y pueden causar una pérdida o ganancia de la función genética. La carcinogénesis, por su parte, se caracteriza por ser un proceso multifacético que provoca anomalías cromosómicas y mutaciones en distintos genes, favoreciendo un crecimiento selectivo y colaborativo de las células cancerígenas, lo cual resulta en una desregulación del crecimiento celular en varios niveles (Fearon & Vogelstein, 1990).

El descubrimiento de la presencia ubicua a nivel celular de compuestos de masa molecular discreta capaces de unirse y estabilizar un gran número de aniones celulares, como el ADN de doble cadena, ha constituido un foco de gran interés para la investigación biomédica. Estas moléculas, las poliaminas, debido a su naturaleza policatiónica, pueden interactuar -electrostáticamente- con macromoléculas con carga negativa, desempeñando un papel esencial en la supervivencia y proliferación celular (Paz et al., 2011).

Uno de los primeros hallazgos fue que las poliaminas pueden estabilizar el ADN bicatenario ya que pueden interactuar con sus grupos fosfato, cargados negativamente. Además, las poliaminas son capaces de insertarse en los surcos mayor y menor del ADN y participar en interacciones multisitio dependiendo del contexto iónico, como las concentraciones o tipo de iones que se encuentran en el medio que rodea al ADN y a las poliaminas (Thomas & Thomas, 2001). Sin embargo, la regulación de la concentración celular de las poliaminas y de su actividad es crucial, estando controlada por una compleja red de rutas metabólicas. Se ha demostrado que cambios en sus concentraciones y anomalías en su metabolismo, pueden ocasionar daños en el ADN, lo cual está íntimamente relacionado con la desregulación de oncogenes y la progresión del cáncer (Xuan et al., 2023).

Por todos estos motivos, la investigación del papel biológico de las poliaminas, ha sido objeto de gran interés en química biomédica. Como resultado de este trabajo continuado, se ha descubierto el papel que tienen algunas poliaminas, tanto biogénicas como sintéticas, en aspectos como actividad antiparasitaria, desarrollo de miméticos enzimáticos, agentes de transferencia genética y antitumorales. Algunos de estos compuestos se encuentran ya en fases avanzadas de pruebas clínicas (Woster & Casero, 2012).

1.3. ADN G-cuádruplex (ADN G4)

Los G-quadruplex son estructuras de orden superior que se forman en regiones del ADN o ARN ricas en guanina que tienen una gran importancia en química médica, ya que su formación inhibe que el complejo de telomerasa mantenga la longitud de los telómeros en las células cancerosas. Este tipo estructural ya se conocía con anterioridad al descubrimiento de la doble hélice, ya que el ácido guanílico se organiza formando geles (Bryan & Baumann, 2011). Por lo que, gracias a sus propiedades únicas y a su papel en diversos procesos biológicos, estas estructuras se convierten en posibles dianas para tratamientos médicos (Neidle, 2009).

1.3.1. Configuración estructural

El ADN G4 se forma al apilarse dos o más tétradas de guanina. Estas tétradas se forman cuando cuatro moléculas de guanina se unen en una configuración cuadrada plana, y se caracterizan por estar conectadas por un tipo especial de enlace de hidrógeno, llamado Hoogsteen, como se muestra en la Figura 1.1. Por lo que, estas tétradas se apilan unas sobre otras a través de interacciones π - π , creando lo que se conoce como estructura G-cuádruplex. Asimismo, la estructura se estabiliza aún más por la presencia de cationes como el potasio (K^+) o el sodio (Na^+) en su canal central, originando interacciones electrostáticas con el oxígeno del grupo carbonilo de las guaninas (Burge et al., 2006).

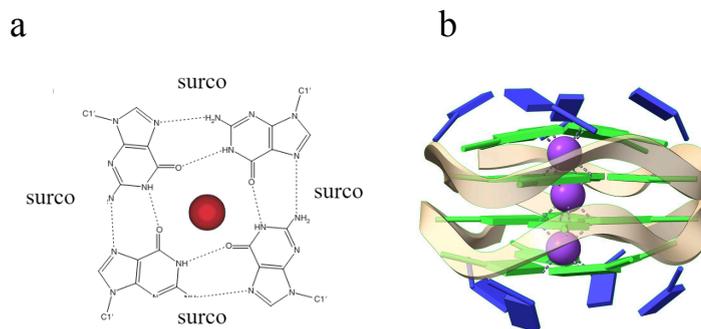


Figura 1.1. (a) Distribución de las bases de guanina en la tétrada G, junto con un ion metálico situado en el centro. Adaptado de Burge et al., (2006). (b) Vista superior de una estructura cuádruple compuesta por tétradas G, con dG (en verde), dT (en azul) y con el canal central de iones K^+ (en morado).

Se pueden formar distintas estructuras G4 en función de los cationes monovalentes que interactúan con ella. Las estructuras que incluyen K^+ son las más relevantes biológicamente, ya que hay una mayor cantidad de este ión dentro de las células (140 mM), a diferencia del Na^+ , cuya concentración intracelular se encuentra en torno a 5-15 mM. Asimismo, la posición de los distintos cationes en las tétradas varía, ya que el Na^+ al ser más pequeño, puede ubicarse en una posición intermedia (entre dos tétradas) o alineado con las bases de guanina, siendo ésta última la más común. En cambio, el K^+ se localiza siempre a la misma distancia entre las tétradas interactuando de esta forma con ocho grupos carbonilo (Bhattacharyya et al., 2016).

A su vez, los G-cuádruplex pueden ser intramoleculares o intermoleculares, en función de si están formados por una o más cadenas; y según su direccionalidad, puede ser paralelos (todas las hebras en la misma dirección), antiparalelos (dos hebras en paralelo y otras dos en dirección opuesta) o híbridos (tres hebras en la misma dirección). Además, las estructuras del G4 no se caracterizan

únicamente por su secuencia nucleotídica, sino que también están influenciadas por elementos externos como los cationes, la temperatura y otras biomoléculas (Haeusler et al., 2014).

Dado que los cuádruplex son estructuras tridimensionales complejas y presentan una diversidad que permite su exploración mediante métodos de diseño estructural, se han considerado como dianas potenciales para el desarrollo de fármacos (Neidle, 2009). De hecho, recientemente la Food&Drug Agency (FDA) acaba de aprobar el primer inhibidor de la telomerasa.

Este fármaco, basado en oligonucleótidos, está dirigido a adultos con síndromes mielodisplásicos (MDS) de riesgo bajo a intermedio con anemia dependiente de transfusiones que no responden a los agentes estimulantes de la eritropoyesis (AEE) (Mullard, 2024). Este avance, no solo abre una nueva vía terapéutica para los síndromes mielodisplásicos, sino que también propulsa futuras investigaciones para diseñar fármacos focalizados en esta enzima.

1.3.2. Papel biológico

G4s en la replicación del ADN

Los G4s actúan de manera dual en la replicación del ADN: por un lado, facilitan la unión de proteínas iniciadoras, y por otro, restringen a las polimerasas. En el genoma, muchos de los orígenes de la replicación se producen en áreas con alta concentración de guaninas, capaces de formar estructuras G4 (Prioleau, 2017). Estas regiones, conocidas como Elementos Repetidos de Origen ricos en Guanina (OGRE), están cerca de los sitios de inicio de replicación y su eliminación disminuye la replicación en células de ratón. Sin embargo, la estabilización de los G4s puede crear nuevos puntos de inicio (Prorok et al., 2019). Se cree que los G4s reclutan los factores de iniciación, como las proteínas RIF1 (proteína reguladora del tiempo de replicación) y MTBP (proteína implicada en el origen de la replicación). Durante la replicación, la enzima helicasa separa las hebras de ADN, permitiendo la formación de estructuras G-cuádruplex en la hebra retardada, las cuales se desenrollan para avanzar y completar la replicación del ADN (Teng et al., 2021). Además, se ha identificado que la ausencia de las helicasas específicas en desenrollar los G4s, como FANCD1 (Bosch et al., 2014), BLM (Drosopoulos et al., 2015), WRN (Aggarwal et al., 2011), PIF1 (Kocak et al., 2019) y DDX11 (Van Schie et al., 2020), es la causa del bloqueo de la replicación.

G4s en la transcripción del ADN

Debido a la evidencia directa de la presencia de los G4s en zonas promotoras de genes, especialmente en oncogenes como c-MYC, BCL2, KRAS y c-KIT (Huppert & Balasubramanian, 2007), se cree que éstas estructuras pueden influir en la transcripción, al aliviar o incrementar la tensión que se origina durante la apertura del ADN (Sun & Hurley, 2009). El efecto de los G-cuádruplex en este proceso varía según la orientación de la hebra molde o complementaria, así como de su posición respecto al inicio de la transcripción. En la hebra molde, los G4s pueden obstruir la transcripción, mientras que, en la complementaria, pueden favorecerla, estabilizando ciertas estructuras híbridas como consecuencia de la apertura del ADN. Sin embargo, una exacerbada estabilización de estas estructuras híbridas, puede generar roturas en el ADN y aumentar la inestabilidad genómica (De Magis et al., 2018).

G4s y los telómeros

Los telómeros son secuencias de ADN no codificante situadas en los extremos cromosómicos, esenciales para la estabilidad genética, ya que tienen como función mantener la integridad de los cromosomas y proteger sus extremos contra la degradación enzimática (Blackburn, 1991).

Fue Hermann Muller quién primero identificó el ADN telomérico (Boukamp & Mirancea, 2006), el cual está compuesto por repeticiones de nucleótidos ricos en guanina d(TTAGGG)_n y adopta una estructura de dúplex que termina en forma de cadena simple en el extremo 3' (O'Sullivan & Karlseder, 2010), vulnerable al daño por las enzimas exonucleasas (Zakian, 2012). Para prevenir este ataque, el extremo 3' forma un bucle, denominado "bucle-T" y se une a proteínas como TRF1, TRF2, TPP1, TIN2, POT1 y RAP1, conformando un complejo proteico denominado telosoma, que preserva la estabilidad de los telómeros (De Lange, 2004).

Sin embargo, con cada división celular, los telómeros se acortan debido a la incapacidad de la ADN polimerasa para replicar completamente el extremo 5' de la hebra rezagada, lo que resulta en un fragmento monocatenario 3' en la hebra original de los telómeros (Huffman et al., 2000). Este acortamiento progresivo puede llevar a la célula a un estado de senescencia o apoptosis si los telómeros se vuelven demasiado cortos para formar los bucles-T (Counter et al., 1992).

Además, la longitud de los telómeros también sirve como biomarcador de envejecimiento y se ha vinculado con enfermedades como el cáncer (Cleal et al., 2018), afecciones cardiovasculares (Fyhrquist et al., 2013) y neurodegenerativas como el Alzheimer (Panossian, 2003). Asimismo, estilos de vida nocivos pueden acelerar el acortamiento telomérico, aumentando el riesgo de estas enfermedades (Blackburn et al., 2015). Por ello, hay un creciente interés en diseñar estrategias para preservar la longitud de los telómeros, y empresas como Lifelength (LifeLength, 2010), o Teloyears (Teloyears, 2010) ofrecen servicios para medir su longitud y estimar la edad biológica. Sin embargo, el acortamiento de los telómeros sí que tiene solución natural, mediado por una riboproteína denominada telomerasa. Ésta añade secuencias de ADN al final de los telómeros, utilizando un molde de ARN, manteniendo su longitud adecuada (Bianchi & Shore, 2008). Además, la actividad de la telomerasa varía según el tipo celular; es significativa en las células embrionarias y tejidos renovables, pero es limitada en células somáticas (Greider, 2016). Curiosamente, la telomerasa está sobreexpresada en células tumorales, lo que contribuye a un crecimiento descontrolado de los tumores. Esto convierte a la telomerasa en una potencial diana para terapias contra el cáncer, redirigiendo el diseño de fármacos a esta enzima. Un ejemplo de esto es el inhibidor de telomerasa aprobado por la FDA para tratar el síndrome mielodisplásico (Mullard, 2024).

1.3.3. G4 como dianas terapéuticas

En la actualidad, la investigación se enfoca en la creación de moléculas con capacidad de unirse específicamente a las estructuras G4s del ADN, en busca de una mayor selectividad y afinidad. Sin embargo, para poder diseñar buenos ligandos de G4s es crucial comprender las dinámicas de estas interacciones.

Las fuerzas no covalentes son fundamentales para el reconocimiento de las estructuras G4s, lo que hace que este tipo de interacciones se sitúen claramente en el ámbito de la química supramolecular introducida previamente en el apartado 1.1.2. Un complejo supramolecular se forma cuando dos o más componentes se unen sin la necesidad de formar enlaces covalentes (Alassia, 2024). Para clarificar este concepto, Paul Ehrlich nombró al componente más grande como el "receptor" y al

resto como “sustratos” (Maehle, 2009). Cuando la interacción entre receptor y sustrato es selectiva, se habla de reconocimiento molecular. Sin embargo, Daniel Koshland demostró que la enzima y el sustrato interactúan de manera dinámica, lo que significa que la enzima puede cambiar ligeramente su conformación para acomodar el sustrato y llevar a cabo la reacción química (Koshland, 1958). Por lo que, el reconocimiento molecular está influenciado por interacciones supramoleculares, que son fundamentales para procesos biológicos como la replicación y expresión del ADN.

En la Tabla 1.1, se recopilan las principales interacciones supramoleculares con su energía de disociación en comparación con el enlace covalente. Se puede observar que las interacciones supramoleculares son, en general, menos fuertes que el enlace covalente, pero el sumatorio de todas estas fuerzas garantiza que el reconocimiento entre receptor y sustrato sea específico (Gale & Steed, 2012).

Tabla 1.1. Estimación de energía de disociación para diferentes tipos de interacciones supramoleculares en relación con el enlace covalente.

Tipo de interacción	Energía de disociación (kJ/mol)
Enlace covalente	400-100
Ión-dipolo	200-50
Enlace de hidrógeno	120-4
Catión- π	80-5
Enlace de halógeno	50-10
Anión- π	50-5
Dipolo-dipolo	50-5
Apilamiento π - π	50-2
Van der Waals	<5

1.4. LIGANDOS-G4

Recientemente, se ha identificado una nueva estrategia para la lucha contra el cáncer: el uso de ligandos que interactúen selectivamente con las estructuras G4s. Debido a que la telomerasa se expresa altamente en muchos tipos de células tumorales, los G4s teloméricos se han considerado como una diana terapéutica potencial, ya que aquellos ligandos que se unen y estabilizan el G4, podría inhibir la telomerasa, impidiendo así la proliferación de las células tumorales (Oh et al., 2020).

Los extremos de los telómeros humanos, que comprenden de unos 100 a 200 nucleótidos, suelen ser de cadena simple, por lo que, en principio, el ADN telomérico podría plegarse fácilmente en estructuras cuádruplex de ADN de manera intramolecular. Se cree que una molécula de ligando puede inducir a que el ADN telomérico monocatenario se pliegue en una estructura cuádruplex. Dicha estructura es conocida por interferir con la acción de la telomerasa. Por lo que, la formación de un complejo cuádruplex-ligando en los telómeros actúa de manera similar a como lo haría el ADN dañado, desencadenando una respuesta celular al daño del ADN, que resulta letal para las células cancerosas que dependen de la telomerasa para su supervivencia (Neidle, 2009).

1.4.1. Poliaminas tripodales

Como se ha comentado previamente, las poliaminas, que son pequeñas moléculas catiónicas que contienen dos o más grupos amino en su estructura, desempeñan un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las células eucariotas. Su estructura flexible y carga positiva les permite interactuar con una variedad de receptores aniónicos a nivel celular, como el ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos. Esta capacidad de unión explica por qué las poliaminas libres se mantienen a una concentración baja en el entorno fisiológico (Medina et al., 2005), dejando huella del importante rol que desempeñan en diversos procesos biológicos, como la compactación y duplicación del ADN, la modulación de la expresión génica, y la preservación de la dinámica y estabilidad molecular de las membranas celulares (Miller-Fleming et al., 2015).

Estas moléculas pueden adoptar formas especializadas, que son ampliamente utilizadas en el ámbito de la química supramolecular y de coordinación, conocidas como poliaminas tripodales. Las poliaminas tripodales, que contienen un átomo de nitrógeno terciario y un grupo amino en cada brazo, son esenciales para el desarrollo de receptores de cationes metálicos y aniones. Su estructura coincide topológicamente con aniones de simetría similar, haciendo de la poliamina tris (2-aminoetil)amina (tren) una base ideal para la creación de sensores fluorescentes. En este contexto, un artículo de García España et al. informó sobre la preparación de dos quimiosensores BODIPY-tren Cu^{2+} , basados en esta poliamina, destacando su aplicación innovadora en la detección de metales (Verdejo et al., 2021).

Además de su importancia en química supramolecular, las poliaminas también destacan por sus cualidades únicas, que las hacen especialmente adecuadas para su uso en el sector biomédico. Estas propiedades, entre las que se incluyen su versatilidad sintética, su naturaleza básica y una absorción celular eficiente, las convierten en candidatas perfectas para el desarrollo de compuestos que interactúen de manera selectiva con una topología particular del ADN, como el G-cuádruplex.

1.4.2. Trifenilamina (TPA)

La trifenilamina es una unidad estructural, que se distingue por sus cualidades como dador de electrones y su aplicación en tecnologías luminiscentes, incluyendo el desarrollo de materiales fotoeléctricos y sensores fluorescentes (Bochman et al., 2012).

El TPA exhibe una conformación helicoidal no plana, debido a las repulsiones entre los hidrógenos de sus anillos aromáticos y la conjugación π (Pont et al., 2018). Esta movilidad se debe a la rotación de los anillos fenilo alrededor del grupo amino central (Mandal et al., 2012). Además, el TPA se caracteriza por ser un andamio estructural útil para la síntesis de derivados mono, bi o trifuncionalizados, por lo que es posible crear ligandos con un núcleo central con características luminiscentes, cuyas propiedades dependen de las cadenas laterales seleccionadas.

El interés por la estructura de TPA surge de la similitud de sus características estructurales con las de otros posibles ligandos G4. Esta disposición se mantiene bajo un control riguroso de dos fuerzas contrapuestas: la conjugación π -aromático en los anillos fenilo y la repulsión estérica de los átomos de hidrógeno situados en los anillos internos (Pont et al., 2018).

Gracias a numerosas investigaciones realizadas en estos últimos años por Pont et al., se ha demostrado que la combinación de ambas características moleculares (poliamina y TPA) en los ligandos G4 muestran una afinidad notable por el G4 con una selectividad moderada sobre el ADN

bicatenario. Por tanto, de entre todas las opciones que existen para diseñar ligandos-G4, hemos optado por elegir la trifenilamina (TPA) y una amina tripodal (tren) como los principales motivos estructurales. Como se muestra en la Figura 1.2, el TPA actúa como núcleo central de este complejo, mientras que el tren constituye la cadena lateral.

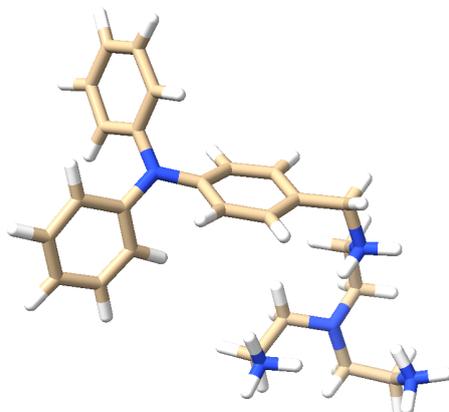


Figura 1.2. Conformación espacial del ligando sintetizado en su forma totalmente protonada, resultado, resultado de la combinación entre TPA (núcleo central) y tren (cadena lateral).

2. OBJETIVOS

Recientemente, el diseño de ligandos selectivos para G-cuádruplex ha generado un creciente interés por su rol en una gran variedad de procesos biológicos fundamentales, tales como la replicación, la expresión génica y la síntesis de proteínas, además de su influencia en la estabilidad genómica.

La existencia de secuencias con potencial de formar G4s en los extremos de los cromosomas y su relación con distintas patologías, como el cáncer, los ha posicionado como potenciales dianas terapéuticas debido a efectividad para bloquear la actividad de la telomerasa. Por tanto, el ADN G4 es un importante objetivo para los fármacos antitumorales. En consecuencia, la meta de esta investigación es el diseño, desarrollo y análisis de un ligando basado en la conjugación del TPA con una poliamina tripodal, orientados a interactuar con las estructuras G4.

Los objetivos propuestos para este trabajo final de grados se describen a continuación, organizados en objetivos generales (OG) y en objetivos específicos (OE).

OG.1. Diseño, síntesis y caracterización de una nueva molécula poliamínica con posibles aplicaciones biomédicas.

OE. 1.1. Se avanzará en las rutas sintéticas ya establecidas en el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, para la obtención de un nuevo ligando poliamínico derivado del TPA funcionalizado con la amina tripodal, tris(2-aminoetil)amina.

OE. 1.2. Estudio de interacción con el ADN para explorar la capacidad del compuesto para estabilizar de manera selectiva el ADN G4, para ello, se hará uso de ensayos *in vitro*, mediante desnaturalización térmica (FRET-melting) e *in silico*, mediante cálculos de dinámica molecular (DM).

OE. 1.3. Evaluación de citotoxicidad del ligando para probar su actividad biológica en una línea celular y determinar su eficacia como potencial agente antitumoral.

OG.2. Caracterización de las propiedades químicas y fotofísicas del compuesto sintetizado.

OE. 2.1. Evaluación del comportamiento ácido-base mediante medidas potenciométricas. Debido a que las poliaminas poseen varios grupos susceptibles de ser protonados, se determinarán las constantes de equilibrio ácido-base y posteriormente se construirán los diagramas de distribución de especies, con el fin de determinar las especies predominantes y el grado de protonación en el intervalo de pH de estudio.

OE. 2.2. Determinación de las propiedades fotofísicas, como la transferencia de electrones fotoinducida (PET) mediante técnicas espectroscópicas.

OE. 2.3. Estudio del comportamiento molecular del ligando en solución mediante la combinación de técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS), técnicas espectroscópicas y RMN.

OE. 2.4. Estudio de la capacidad coordinante del ligando frente a diferentes metales de transición y postransición mediante espectroscopias de fluorescencia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Metodología general

3.1.1. Reactivos y disolventes para la Síntesis

Los reactivos tris(2-aminoetil)amina (tren) (4097-89-6) (Fisher Scientific, s. f.) al 97% de pureza, 4-(difenilamino)benzaldehído (monoaldehído de TPA) (4181-05-9) (Fisher Scientific, s. f.) al 98% de pureza y el borohidruro de sodio (NaBH_4) (356531-67-4) (Fisher Scientific, s. f.) también al 97% de pureza así como el sulfato de sodio (Na_2SO_4) (7757-82-6) (Fisher Scientific, s. f.) fueron adquiridos comercialmente de Sigma Aldrich y Acros Organics. Por otro lado, los disolventes empleados (etanol, metanol, diclorometano, acetona, diclorometano, dietil éter), provenían de las casas comerciales Fisher Scientific, VWR Chemicals y Scharlau Chemie, con una pureza mínima de un 99,8 %. El agua utilizada fue ultrapura Milli-Q y algunos de los disolventes fueron secados mediante tamices moleculares de deshidratación (4 Å).

3.1.2. Análisis elemental

Los análisis de los elementos carbono (C), hidrógeno (H) y nitrógeno (N) fueron realizados por el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Para ellos, se empleó el equipo FlashSmart de ThermoFischer, y los análisis se realizaron por duplicado, donde los valores finales corresponden con el promedio de las dos mediciones, para garantizar la precisión de los resultados.

3.1.3. Espectrometría de masas

Los análisis fueron realizados igualmente por el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia empleando un espectrofotómetro de masas TOF-MS de alta resolución mediante ionización por electrospray.

3.1.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Para el análisis de las muestras, se empleó como disolvente el agua deuterada (D₂O). El ensayo se llevó a cabo en el SCSIE de la Universidad de Valencia, utilizando el equipo Bruker Advance DPX300 a una frecuencia de 300 MHz. Se obtuvieron los espectros de ¹H y ¹³C (monodimensional), así como los espectros bidimensionales homonucleares COSY y heteronucleares HSQC.

3.1.5. Potenciometría

Fundamento teórico

Para definir las constantes de estabilidad que corresponden a un equilibrio químico en disolución, resulta esencial medir la concentración de al menos uno de los reactivos involucrados, como los iones hidrógeno (H⁺). Mediante técnicas potenciométricas, es posible registrar el potencial eléctrico (E) de la disolución, tras la adición de un valorante. Asimismo, aplicando la ecuación de Nernst, se puede determinar la concentración de protones. Finalmente, para determinar las constantes de equilibrio se pueden correlacionar los datos obtenidos con un modelo matemático adecuado basado en los balances de masas y de carga de las especies presentes en el equilibrio.

Un equilibrio ácido-base responde a la siguiente ecuación:



La constante de equilibrio termodinámico, K, se puede expresar como el coeficiente de actividades termodinámicas entre reactivos y productos, en términos del coeficiente de actividad (γ) y la concentración de especies en equilibrio (Pont Nicolòs, 2019):

$$K = \frac{[H^+L]}{[H^+][L]} \cdot \frac{\gamma_{H^+L}}{\gamma_{H^+} + \gamma_L} \text{ (Ecuación 2)}$$

Teniendo en cuenta que las condiciones de trabajo son a temperatura constante y medio acuoso con una alta concentración iónica, 0.15 M NaCl, en términos prácticos, los coeficientes de actividad son constantes, lo que conlleva a la siguiente expresión de la constante de equilibrio (Pont Nicolòs, 2019):

$$K = \frac{[LH^+]}{[H^+][L]} \text{ (Ecuación 3)}$$

Finalmente, la relación entre K y el potencial de la solución (E) viene dada por la ecuación de Nernst. El potencial de la solución depende de aquellas especies para las cuales el electrodo es sensible, que es [H⁺] (Gil Martínez, 2023).

$$E = E_o + \frac{RT}{nF} \cdot \ln[H^+] \text{ (Ecuación 4)}$$

Se mide potenciométricamente y de forma periódica (tres veces antes de realizar el experimento), mediante la valoración de soluciones de concentración conocida de un ácido con una base fuerte.

Por tanto, para determinar $[H^+]$ aplicando la ecuación de Nernst, es esencial estimar anteriormente el potencial estándar E° , el potencial de unión líquida (E_j) y el potencial de asimetría (E_{asim}) (Gil Martínez, 2023).

$$E^{o'} = E^\circ + E_j + E_{asim} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Sistema Potenciométrico

En el laboratorio en el que se ha realizado este TFG, del grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, se hicieron las medidas potenciométricas empleando un potenciómetro automático Metrohm 905, representado en la Figura 3.1. Este dispositivo consta de dos celdas: una para el análisis y otra que sirve como referencia. Ambas están unidas por un puente salino del tipo Wilhelm con una disolución de NaCl 0.5 M. En este caso, el electrodo de medida es de vidrio Metrohm y se introduce en la muestra para medir el potencial eléctrico. En cambio, el electrodo de referencia es de Ag/AgCl inmerso en KCl 3M Metrohm, lo que asegura una referencia estable. Se emplea también una bureta automática Metrohm 800 Dosino para agregar con precisión el valorante y un agitador magnético Metrohm 801 Stirrer para mantener la solución homogénea. Todo este proceso está controlado por un sistema informático, con un ordenador Intel Core i3-201 y el software Metrohm Tiamo 2.3. Las condiciones experimentales incluyen temperatura de 298.1 K, atmósfera de argón para evitar reacciones no deseadas y una fuerza iónica de NaCl 0.15 M. Las medidas se hacen con agitación ininterrumpida.

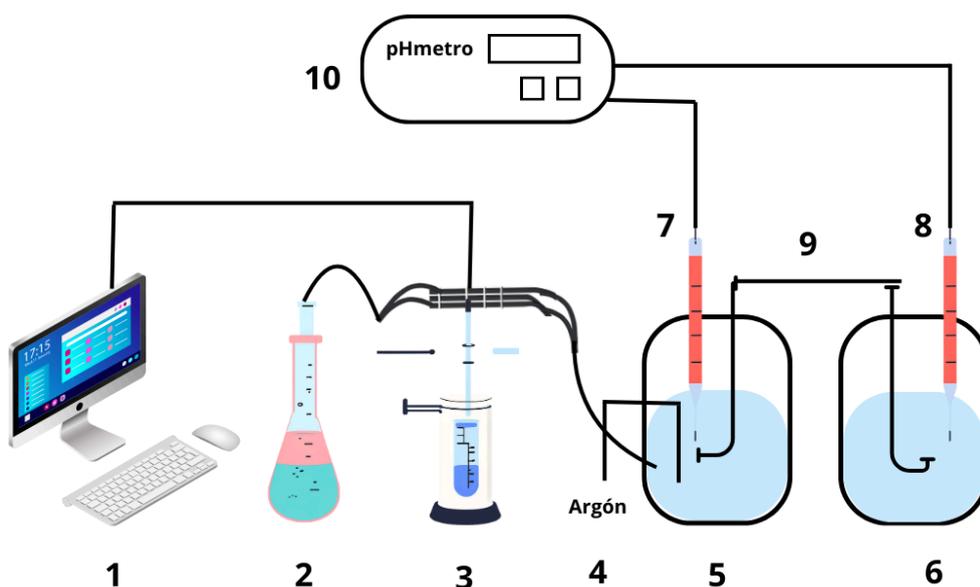


Figura 3.1: Esquema de potenciómetro. 1: Sistema Informático, 2: NaOH 0.1M, 3: Bureta automática, 4: Entrada argón 5: Celda de medida, 6: Celda de referencia, 7: Electrodo de medida, 8: Electrodo de referencia, 9: Puente salino Wilhelm, 10: pH-metro

Procedimiento y Análisis de datos

El procedimiento se inicia con la calibración de los electrodos para obtener el potencial estándar, mediante el método de Gran (Rossotti & Rossotti, 1965). De esta forma nos aseguramos poder

obtener mejores resultados ya que este se basa en múltiples adiciones estándar (Budetić et al., 2022).

Este proceso se lleva a cabo mediante la titulación de un ácido fuerte (0,1M de HCl) con una base fuerte (0.1 M de NaOH). Asimismo, el programa está capacitado para poder calcular otros parámetros, como el producto iónico del agua (pK_w), la concentración precisa del valorante y su nivel de carbonatación, que no debe sobrepasar el 1%. Para imitar las condiciones fisiológicas lo mejor posible, se emplea NaCl 0.15 M como fuerza iónica.

Una vez calibrados los electrodos, se disuelve el ligando en la fuerza iónica escogida, y se titula con el valorante, de concentración conocida.

El conjunto de datos se analiza con el programa HYPERQUAD (Gans et al., 1996) y una vez establecido el modelo de equilibrio inicial, el software aplica un algoritmo iterativo para ajustar los datos que hemos obtenido al modelo propuesto, permitiendo así determinar las constantes de equilibrio. Posteriormente, se ilustra el diagrama de distribución de especies en función del pH utilizando el programa HySS. Es importante mencionar que se llevaron a cabo dos valoraciones en NaCl 0.15 M del ligando, para asegurar la reproducibilidad de los datos y la precisión del modelo.

3.1.6. Espectroscopia UV-Vis y fluorescencia

En el laboratorio de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, se utilizaron los espectrofotómetros de UV-Vis Agilent 8453 y Agilent Cary 100 para el registro de los espectros de UV-Vis, y para el registro de los espectros de emisión de fluorescencia se utilizó el sistema de fluorescencia modular PTI. Para asegurar la estabilidad térmica, las mediciones se efectuaron bajo condiciones de temperatura regulada, en disoluciones mantenidas a 298 K, utilizando cubetas de cuarzo de 1 mL con una longitud de camino óptico de 1 cm.

Procedimiento experimental

A partir de una disolución madre 1 mM del ligando, se prepararon 10 mL de disolución de concentración 40 μ M, dispensando 9,6 mL de NaCl 0,15 M y 400 μ L de TPA-tren 1mM. Para realizar un barrido de pHs, desde ácido hasta básicos, se utilizó un pHmetro Metrohm 713, ajustando el pH con disoluciones de HCl y de NaOH concentradas y diluidas, según fuese necesario, con la finalidad de ir variando el pH. De esta manera, se procedió a registrar los espectros de absorción y emisión de fluorescencia en intervalos de 0.2-0.3 unidades de pH, con tiempos de incubación de media hora entre cada medida.

Aunque los análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) indicaban que el compuesto en estudio presentaba una estabilidad inicial adecuada. Sin embargo, para investigar más fondo la estabilidad del compuesto y llevar a cabo estudios de agregación, se registró la emisión de fluorescencia a 365 nm con el tiempo utilizando dimetilformamida (DMF) y agua en diferentes proporciones.

3.1.7. Estudios de Interacción con metales de transición y metales postransición

Fundamento teórico

Los metales se han caracterizado por desempeñar un papel esencial en el desarrollo de la química supramolecular. De hecho, la convergencia entre la química supramolecular y la química de coordinación surge debido a la percepción de que ambas disciplinas podían ofrecer una ayuda sinérgica en la comprensión de los procesos biológicos. En efecto, una de las estrategias alternativas para reforzar la unión a los ácidos nucleicos incluye la conjugación de complejos metálicos con poliaminas.

Las poliaminas, gracias a sus múltiples grupos amino, tienen una alta capacidad coordinante con metales de transición como Cu^{2+} y de postransición como el Zn^{2+} . Esta capacidad es fundamental en la química de coordinación, ya que permite la formación de complejos estables con estos iones metálicos. A su vez, la coordinación de estos iones con las poliaminas no solo mejora la estabilidad de estos complejos, sino que también influye en sus propiedades electrónicas y estructurales. Recientemente, se ha demostrado que la coordinación de Zn^{2+} y Cu^{2+} con azamacrociclos tipo escorpión provocan conformaciones cerradas que aumentan la viabilidad celular en líneas de cáncer de vejiga humana.

Asimismo, en el ámbito de la química supramolecular, los complejos metálicos planos pueden ser interesantes moléculas para interactuar con los G-cuádruplex. Por un lado, las propiedades de extracción de electrones de los centros metálicos reducen la densidad de electrones en los sistemas aromáticos coordinados, generando sistemas π pobres en electrones que se espera que se apilen eficientemente con las tétradas de guanina. Además, los iones metálicos pueden situarse en el centro de estos cuartetos, desempeñando el papel de los iones alcalinos que estabilizan la estructura cuádruplex. Por lo que la funcionalización de complejos metálicos con cadenas laterales que lleven cargas positivas adicionales puede ser una estrategia efectiva para mejorar la interacción con la columna vertebral negativa en los bucles o surcos del cuádruplex (Bazzicalupi et al., 2014).

Disolución tampón, reactivos y disolvente

Para fijar el pH de las muestras, se empleó un tampón de HEPES 50 mM a pH 7.4. El uso de un tampón es de vital importancia, ya que la formación del complejo debido a la interacción con el metal, desplaza los protones, acidificándose la solución resultante. Por ello, el uso del tampón asegura que el pH se mantenga constante a lo largo de la valoración. Como disolvente para preparar la disolución madre del ligando se utilizó el DMSO, que es un disolvente orgánico soluble en agua que permite mantener estable la disolución, ya que en agua pura, este compuesto tiende a agregarse. Como reactivos se emplearon el ligando y cuatro metales, concretamente Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Ni^{2+} .

Procedimiento experimental

Se preparó una disolución madre de 1 mM de TPA-tren (3.7 mg) en DMSO (6.7 mL). Para la preparación de las 5 muestras, correspondientes al ligando y los cuatro metales utilizados, se preparó 1 mL de disolución 30 μM para cada una de ellas. Para ello, primero se dispuso 1 mL de tampón HEPES en cada eppendorf. A continuación, para las disoluciones de los respectivos

metales, se retiraron 60 μL del tampón y se añadieron 30 μL de la disolución madre del ligando y 30 μL de una disolución 1 mM de cada metal (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Ni^{2+}) a su correspondiente eppendorf. En cambio, para la preparación de la disolución del ligando, únicamente se retiraron 30 μL de la disolución tampón y se completó con la disolución madre del ligando (30 μL) hasta alcanzar un volumen final de 1 mL.

3.1.8. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Para las mediciones de DLS se ha llevado a cabo un procedimiento estándar en el modo de retrodispersión (con un ángulo de 173 grados) con Malvern Zetasizer Ultra, y con el láser a 633 nm. Se realizaron 3 repeticiones para la medición del tamaño hidrodinámico, obteniendo finalmente el tamaño hidrodinámico promedio de los agregados en medio acuoso. Asimismo, se empleó una celda estándar DTS0070 en las mediciones del tamaño para asegurar la validez y la calidad de los resultados.

Procedimiento experimental

A partir de una solución madre del compuesto en DMF 1 mM, se realizó una dilución con agua hasta llegar a una concentración lo suficientemente baja de 10 μM . Posteriormente, para asegurar de que la muestra obtenida no absorbe ni emite fluorescencia a la longitud de onda a la que opera el DLS (633 nm), se mide la absorbancia a esta longitud de onda mediante espectroscopia UV-Vis y se introduce el valor en el software del DLS. Para las medidas de tamaño, sólo se necesita la absorción de la solución a 633 nm y el índice de refracción (RI) del material. En este caso, la absorción medida a esa longitud de onda fue de 0.05 y el índice de refracción se determinó como 1.35. Además, la medición se realizó a 25 grados con un tiempo de incubación de 120 segundos, con el objetivo de asegurarnos de que no hay gradientes térmicos dentro de la muestra que puedan actuar como zonas de refracción de la luz y perturbar la medición. (Malvern Instruments Ltd., 2003).

3.1.9. Dinámica molecular

Los métodos computacionales son necesarios para adquirir más información sobre el modo de unión entre las moléculas, así como el modo de interacción entre el compuesto sintetizado y los G4s. Por lo que se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular utilizando el paquete de programas Amber 2019 (Case et al., 2019) y los campos de fuerza GAFF y OL21, para la molécula orgánica y el ADN respectivamente. Las simulaciones se realizaron a 300 K con solvente explícito (modelo de agua TIP3P, en caja de 10-20 Å). El proceso comprendió varias etapas: una minimización, una etapa de calentamiento, hasta alcanzar una temperatura final de 300 K, una etapa de equilibrado y, finalmente, una simulación de 5 ns para permitir una conveniente exploración del espacio conformacional. En estos estudios no se utilizó ningún tipo de restricción.

3.1.10. Ensayo de fusión por desnaturalización térmica FRET

Fundamento teórico

La estructura que presentan los cuádruplex permite su estudio por ensayos analíticos y bioanalíticos basados en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). El ensayo de

desnaturalización térmica FRET ha sido reconocido como una herramienta muy eficaz (Juskowiak, 2006). La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) constituye una metodología espectroscópica que proporciona datos sobre la proximidad entre macromoléculas en disolución, resultando especialmente útil para el estudio de las alteraciones estructurales en proteínas y ácidos nucleicos. Esta técnica ofrece capacidades únicas para investigar la estabilidad y la reorganización estructural del ADN cuádruplex, así como explorar los mecanismos de sus interacciones con otras entidades moleculares o iones. (Juskowiak, 2006)

La transición estructural de una molécula de ADN monocatenaria y flexible hacia una estructura G-cuádruplex compacta, incrementa la cercanía entre los extremos 5' y 3' de la molécula. Por ende, marcar ambos extremos de una cadena de ADN con fluoróforos donantes y aceptores facilita el seguimiento de esta proximidad mediante los cambios en la eficiencia de FRET. (Juskowiak, 2006).

En un ensayo estándar de FRET, mostrado en la Figura 3.2, el oligonucleótido de interés se marca por ambos extremos con dos fluoróforos distintos, un dador y un aceptor. Los fluoróforos, que generalmente se emplean como “pares FRET”, son 6-carboxifluoresceína (FAM), como dador, y 5-tetrametilrodamina (TAMRA), como aceptor. Estos se caracterizan por encontrarse próximos en el espacio cuando el ADN adopta su conformación plegada, permitiendo que el dador pueda transferir su energía de excitación al aceptor. Sin embargo, cuando el ADN se encuentra desnaturalizado, como consecuencia de un aumento de la temperatura, la distancia entre el dador y el aceptor se amplía, por lo que al no encontrarse en la distancia óptima para transferir la energía al aceptor, el dador es capaz de restablecer su fluorescencia. Gracias a este fenómeno, podemos determinar la energía de emisión de nuestro dador y por consiguiente, la estimación de la temperatura de fusión del ADN (T_m), que es la temperatura a la cual el 50% del ADN se encuentra desnaturalizado.



Figura 3.2. Representación del principio del ensayo por desnaturalización térmica. Adaptado de Gil Martínez (2023).

Por lo tanto, este análisis permite verificar si el ligando interactúa y estabiliza diferentes estructuras de ADN. Si es así, se debería ver un desplazamiento de la curva hacia mayores temperaturas. Esta diferencia de temperaturas de desnaturalización, o $\Delta T_{m,s}$, entre el G4 y el G4-L, refleja la estabilización causada por el ligando, ya que si éste estabiliza el G4, será más difícil desnaturalizarlo. Por tanto, un mayor ΔT_m se corresponde con una mayor estabilización, como se observa en la Figura 3.3.

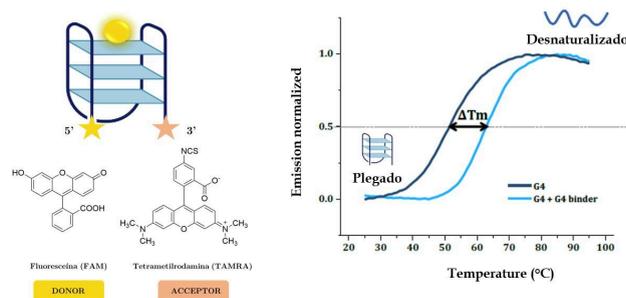


Figura 3.3. Gráfica de ΔT_m debido al efecto FRET. Adaptado de Gil Martínez (2023).

Secuencias investigadas de ADN

Para estudiar la interacción del compuesto se han empleado una serie de distintas secuencias y topologías de ADN, tanto ADN dúplex como distintas conformaciones del ADN cuádruplex, detalladas en la Tabla 3.1 con su nombre, secuencia, topología y coeficiente de extinción molar (ϵ). Emplear un modelo de doble hebra en estos ensayos es clave, ya que éste prevalece entre el resto de material genético y por ello, es un competidor inherente de los quelantes de G4 en medios fisiológicos. Por lo que realizar este tipo de estudios nos brinda una manera de evaluar la selectividad del compuesto.

Asimismo, hay que mencionar que los oligonucleótidos utilizados se encuentran doblemente marcados. Se obtuvieron de IDT DNA Technologies como sólidos liofilizados, y para su empleo, se disolvieron en tampón que contenía KCl (10 mM), LiCl (10 mM), 10 mM LiCac (10 mM).

Tabla 3.1. Secuencias ADN empleadas en los ensayos.

Nombre	Secuencia	Topología	ϵ (L x mol ⁻¹ x cm ⁻¹)
ds26	CAA-TCG-GAT-CGA-ATT-CGA-TCC-GAT-TG	Dúplex	191400
c-myc	TGA-GGG-TGG-GTA-GGG-TGG-GTA-A	Paralelo	266900
TBA	GGT-TGG-TGT-GGT-TGG	Antiparalelo	125600
22CTA	AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-G	Antiparalelo	234100
24TTG	TTG-GGT-TAG-GGT-TAG-GGT-TAG-GGA	Híbrido	256100
26TTA	TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TT	Híbrido	248300

Procedimiento experimental

El diseño experimental de este ensayo consiste en el uso de una placa de 96 pocillos en el que se dispensa el ligando a evaluar, TPA-tren, y 6 secuencias distintas de ADNs, para ver cómo interacciona con cada uno de ellos.

Los experimentos se realizaron con una máquina RTqPCR, donde la temperatura inicial en la placa del pocillo era 25°C y se iba aumentando de forma creciente a una velocidad de 0,5°C/min hasta alcanzar los 95°C.

En la Figura 3.4 se citan las secuencias de ADN utilizadas para este ensayo, que corresponden con ds26 (dúplex), c-myc (paralelo), TBA (antiparalelo), 22CTA (antiparalelo), 24TTG (Híbrido 1), y

26TTA (Híbrido 2). Asimismo, se emplea un tampón compuesto por 10 mM de KCl, 90 mM de LiCl y 10 mM de LiCac a pH fisiológico.

Ligando	TPA-tren					
ADN	ds26	c-myc	TBA	22CTA	24TTG	26TTA

Figura 3.4. Ilustración del ligando y secuencias de ADN empleadas.

Al disponer de un ligando y 6 ADN, la placa se organiza en 6 cuadrantes, de forma que se tenga 15 pocillos para cada ADN, con sus respectivos controles; y por cada tipo de ADN, se utilizan 5 concentraciones diferentes de ligando, donde C1, C2, C3, C4 y C5 corresponden a las concentraciones de 0.2 μ M 0.4 μ M, 1.0 μ M, 2.0 μ M y 4.0 μ M respectivamente.

Para tener una visión más clara, el diseño de la placa se ilustra en la Figura 3.5 de la siguiente forma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1		CTRL			CTRL			CTRL			CTRL
B	C2											
C	C3											
D	C4											
E	C5											
F					CTRL					CTRL	CTRL	CTRL
G											CTRL	CTRL
H											CTRL	CTRL

Figura 3.5. Representación gráfica de la distribución de la placa ELISA para llevar a cabo el ensayo por desnaturalización térmica.

Para la realización del ensayo, se prepararon las disoluciones de ADN doblemente marcados a una concentración de 0.4 μ M, diluyendo con 392 μ L de tampón las disoluciones stock de 20 μ M. Estas disoluciones se sometieron a un proceso de hibridación, calentándose a 95°C durante 10 minutos, y permitiendo que se enfriara gradualmente hasta alcanzar una temperatura en torno a los 25 °C. Paralelamente, se preparó una dilución madre de ligando 20 μ M, diluyendo en el tampón empleado una disolución stock 1 mM de ADN. A partir de esta disolución madre de ligando, de concentración 20 μ M, se prepararon las disoluciones de ligando a las concentraciones de 0,2 μ M 0,4 μ M, 1 μ M, 2 μ M y 4 μ M.

Por tanto, para la preparación de la placa, primeramente se deben adicionar 20 μ L de ADN 0.4 μ M en cada pocillo, seguidamente, se añade los 20 μ L de las disoluciones del ligando a las distintas concentraciones y por último, los 20 μ L de buffer en los pocillos que corresponden con la muestra control.

Finalmente, se registró la emisión del dador, se normalizó la emisión de fluorescencia y se registraron los datos con el programa OriginPro 2019.

3.1.11. Estudios biológicos

Una forma de comprobar el nivel de citotoxicidad de los ligando es mediante el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en la línea celular seleccionada.

Cultivo celular y mantenimiento

Los ensayos de viabilidad se realizaron en una cabina de bioseguridad con sistema de flujo laminar (TELSTAR BIO IIA). Asimismo, se empleó la línea celular cancerígena RAW 264.7 (macrófago de leucemia murina) (ATCC, s.f.). Esta línea celular se origina en tejido de ascitis, está compuesta por macrófago y están asociadas con la leucemia murina de Abelson. Las células fueron cultivadas en monocapa en un medio completo DMEM, que es un medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS) y un 1% de penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 mg/mL. Además, se aplicó tripsina comercial al 0,25% junto con EDTA 1mM para levantar eficientemente las células adherentes del cultivo, y PBS para el lavado celular y garantizar su isotonicidad. Los cultivos se incubaron a 37 °C en un ambiente al 5% de CO₂. Como es debido, todas las operaciones se efectuaron bajo una cabina de seguridad microbiológica con un sistema de flujo de aire laminar (TELSTAR BIO IIA). Se hizo un seguimiento de su crecimiento y proliferación mediante el uso de un microscopio óptico para el control de los contaminantes, condiciones de adherencia y morfología celular.

Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo MTT

Principio del Ensayo

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico descrito inicialmente por Mosmann (Shimoyama et al., 1989), que mide la actividad metabólica en células vivas. La prueba de reducción de tetrazolio MTT se caracteriza por evaluar de manera conjunta la viabilidad celular y la actividad metabólica. En este ensayo se emplea la sal de tetrazolio MTT de color amarillo, que es soluble en agua. En presencia de células metabólicamente activas, se reduce a cristales de formazán de color púrpura, insolubles en agua. Todo este proceso está mediado por la enzima succinato deshidrogenasa, que se encuentra en las mitocondrias activas. Sin embargo, algunas investigaciones recientes destacan la relevancia del NADPH en este proceso, derivado de la glucólisis citoplasmática y la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Los cristales de formazán, de forma acicular, se pueden disolver en disolventes o aceites orgánicos. La disolución resultante se mide para determinar la densidad óptica (OD) a un longitud de onda específica, que oscila entre los 500 y 600 nm, empleando un espectrofotómetro o lector de placas. La intensidad del color de formazán es proporcional al número de células viables y metabólicamente activas (Buranaamnuay, 2021). El proceso descrito se muestra en la Figura 3.6.

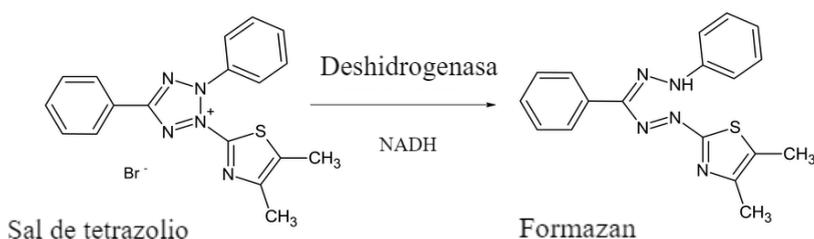


Figura 3.6. Gráfica de ΔT_m debido al efecto FRET. Adaptado de Twarużek et al., (2018)

Procedimiento experimental

Primeramente, se extraen las células del medio cuando llevan al menos 2 pases desde su congelación y se analiza de forma visual su confluencia y su aspecto morfológico. Para la siembra de células, se quiere una densidad de 1×10^5 cel/ml en placas de 96 pocillos, dispensando 100 μ L por pocillo, lo que equivaldría a 10.000 células por pocillo. Para ello, tras contar la suspensión de 10 mL, se calcula cuántas células se tienen y se prepara un stock a 1 millón de células/mL, añadiendo el volumen correspondiente de medio completo. A partir de este stock, se procede a preparar una suspensión a 1×10^5 cel/ml. Para ello, para cada placa, se mezclan 1 mL del stock de 1 millón de células /mL con 9 mL de medio completo y mediante el uso de una pipeta multicanal, se siembran 100 μ L por pocillo. Seguidamente, se aspira el medio y se trata con 100 μ L del control positivo o las muestras, tratando cada concentración por triplicado. Luego, se incuban las placas a 37° C en un ambiente humidificado al 5% de CO₂.

Para el ensayo de viabilidad celular con MTT, se prepara la dilución de trabajo de MTT (1:10) en medio completo, mezclando 1 mL de MTT 5 mg/mL con 9 de medio por placa, donde posteriormente, se retira el medio de la placa y se añaden los 100 μ L de la solución de trabajo de MTT a cada pocillo correspondiente. Se dejan incubar las placas durante 4 horas a 37 °C, y posterior a ello, se quitan 25 μ L de la solución de MTT e incorporan 50 μ L de DMSO, dejándolo reposar durante unos 10 minutos para así poder disolver los cristales de formazán. Tras ello, se mide la absorbancia de cada pocillo a 540 nm empleando un espectrofotómetro lector de placas (THERMO FORMA FISHER).

La absorbancia registrada de los pocillos se recopila en un archivo Excel. Los pocillos en los cuáles sólo se añadió medio constituyen al 100 % de la viabilidad celular.

El porcentaje de viabilidad celular de cada pocillo con concentraciones crecientes de ligando (100 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 1 μ M) se expresa como un porcentaje respecto a las células no tratadas con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = 100 \times \frac{\text{Abs } x - \text{Abs blanco}}{\text{Abs control} - \text{Abs blanco}}$$

El blanco corresponde a la absorbancia debido al ensayo, sin células.

Finalmente, para el cálculo del parámetro IC₅₀, el cual corresponde a la concentración de ligando necesaria para disminuir un 50% la viabilidad celular, se utiliza el programa Graphpad Prism V.6. utilizando un ajuste no lineal sobre log de la concentración vs la respuesta normalizada, que sería la absorbancia.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis

Nuestro estudio se centra en un compuesto derivado de la trifetilamina (TEA), combinado con una amina tripodal, denominada tren.

La trifetilamina, desde una perspectiva sintética, se puede considerar como un derivado del amoníaco, donde los hidrógenos son reemplazados por grupos arilo, resultando en una amina terciaria con baja capacidad para aceptar protones, es decir, con una naturaleza poco básica.

El TPA destaca por ser un andamio versátil para la síntesis de nuevos compuestos mediante funcionalización adicional, ya que es un compuesto asequible y de fácil disponibilidad en el mercado. Por otra parte, la tris(2-aminoetil)amina es un compuesto interesante ya que a su capacidad para formar complejos estables con metales de transición, gracias a su estructura tripodal, la hace útil en el campo de la química de coordinación (Blackman, 2005).

La combinación de un compuesto aromático y fluorescente, como el TPA, con un componente tripodal (tren), da como resultado un compuesto luminiscente con topología tripodal y una elevada capacidad coordinante.

El método sintético para unir la cadena poliamínica con la unidad de TPA se basa en una reacción de adición nucleofílica entre el tren y el monoaldehído de TPA (ma-TPA), siguiendo el mecanismo de reacción de Schiff. El mecanismo de esta reacción se muestra en la Figura 4.1. Después del ataque nucleofílico de la amina primaria al carbono carboxílico, tiene lugar una transferencia de protón que origina un aminoalcohol, la carbinolamina. Al protonarse el oxígeno de la carbinolamina, se transforma en un grupo saliente eficaz, que se elimina como agua, formando el ión iminio. Es la desprotonación del nitrógeno la que conduce a la formación de la base de Schiff definitiva. Cuando, en una segunda etapa, añadimos a esta reacción el NaBH_4 , éste reduce la imina a amina, obteniéndose el producto final. Esta amina, generalmente un aceite, se precipita como sal de clorhidrato para facilitar su manejo y aumentar su estabilidad (Qin et al., 2013).

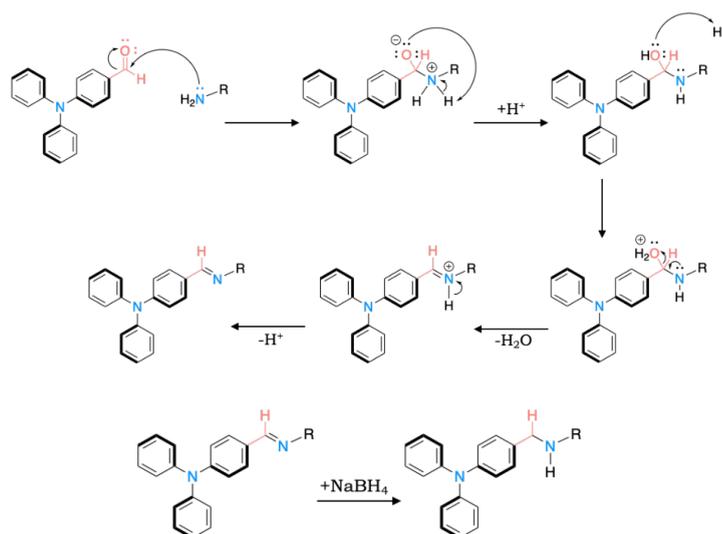


Figura 4.1. Procedimiento general para la síntesis de los compuestos derivados de TPA con su posterior reducción a amina. Adaptado de Gil Martínez (2023).

En base a este mecanismo, y aplicándolo a nuestro compuesto, el grupo aldehído se encuentra en la unidad de TPA en posición *para* al nitrógeno central, mientras que las aminas primarias se localizan en los extremos de la amina tripodal. La síntesis de TPA-tren se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa, se añadió gota a gota una disolución en etanol del ma-TPA a una disolución etanólica del tren. Se utilizó un exceso de tren, ya que se quería favorecer la síntesis del tren monosustituido, y no el di o trisustituido. Posteriormente, la mezcla se calentó y se dejó en agitación en ausencia de luz, generando la base de Schiff. En la segunda etapa, se añadió el NaBH_4 como agente reductor para reducir la imina formada en la etapa anterior.

En la Tabla 4.1, se detallan los valores experimentales de los reactivos empleados, donde se indica la masa que pesamos para cada uno de ellos, así como la estequiometría empleada, junto con los datos de masa molecular y moles correspondientes en función de lo pesado.

Tabla 4.1. Valores experimentales de los reactivos utilizados para la síntesis.

Valores experimentales				
Reactivo	m(mg)	Equivalentes	Mw (g/mol)	mmol
ma-TPA	510.0	1	273.33	1.87
Tren	900.0	3	126.23	6.15
NaBH ₄	562.33	8	37.83	14.92

Tras la reacción, se evaporó el etanol mediante un rotavapor y se obtuvo una mezcla de producto, exceso de tren y NaBH₄.

Para separar el producto de los reactivos de partida, se realizó una extracción ácido-base con diclorometano CH₂Cl₂ (fase orgánica) y agua (fase acuosa). El producto quedó en la fase orgánica, mientras que el exceso de tren y el NaBH₄ quedaron en la fase acuosa. Se realizó la extracción tres veces, y se secó la fase orgánica con Na₂SO₄. Finalmente, se evaporó el diclorometano mediante un rotavapor, y se obtuvo el producto sólido.

Para purificar el producto y obtener la sal, se disolvió la amina libre en diclorometano (CH₂Cl₂) y se precipitó con ácido clorhídrico (HCl) 4M en dioxano, obteniendo la sal de clorhidrato del producto.

4.1.1. Caracterización ligando

Nombre IUPAC:

N¹,N¹-bis(2-aminoethyl)-N²-(4-(diphenylamino)benzyl)ethane-1,2-diamine

Fórmula molecular (sal de clorhidrato):
C₂₅H₃₆Cl₄N₅

Peso molecular: 649,41 g/mol

Rendimiento: 86,11%

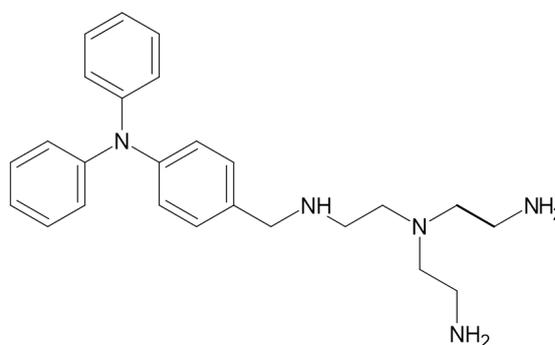


Figura 4.2. Esquema de TPA-tren.

¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δH 7.29 (m, 6H), 7.09 (m, 6H), 7.04 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 4.14 (s, 1H), 3.15 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.06 (m, 4H), 2.85 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.80 (m, 4H). ¹³C RMN (D₂O, 75.43 MHz): δC 149.1, 147.2, 131.1, 129.7, 124.9, 123.9, 123.5, 122.6, 50.8, 49.1, 48.6, 43.3, 36.4. Anal. Calc. para C₂₅H₃₃N₅·4HCl·1.5H₂O: C, 52.1; H, 7.0; N, 12.2. Exp.: C, 52.1; H, 6.7; N, 12.4. MS m/z (ESI) Calc.: 404.28. Exp.: 404.2801 ([M+H]⁺).

4.2. Comportamiento Ácido Base

Las interacciones supramoleculares, tales como las fuerzas electrostáticas, el apilamiento de los anillos aromáticos y los puentes de hidrógeno, son fundamentales para entender cómo se relacionan las moléculas pequeñas con el ADN. Aunque la estructura molecular es importante, las propiedades ácido-base de dichas moléculas también tienen un impacto significativo en la formación de estas interacciones. Hay que tener en cuenta que el ADN es una biomolécula aniónica y, por tanto, es relevante saber el estado de protonación de nuestras moléculas para poder identificar las posibles interacciones electrostáticas, y la capacidad que tenga de formar puentes de hidrógeno. Nuestro ligando posee grupos aminos, con capacidad de protonarse a distintos valores de pH. Por ello, se han empleado en este trabajo técnicas potenciométricas y espectrométricas para investigar y cuantificar sus propiedades ácido-base.

4.2.1. Potenciometría

Mediante esta técnica se pueden calcular las constantes de protonación de nuestro ligando, y a partir de estas, construir los diagramas de distribución de especies, los cuales son necesarios para analizar qué especies predominan en función del pH.

En el análisis realizado, se identificaron cuatro constantes de protonación sucesivas para la molécula estudiada. En base a la estructura del ligando, éste presenta tantos sitios potenciales para la protonación como grupos amino en su estructura, es decir, cinco. Sin embargo, la protonación asociada al grupo amino central del TPA no fue observada dentro del intervalo de pH estudiado (2.0-11.0), debido al bajo pK_a que presenta. Por lo tanto, para el compuesto TPA-tren se han determinado las constantes de protonación de los cuatro grupos amino del tren, donde el primer y segundo valor corresponde con las aminas primarias, el tercer valor con la amina secundaria, y el último valor corresponde a la amina terciaria. En la Tabla 4.2 se muestran los logaritmos de las constantes de protonación globales y sucesivas, así como la basicidad global, del ligando TPA-tren.

Tabla 4.2. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, del compuesto TPA-tren.

Reacción ^[a]	TPA-tren
$L + H \rightleftharpoons HL$	10.33
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	9.32
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	8.19
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	2.92
$\text{Log}\beta$ ^[b]	30.77

[a] Cargas omitidas. [b] La constante de basicidad acumulativas se calculó como $\log \beta = \sum \log K_{HjL}$.

Para el ligando, las constantes de protonación disminuyen a medida que aumenta su grado de protonación. Esto es causado por efectos estadísticos y de repulsiones electrostáticas entre los grupos amonio cargados positivamente, así como por las diferencias de basicidad en disolución acuosa entre las aminas primarias, secundarias y terciarias.

Las poliaminas, en agua, generan una competencia en sus reacciones de protonación. En un medio acuoso, la secuencia de basicidad varía significativamente, siendo el orden de basicidad $NH(CH_3)_2 \sim NH_2(CH_3) > N(CH_3)_3 > NH_3$. Las moléculas de agua, que se caracterizan por ser excelentes dadores y aceptores de enlaces de hidrógenos, solvatarán más eficientemente a los cationes de

amonio cargados positivamente en relación con las aminas neutras. Por tanto, la solvatación tiende a incrementar la basicidad de todas las aminas, y este aumento es más pronunciado en aquellas con un mayor número de hidrógenos no sustituidos, permitiendo así más enlaces de hidrógeno con el solvente (Bencini et al., 1999, Xu et al., 2014). Teniendo en cuenta que los efectos de solvatación en medio acuoso favorecen la protonación de las aminas menos sustituidas, y considerando la estructura del ligando y la distinta basicidad de cada tipo de amina, se espera que en la secuencia de protonación, las aminas primarias se protonen primero, seguidas por las aminas secundarias y finalmente, las aminas terciarias.

Como se muestra en el diagrama de distribución (Figura 4.3), a valores de pH inferiores a 3.0, la especie predominante es LH_4 ; a pH intermedio, entre pH 3.0 y 8.0 la especie LH_3 es mayoritaria; a partir de pH 8.0, LH_2 alcanza su máxima concentración, en torno a 8.9, mientras que LH predomina en un rango de pH cercano a 10.0. Por último, la especie no protonada es la que predomina a valores de pH por encima de 10.3.

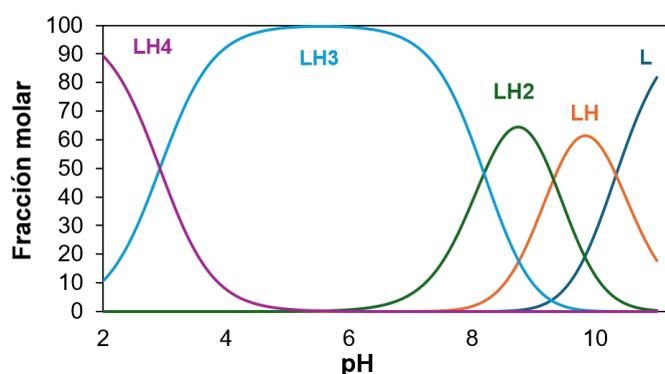


Figura 4.3. Diagrama de distribución del ligando elaborado a partir de las constantes de protonación calculadas. Las cargas se han omitido.

4.2.2. Fotofísica

Linealidad

Para decidir a qué concentraciones se podrán realizar los experimentos de UV-Vis, se debe determinar el intervalo de linealidad, es decir, obtener una recta de calibrado que nos permita verificar la relación de nuestra concentración con la absorbancia. Para ello, se realizó un ensayo de UV-Vis donde se midieron distintas soluciones con concentraciones desde $1 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$, obteniendo así un valor de absorbancia en el máximo del espectro (300 nm) para cada medida.

Observando el gráfico 4.4, se concluyó que la absorbancia era lineal en todo el rango de concentraciones, y a partir de la Ley de Lambert-Beer, podemos determinar el coeficiente de extinción molar. Sin embargo, como es necesario trabajar con valores de absorbancia inferiores a uno, se decidió que la concentración de $40 \mu\text{M}$ era adecuada para llevar a cabo los ensayos fotofísicos posteriores.

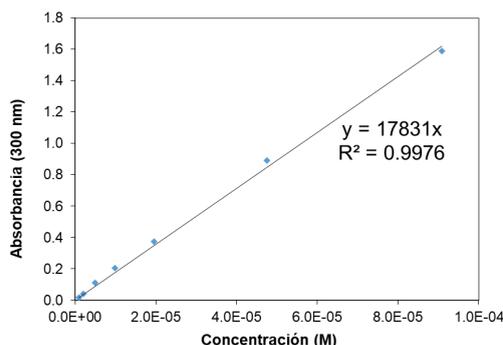


Figura 4.4. Recta de calibrado Absorbancia vs Concentración.

Estudios espectroscopía de emisión fluorescencia y UV-Vis

Dado que la protonación puede influir notablemente en el comportamiento fotofísico de una molécula, es importante determinar cómo varían los espectros de UV-Vis y de fluorescencia en función del pH. La combinación de estas dos técnicas, junto con las valoraciones potenciométricas, ofrece una perspectiva más amplia sobre las propiedades ácido-básicas del ligando en cuestión.

El espectro UV-Vis del ligando, mostrado en la Figura 4.5, presenta una banda entre 280 y 320 nm, con un máximo que, en función del pH, se encuentra entre 295 y 306 nm. Esta banda se asocia a la transición π - π del TPA (Aydemir et al., 2015). Según el artículo citado, la absorción del TPA varía al protonarse el grupo amonio, imposibilitando la conjugación electrónica con los anillos fenílicos, originando un espectro de absorción muy parecido al del benceno (Janic & Kakas, 1984). Sin embargo, en el espectro obtenido, la variación en la posición de la banda con el pH es mínima, lo cual evidencia que, en el intervalo de pH que hemos trabajado, no podemos ver la protonación del TPA. Sin embargo, sí se observa un aumento en la intensidad de absorción, de cerca del 22%, a medida que el pH se incrementa, lo que podría reflejar cambios en la estructura electrónica o estar relacionado con los procesos de agregación que potencian la absorción.

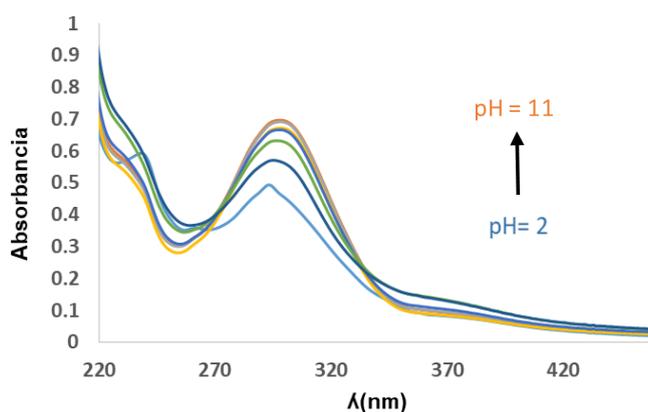


Figura 4.5. Espectro UV-Vis de TPA-tren en función del pH.

En cuanto a la fluorescencia, se determinó primero la longitud de onda de excitación con un barrido de 250 nm a 350 nm, adquiriendo de esta manera el espectro de excitación, representada en la Figura 4.6. Se distinguen dos picos que podrían corresponder con la forma libre y agregada del compuesto. Se selecciona la longitud de onda de excitación máxima, a 290 nm, para registrar el espectro de emisión de fluorescencia y examinar la emisión a distintos valores de pH.

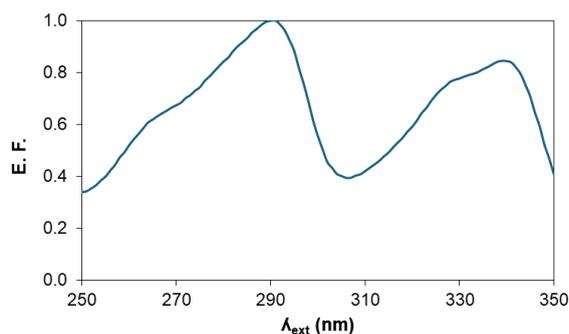


Figura 4.6. Espectro de excitación de TPA-tren.

A partir de esta longitud de onda de excitación, se obtuvo un espectro de emisión de fluorescencia con una banda centrada a 365 nm. Al pasar de pH 2.0 a 11.0, la molécula se desprotona y esto da lugar a un quenching de la fluorescencia cercano al 75%, como se observa en la Figura 4.7. El cambio más drástico se observa en la primera etapa de desprotonación, al pasar de pH 2.0 a 3.0, con un quenching del 60% de fluorescencia. Este efecto tan drástico no solo influye en las propiedades fotofísicas del compuesto, sino que afecta también a las fuerzas intramoleculares que gobiernan los procesos de agregación o interacción con otras moléculas. El fenómeno se atribuye a la transferencia de electrones fotoinducidos, PET, un mecanismo que altera la estructura electrónica y por tanto, la respuesta fotofísica del compuesto.

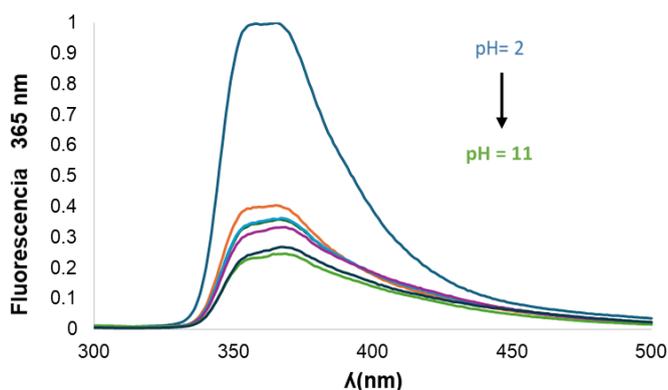


Figura 4.7. Espectro de emisión de fluorescencia del ligando en función del pH.

Cuando un cromóforo se excita, se produce un salto electrónico desde el nivel HOMO hacia el LUMO, dejando un hueco en el HOMO. Si en las cercanías existe un grupo capaz de dar de electrones, puede suceder que un electrón de este dador llene el espacio vacío. Esto conlleva a una limitación de la desexcitación radiativa del cromóforo por emisión de fluorescencia, ya que el proceso normal de retorno al estado fundamental se encuentra alterado (Gomes, 2024), tal y como se ilustra en la Figura 4.8.

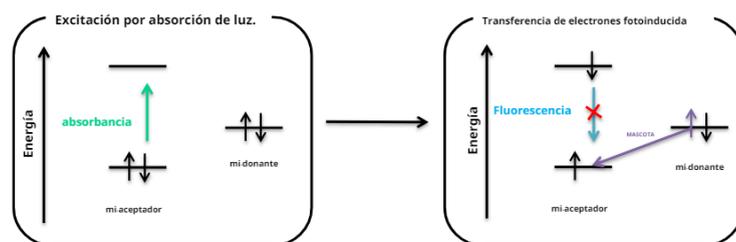


Figura 4.8. Representación de la transferencia de electrones fotoinducida en un sistema aceptor-dador. Adaptado de Pont Nicolòs (2019).

En este caso, la molécula es susceptible al efecto PET ya que, al desprotonarse las aminas, sus pares de electrones libres pasan a estar disponibles para participar en el efecto de transferencia de electrones. Es decir, a pH ácidos, que tiende a estar todo protonado, el par solitario del grupo amino no está disponible para la transferencia de electrones, y por ende, la emisión de la molécula es máxima. Sin embargo, a medida que aumenta el pH, las aminas tienden a desprotonarse, permitiendo el efecto PET, lo que conduce a una desaparición de la fluorescencia.

La Figura 4.9 se ha elaborado superponiendo los cambios en la emisión de la fluorescencia con el diagrama de distribución, y se aprecia que, bajo condiciones ácidas, la emisión a 365 nm es máxima. Al pasar de la especie LH_4 a LH_3 , la fluorescencia disminuye considerablemente y, en las siguientes etapas de desprotonación, de manera gradual.

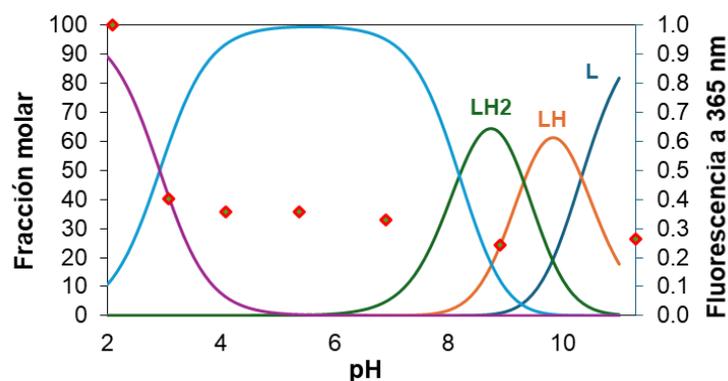


Figura 4.9. Diagrama de distribución (líneas sólidas) y variación del máximo de emisión de fluorescencia (rombos rojos) del ligando TPA-tren en función del pH.

Estudios de interacción con metales de transición y postransición

Tomando en cuenta la capacidad coordinante de la tetramina tren, se realizó este estudio con el fin de explorar y caracterizar el efecto sobre la fluorescencia cuando el ligando interacciona con diferentes metales de transición y postransición, concretamente con los cationes metálicos divalentes Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . A su vez, cabe esperar que la coordinación de los cationes metálicos tenga lugar principalmente a través de los grupos aminos de tren, dada la menor basicidad de la amina central de la unidad de TPA.

De los metales empleados, el cobre y el níquel son paramagnéticos, lo que significa que tienen electrones desapareados en sus orbitales, y esto provoca una interacción entre los electrones del ligando con los del metal, afectando a su respuesta fluorescente, y, en estos casos, en el resultado es

en una disminución de la fluorescencia del TPA-tren. Este descenso sugiere que la formación de complejos a partir del Cu^{2+} y Ni^{2+} , afecta de manera negativa la emisión de luz (Xiang & Lu, 2013). Por otro lado, el zinc es diamagnético y carece de electrones desapareados en sus orbitales, por lo que esperaríamos ver una respuesta diferente a la de los metales paramagnéticos. En este caso, el Zn^{2+} provoca un aumento en la emisión de fluorescencia. Este hecho sugiere que la interacción entre el Zn^{2+} y el ligando, promueve la transferencia de energía, incrementado así la emisión (Xiang & Lu, 2013).

Finalmente, el Mn^{2+} , al igual que el cobre y níquel, también presenta electrones desapareados en sus orbitales, pero presenta una constante de estabilidad más baja (Inclán Nafría, 2016) y por tanto, interacciona en menor medida con el ligando, por lo que, a la concentración de trabajo, este se vería muy poco afectado por la presencia de Mn^{2+} . Por tanto, este metal no repercute de manera significativa en la fluorescencia del ligando, ya que la emisión se mantiene prácticamente intacta cuando interacciona con este catión metálico. (Xiang & Lu, 2013).

En definitiva, los espectros de fluorescencia, representados en la Figura 4.10, muestran los resultados esperados en función de las propiedades electromagnéticas de cada metal, observando un fuerte aumento en la fluorescencia con Zn^{2+} a 368 nm (+244%), una disminución con el Cu^{2+} y Ni^{2+} (-92% y -42%, respectivamente) mientras que con el Mn^{2+} no hubo variación, resultando en un espectro muy similar a la del ligando solo.

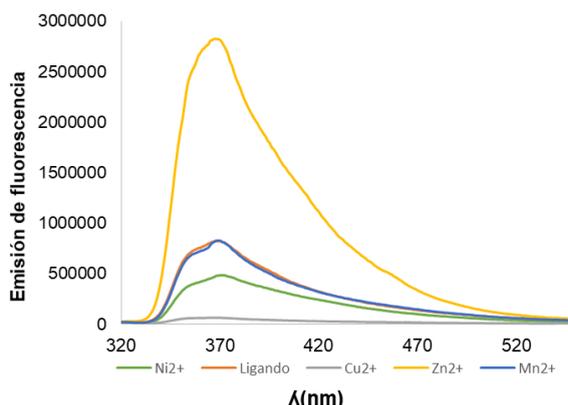


Figura 4.10. Espectro de emisión de fluorescencia del ligando solo (curva roja), en combinación con Cu^{2+} (curva gris), Zn^{2+} (curva amarilla), Mn^{2+} (curva azul) y Ni^{2+} (curva verde).

Adicionalmente, para ilustrar mejor estos resultados, se ha elaborado un diagrama de barras representando el máximo de emisión normalizado del ligando, para tener una comprensión más detallada del efecto que genera cada ión metálico, representado en la Figura 4.11.

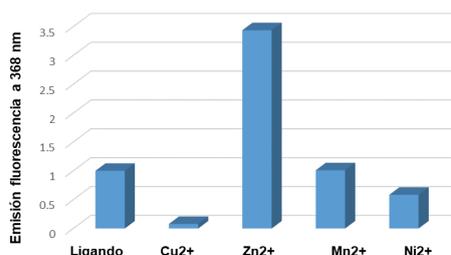


Figura 4.11. Variación del máximo de emisión a 368 nm del ligando en su interacción con diferentes cationes metálicos.

4.3. Estudios de agregación

4.3.1. Efecto de la polaridad del medio

Tras repetir un experimento de RMN al cabo de varios días, fue posible percatarse de drásticos cambios en las señales registradas (Figura 4.12): se habían vuelto anchas y poco definidas, lo cual apuntaba a que el compuesto pudiera estar agregando en disolución acuosa. Para indagar más en este fenómeno, se decidió disolver la muestra en el disolvente orgánico dimetilformamida (DMF) y en agua (índices de polaridad 6.4 y 10.2, respectivamente) en distintas proporciones, registrando la fluorescencia a 365 nm.

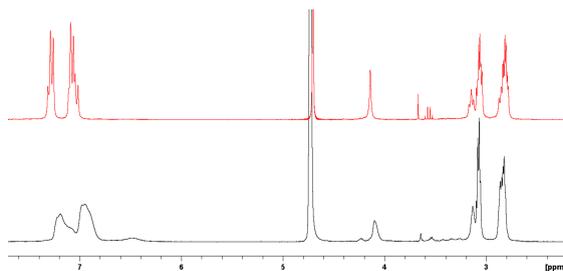


Figura 4.12. Comparativa de espectro obtenido por resonancia magnética nuclear en una muestra recién preparada (arriba) y la misma muestra después de varios días de incubación (abajo).

El hecho de utilizar un disolvente orgánico puro, como el DMF, hace que se obtenga en el espectro de emisión una banda ancha a una longitud de onda mayor, con un máximo en torno a 460 nm, que se correspondería con una banda de emisión de excímero, o dímero excitado.

Tras incrementar el porcentaje de agua hasta un 20%, aumenta la fluorescencia. Este fenómeno podría estar relacionado con lo que se conoce como emisión inducida por agregación (AIE): al aumentar la polaridad el medio, la molécula se apila, se forman agregados que restringen la libre rotación de los anillo de benceno de la molécula, y, en consecuencia, aumenta la fluorescencia, tal como se observa en la Figura 4.13.

En cambio, cuando la proporción de agua es alta, los agregados se vuelven extremadamente grandes, hasta alcanzar incluso un tamaño de 400 nm, como se ha podido comprobar gracias a un experimento realizado por DLS (*vide infra*). Como consecuencia de este aumento de tamaño, la dispersión de la luz y el autoapantallamiento aumenta, conduciendo a la disminución de la fluorescencia.

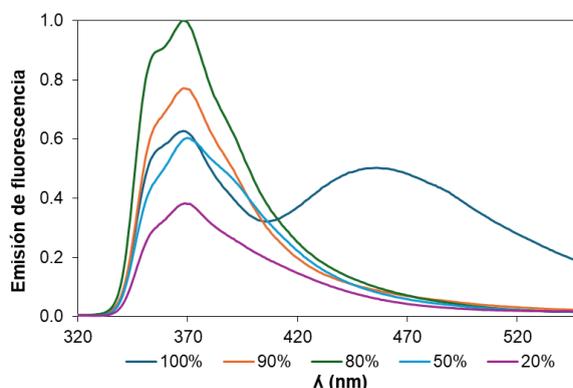


Figura 4.13. Espectro de emisión de fluorescencia en función del porcentaje de DMF empleado.

4.3.2. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La agregación en disolución es uno de los factores físicos esenciales para el uso del ligando en el ámbito biomédico. Una forma de determinar el tamaño de los agregados es mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), que se basa en la medición de la luz que se dispersa debido al movimiento browniano de las nanopartículas.

En la Figura 4.14, se ilustran los resultados de la distribución del tamaño para el compuesto estudiado, que muestran la presencia de partículas con un tamaño hidrodinámico medio de 430 nm en una disolución 10 μ M, 99% H₂O, 1% DMF. Nanopartículas de este tamaño podrían tener aplicaciones biomédicas, al ser capaces de atravesar barreras biológicas, y también podrían ser utilizadas como medio de transporte de fármacos (Cheng, 2005).

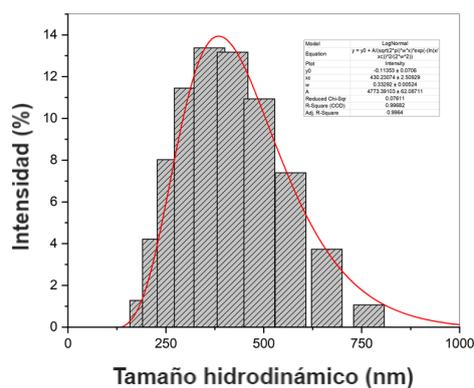


Figura 4.14. Diagrama de barras representando el tamaño hidrodinámico según el porcentaje de intensidad lumínica.

4.3.3. Dinámica molecular

Para determinar los factores que dan lugar a la agregación y apilamiento de la molécula en presencia de agua, se ha llevado a cabo un estudio computacional de dinámica molecular (MD) disponiendo 3 moléculas neutras en H₂O.

En la Figura 4.15, se ha representado la conformación de mínima energía obtenida para la interacción entre tres moléculas neutras de TPA-tren en una caja de agua explícita de 10 Å.

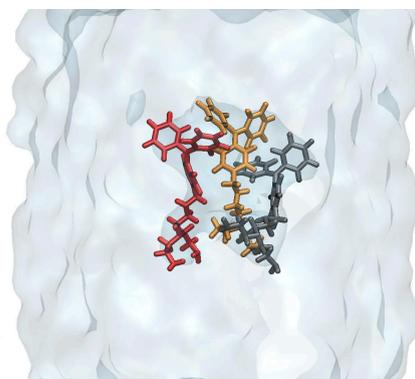


Figura 4.15. Disposición espacial de tres moléculas neutras de nuestro ligando en un medio acuoso.

En este experimento, debido a la estructura tripodal de la molécula, se manifiestan dos fenómenos principales: Por un lado tiene lugar el apilamiento π de los grupos fenilo de las unidades de TPA, lo

que ocasiona una mayor restricción del movimiento de los grupos fenilo, y por tanto, una mayor rigidez del sistema, lo cual explicaría el aumento de la fluorescencia al aumentar la proporción de agua frente al DMF. Por otra parte, las cadenas alifáticas interaccionan entre sí mediante enlaces por puentes de hidrógeno entre los grupos amino.

4.4. Interacción con ADN

4.4.1. Ensayos de fusión por desnaturalización térmica FRET

Después de analizar las propiedades ácido-base y el comportamiento en disolución, se procede a analizar la interacción del ligando con el ADN G-cuádruplex a través de la técnica de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). En base al principio de este ensayo, se puede determinar la selectividad del ligando hacia el ADN, sustentándose en los cambios de la temperatura de fusión (ΔT_m) entre el ADN libre y el ADN unido al ligando.

Las secuencias de ADN evaluadas en este estudio incluyen diversas topologías, entre las que se encuentran: ds26 (dúplex), c-myc (paralelo), TBA (antiparalelo), 22CTA (antiparalelo), 24TTG (Híbrido 1), y 26TTA (Híbrido 2); todas ellas a una concentración de $0.4\mu\text{M}$. Además, se dispondrá de cinco concentraciones diferentes de ligando, identificadas como C1, C2, C3, C4 y C5 que corresponden a $0.2\mu\text{M}$, $0.4\mu\text{M}$, $1.0\mu\text{M}$, $2.0\mu\text{M}$ y $4.0\mu\text{M}$, respectivamente.

Para una mejor interpretación de los resultados, se ha ilustrado los incrementos de la temperatura de fusión en un diagrama de barras, representado en la Figura 4.16.

Se observa que el compuesto no muestra una estabilización, ni con el ADN bicatenario ni con el G4-cuádruplex, que fuera significativa, ya que ningún valor superaba los 5°C en la ΔT_m . Sin embargo, dentro de todas las secuencias de ADNs evaluadas, la secuencia G4 de TBA era la que presentaba un incremento más notable en la temperatura de fusión, aunque no era suficiente para considerar al ligando como un buen candidato ya que su máximo alcanzaba los 4.79°C . Por tanto, aunque la molécula presenta un potencial limitado, nos sirve para que en investigaciones futuras se realicen modificaciones del diseño del TPA-tren para mejorar su afinidad y especificidad hacia los G4-cuádruplex, ya sea mediante la introducción de cadenas poliamínicas más extensas o la introducción de metales de transición. Estas modificaciones podrían permitir mejorar la interacción con el esqueleto fosfatado del G-cuádruplex, y por ende abrir nuevas vías para aplicaciones terapéuticas.

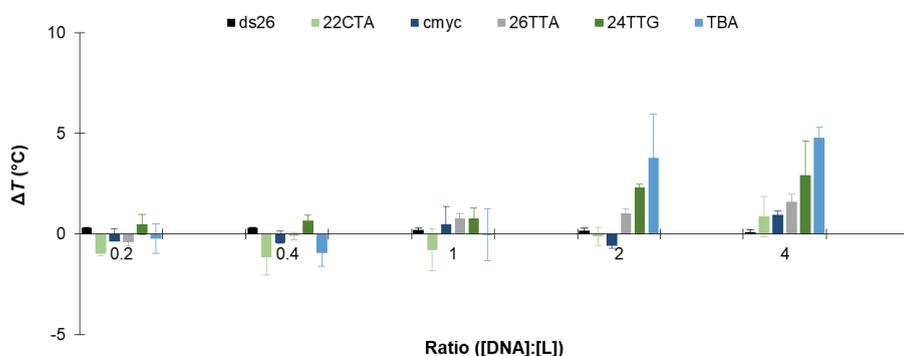


Figura 4.16. Diagrama de barras ilustrando la ΔT_m en función de la concentración del ligando en combinación con ds26 (barra negra), 22CTA (barra verde claro), cmyc (barra azul oscuro), 26TTA (barra gris), 24TTG (barra verde oscuro) y TBA (barra azul claro).

4.4.2. Dinámica molecular

Con el objetivo de adquirir más información acerca de la interacción del ligando con el ADN G4, se ha realizado un estudio computacional mediante dinámica molecular frente a la secuencia de TBA. En vistas a la Figura 4.17, se ha empleado el aptámero TBA, que es un ADN monocatenario con la secuencia 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' (Bank, s. f.). Éste interactúa con el exosito I de la alfa-trombina humana, por lo que actúa como un agente anticoagulante que inhibe la activación del fibrinógeno y la agregación plaquetaria. Además, TBA muestra buena afinidad y especificidad frente a la trombina (Wikipedia contributors, 2024), por lo que ligandos que interactúen selectivamente con esta secuencia podrían tener interesantes aplicaciones biomédicas en el desarrollo, por ejemplo, de agentes antitrombóticos.



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 $0.4\mu\text{M}$.

El conformero de mínima energía representativo para la interacción entre el ADN G4 y el derivado de TPA se muestra en la Figura 4.18. En color verde están representadas las guaninas y en azul las timinas. Asimismo, los enlaces de hidrógeno entre los grupos amonio y los fosfatos están marcados con líneas puntuadas. Se comprueba que la interacción por apilamiento π tiene lugar entre unos de los grupos fenilo del TPA y una de las timinas. A la vez, se establecen puentes salinos entre los grupos fosfato del aptámero y los grupos amino protonados de los brazos de la amina tripodal, fortaleciendo aún más la unión del complejo ligando-G4. Por tanto, es el sumatorio de ambas fuerzas lo que permite que se establezca de manera estable y coordinada la unión entre ambos.

En vistas a esto, para aumentar la interacción y selectividad del ligando por el G4 se podría alargar las cadenas con grupos propilamino, para extender las interacciones por puentes de hidrógeno y dotar de mayor flexibilidad al ligando.

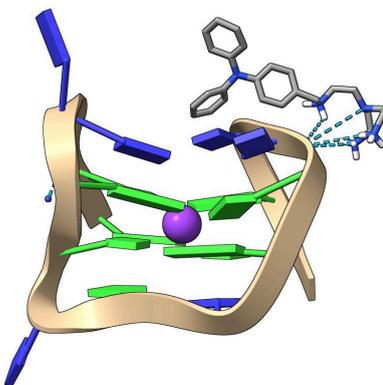


Figura 4.18. Resultado de la simulación por dinámica molecular (5ns) del ligando con el G-cuádruplex.

4.5. Estudios Biológicos

Con el fin de evaluar su actividad biológica, se ha llevado a cabo un estudio de citotoxicidad del ligando mediante ensayos MTT y para ello, se ha medido su actividad antitumoral *in vitro* empleando la línea celular cancerígena RAW 264.7 (macrófago de leucemia murina) (ATCC, s.f.).

4.5.1. Evaluación viabilidad celular mediante ensayo MTT

Se ha evaluado el efecto citotóxico del ligando en la línea celular RAW tanto a las 24 horas como a las 48 horas para obtener una comparativa detallada y precisa de la viabilidad celular. El diseño experimental consiste en un gradiente de concentraciones del ligando, específicamente 1 μM , 10 μM , 50 μM y 100 μM , y se han establecido controles positivos para cada serie de concentraciones, obteniendo un triplicado de cada una de ellas. Los resultados han sido significativos, ya que tanto las evaluaciones visuales como las mediciones realizadas con el espectrofotómetro de lectura de placas han demostrado que a concentraciones de 100 y 50 μM , el ligando es elevadamente citotóxico. Visualmente, las muestras a altas concentraciones adquieren un tono rosáceo, mientras que a concentraciones más bajas, el color violeta indica que el ligando no es tóxico, como se observa en la Figura 4.19.

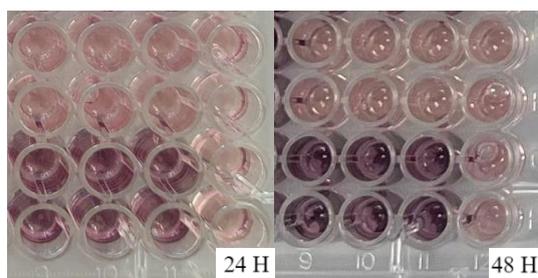


Figura 4.19. Placa Elisa del ligando a las 24 horas y a las 48 horas. Desde el borde superior, la primera fila corresponde con la concentración del ligando a 100 μM , la segunda fila a 50 μM , la tercera fila a 10 μM y la cuarta fila a 1 μM . Triplicado por cada concentración, con una cuarta columna que corresponde al control.

En cuanto al valor de la IC_{50} , se calculó en 15.45 μM a las 24 horas y en 26.3 μM a las 48 horas. Para aumentar la precisión de estos resultados se deberían repetir los experimentos acotando el intervalo de las concentraciones. La gráfica 4.20 representa los resultados obtenidos y, revela que para las concentraciones de 50 μM y 100 μM la viabilidad es negativa, lo que indica la ausencia de crecimiento celular, ya que prácticamente todas las células están muertas. La fluctuación en los valores de IC_{50} , junto con los cambios en la absorbancia y la respuesta celular ante la concentración del ligando, nos proporciona una visión más clara de la dinámica celular en presencia del ligando, y su posible eficacia como tratamiento antitumoral.

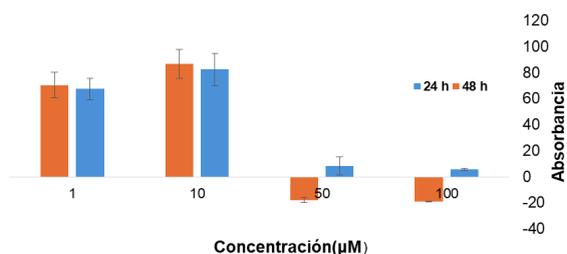


Figura 4.20. Diagrama de barras de la viabilidad celular en función de la variación de la absorbancia con la concentración del ligando, tanto a las 24 horas (barras azules) como a las 48 horas (barras naranjas).

6. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En el transcurso de esta investigación, se ha realizado la síntesis y el estudio de un nuevo ligando poliamínico, derivado del TPA y con estructura tripodal. Desde un enfoque multidisciplinar, se ha conseguido llevar a cabo una caracterización química y estructural detallada del compuesto, que ha permitido revelar aspectos fundamentales de su comportamiento ácido-base y de sus características fotofísicas, así como evaluar su prometedora actividad citotóxica. En base a los experimentos realizados, se detallan las conclusiones obtenidas.

Conclusión 1: Se ha logrado sintetizar y caracterizar con éxito el ligando poliamínico derivado del TPA y funcionalizado con una amina tripodal. La síntesis fue simple, a base de una reacción de adición nucleofílica entre el tren, una amina tripodal, y el ma-TPA, un monoaldehído derivado del TPA, con su posterior reducción mediante NaBH_4 . De esta forma, obtuvimos un ligando accesible sintéticamente y con un rendimiento elevado.

Conclusión 2: Se han caracterizado las propiedades ácido-base del compuesto mediante técnicas potenciométricas y espectroscópicas, que afectan de manera directa en sus características fotoquímicas del ligando y su interacción con el ADN. Se han podido determinar las constantes de protonación mediante medidas potenciométricas, correspondientes a los grupos amino de la cadena lateral, mientras que no fue posible determinar la protonación de la amina central del TPA debido a su extremada baja basicidad. La especiación del compuesto se ha completado mediante la elaboración de un diagrama de distribución en función del pH, lo cual ha permitido estimar el grado de protonación en todo el rango de pH estudiado (2.0 a 11.0).

Además, haciendo uso de técnicas espectroscópicas, tanto UV-Vis como de fluorescencia, se ha podido evaluar su comportamiento fotofísico. En el espectro de absorbancia, a medida que aumenta el pH, hay un incremento en la banda, en cambio, en el espectro de fluorescencia se ha observado un perfil diferente, ya que el aumento del pH conlleva al mínimo de emisión registrado, mientras que a pH más ácido, donde se encuentra la especie totalmente protonada, se alcanza el máximo de fluorescencia. Estos resultados se han atribuido a un efecto PET.

Conclusión 3: Se ha evaluado la estabilidad del compuesto mediante ensayos de agregación, que junto con técnicas como DLS y estudios computacionales han permitido observar el efecto que ocasiona la polaridad del medio en el estado de agregación del compuesto. Se ha demostrado que la polaridad del disolvente tiene un impacto significativo en la conformación espacial y en las propiedades fotofísicas de la molécula.

Conclusión 4: Mediante el análisis del ensayo de desnaturalización térmica se ha evaluado la interacción del compuesto con el ADN G4 y su selectividad frente al ADN dúplex, y se ha verificado que nuestro ligando no interacciona ni estabiliza de forma significativa ninguna de las estructuras de ADN estudiadas, lo cual puede deberse a una interacción más débil y deslocalizada con el esqueleto de azúcar fosfato del ADN y no con las regiones características de las estructuras G4, como han sugerido los resultados de dinámica molecular. El análisis de las conformaciones generadas con los estudios de dinámica molecular pone de manifiesto que la unión en el bolsillo del G4 está basada principalmente en interacciones electrostáticas de los grupos amonio del ligando así como en interacciones de apilamiento π - π de los grupos TPA. Por ello, estos hallazgos respaldan de manera concluyente la importancia de las fuerzas electrostáticas en la unión a los G4s.

Conclusión 5: La evaluación biológica del ligando se ha llevado a cabo en una línea celular tumoral mediante el ensayo de viabilidad celular de MTT. Se obtuvieron resultados significativos, ya que el compuesto a concentraciones del orden micromolar, es capaz de inhibir el crecimiento celular tanto a las 24 horas como a las 48 horas, lo que lo convierte en un potencial agente antitumoral.

Conclusión 6: Se han llevado estudios de interacción con metales de transición y de postransición, concretamente con Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . Los resultados sugieren que la interacción entre el ligando y los diferentes metales catiónicos tiene un impacto significativo en la fluorescencia del compuesto, dependiendo de las propiedades magnéticas de los metales y capacidad e interactuar con el ligando, ya que se observa que en presencia de metales paramagnéticos como el cobre y el níquel conduce a una disminución en la fluorescencia. En cambio, con el zinc, que es un metal diamagnético, produce un fuerte aumento de su emisión.

Teniendo en cuenta estas conclusiones, y para maximizar el potencial del ligando, se podría investigar la posibilidad de funcionalizar el compuesto con grupos específicos, para que cambie sus propiedades físico-químicas y biológicas, mejorando su afinidad por ciertas dianas moleculares. Así mismo, modificar su longitud, incrementando el número de cadenas poliamínicas y por tanto, el número de cargas positivas, permitiría incrementar su interacción con los G-cuádruplex.

Además, la introducción de grupos funcionales específicos podría aumentar la basicidad de la amina central del TPA, permitiendo su caracterización ácido-base. Del mismo modo, la optimización de su estructura podría evitar la agregación en agua y mejorar la estabilidad del compuesto, así como potenciar su interacción con el ADN G4.

A su vez, un cambio en su arquitectura, podría permitir un control de su respuesta en función pH, monitorizando su expresión y permitiendo su uso como sonda fluorescente en aplicaciones bioanalíticas o de *bioimaging*.

Debido al gran auge de la medicina personalizada y la terapia dirigida, se podría diseñar un ligando que en función de su carga, se dirija específicamente a su diana, o incluso, aprovecharnos de estas técnicas y llevarlo en sinergia con agentes quimioterapéuticos comprobados, potenciando los resultados clínicos en pacientes con cáncer.

En cuanto a la citotoxicidad del compuesto, se podrían evaluar otras líneas celulares tumorales aún más resistentes para poner a prueba la citotoxicidad del compuesto en situaciones más extremas.

Asimismo, la capacidad que tiene nuestro ligando para formar complejos estables con metales catiónicos es de gran relevancia, no solo por su implicación con la química de coordinación, sino también por su potencial en diversas aplicaciones biomédicas. Estos complejos estables pueden emplearse como agentes de contraste en técnicas de imagen, o como agentes terapéuticos en tratamientos anticancerígenos, como hoy en día se hace con el uso del cisplatino, un compuesto de coordinación que contiene platino. Además, pueden servir como vehículos seguros para la liberación específica de fármacos en su sitio diana.

En definitiva, el nuevo compuesto sintetizado emerge como una herramienta versátil y prometedora en el ámbito de la biotecnología e investigación biomédica, permitiendo abrir nuevas vías en el diseño de terapias personalizadas y dirigidas contra el cáncer y contribuir de manera significativa al avance de las mismas. En conjunto, todas estas perspectivas futuras subrayan el papel fundamental del compuesto en la innovación biotecnológica y en el desarrollo de soluciones terapéuticas para mejorar la salud humana.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, M., Sommers, J. A., Shoemaker, R. H., & Brosh, R. M. (2011). Inhibition of helicase activity by a small molecule impairs Werner syndrome helicase (WRN) function in the cellular response to DNA damage or replication stress. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, *108*(4), 1525-1530. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006423108>
- Alassia, F. (2024). Introducción a la Filosofía de la Química. *Unpsj*. https://www.academia.edu/112867188/Introduccio_n_a_la_Filosofi_a_de_la_Qui_mica?uc-sb-sw=35434293
- Asimov, I. (2007). *Breve historia de la química: Introducción a las ideas y conceptos de la química* 1a ed. en "Area de conocimiento: ciencia y técnica", 8a reimp. Ed. Alianza. Madrid
- Assi, H. A., Garavis, M., González, C., & Damha, M. J. (2018). i-Motif DNA: structural features and significance to cell biology. *Nucleic Acids Research*, *46*(16), 8038-8056. <https://doi.org/10.1093/nar/gky735>
- ATCC. (s.f.). TIB-71: RAW 264.7. ATCC. <https://www.atcc.org/products/tib-71>
- Aydemir, M., Haykır, G., Türksoy, F., Gümüş, S., Dias, F. B., & Monkman, A. P. (2015b). Synthesis and investigation of intra-molecular charge transfer state properties of novel donor-acceptor-donor pyridine derivatives: the effects of temperature and environment on molecular configurations and the origin of delayed fluorescence. *Physical Chemistry Chemical Physics/PCCP. Physical Chemistry Chemical Physics*, *17*(38), 25572-25582. <https://doi.org/10.1039/c5cp03937a>
- Bank, R. P. D. (s. f.). *RCSB PDB - 4DII: X-ray structure of the complex between human alpha thrombin and thrombin binding aptamer in the presence of potassium ions*. <https://www.rcsb.org/structure/4DII>
- Bazzicalupi, C., Bianchi, A., García-España, E., & Delgado-Pinar, E. (2014b). Metals in supramolecular chemistry. *Inorganica Chimica Acta/Inorganica Chimica Acta*, *417*, 3-26. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2014.03.001>
- Belotserkovskii, B. P., Liu, R., Tornaletti, S., Krasilnikova, M. M., Mirkin, S. M., & Hanawalt, P. C. (2010). Mechanisms and implications of transcription blockage by guanine-rich DNA sequences. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, *107*(29), 12816-12821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007580107>
- Bencini, A., Bianchi, A., Garcia-España, E., Micheloni, M., & Ramirez, J. A. (1999). Proton coordination by polyamine compounds in aqueous solution. *Coordination Chemistry Reviews*, *188*(1), 97-156. [https://doi.org/10.1016/s0010-8545\(98\)00243-4](https://doi.org/10.1016/s0010-8545(98)00243-4)
- Bhattacharyya, D., Mirihana Arachchilage, G., & Basu, S. (2016). Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability. *Frontiers in Chemistry*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00038>
- Bianchi, A., & Shore, D. (2008a). How Telomerase Reaches Its End: Mechanism of Telomerase Regulation by the Telomeric Complex. *Molecular Cell*, *31*(2), 153-165. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.013>
- Blackburn, E. H., Epel, E. S., & Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, *350*(6265), 1193-1198. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>
- Blackburn, E. H. (1991). *Structure and function of telomeres*. 350.
- Blackman, A. G. (2005). The coordination chemistry of tripodal tetraamine ligands. *Polyhedron*, *24*(1), 1-39. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2004.10.012>
- Bochman, M. L., Paeschke, K., & Zakian, V. A. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(11), 770-780. <https://doi.org/10.1038/nrg3296>
- Bosch, P. C., Segura-Bayona, S., Koole, W., Van Heteren, J. T., Dewar, J. M., Tijsterman, M., & Knipscheer, P. (2014). FANCD1 promotes DNA synthesis through G-quadruplex structures. *EMBO Journal*, *33*(21), 2521-2533. <https://doi.org/10.15252/embj.201488663>

- Boukamp, P., & Mirancea, N. (2006). Telomeres rather than telomerase a key target for anti-cancer therapy? *Experimental Dermatology*, 16(1), 71-79. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00517.x>
- Broxson, C., Beckett, J., & Tornaletti, S. (2011). Transcription Arrest by a G Quadruplex Forming-Trinucleotide Repeat Sequence from the Human c-myc Gene. *Biochemistry*, 50(19), 4162-4172. <https://doi.org/10.1021/bi2002136>
- Bryan, T. M., & Baumann, P. (2011). G-Quadruplexes: From Guanine Gels to Chemotherapeutics. *Molecular Biotechnology*, 49(2), 198-208. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9395-5>
- Budetić, M., Samardžić, M., Bubnjar, K., Dandić, A., Živković, P., Széchenyi, A., & Kiss, L. (2022). A new sensor for direct potentiometric determination of thiabendazole in fruit peels using the Gran method. *Food Chemistry*, 392, 133290. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133290>
- Buranaamnuay, K. (2021). The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. *Open Veterinary Journal*, 11(2), 251. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i2.9>
- Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., & Neidle, S. (2006). Quadruplex DNA: Sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research*, 34(19), 5402-5415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl655>
- Case, D. A., Ben-Shalom, I. Y., Brozell, S. R., Cerutti, et.al. (2019). *AMBER 2019*. University of California, San Francisco.
- Chaabani, H. (2019). The miraculous dynamism of the Qur'an: An example of a modern reading reveals a DNA designation. *International Journal of Modern Anthropology*, 2(12), 15. <https://doi.org/10.4314/ijma.v12i2.1>
- Chapman, R. G., & Sherman, J. C. (1997). Templatation and encapsulation in supramolecular chemistry. *Tetrahedron*, 53(47), 15911-15945. [https://doi.org/10.1016/s0040-4020\(97\)01041-7](https://doi.org/10.1016/s0040-4020(97)01041-7)
- Cheng, F. (2005). Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. *Biomaterials*, 26(7), 729-738. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.03.016>
- Cleal, K., Norris, K., & Baird, D. (2018). Telomere Length Dynamics and the Evolution of Cancer Genome Architecture. *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(2), 482. <https://doi.org/10.3390/ijms19020482>
- Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C., & Bacchetti, S. (1992). Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. Telomere shortening. . . *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/21574150_Counter_CM_Avilion_AA_LeFeuvre_CE_Stewart_NG_Greider_CW_Harley_CB_Bacchetti_STelomere_shortening_associated_with_chromosome_instability_is_arrested_in_immortal_cells_which_express_telomerase_activity
- Dahm, R. (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*, 278(2), 274-288. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.028>
- De Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(4), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nrm1359>
- De Magis, A., Manzo, S. G., Russo, M., Marinello, J., Morigi, R., Sordet, O., & Capranico, G. (2018). DNA damage and genome instability by G-quadruplex ligands are mediated by R loops in human cancer cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 116(3), 816-825. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810409116>
- De Magis, A., Manzo, S. G., Russo, M., Marinello, J., Morigi, R., Sordet, O., & Capranico, G. (2018b). DNA damage and genome instability by G-quadruplex ligands are mediated by R loops in human cancer cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 116(3), 816-825. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810409116>
- Drosopoulos, W. C., Kosiyatrakul, S. T., & Schildkraut, C. L. (2015). BLM helicase facilitates telomere replication during leading strand synthesis of telomeres. *Journal of Cell Biology*, 210(2), 191-208. <https://doi.org/10.1083/jcb.201410061>
- Fan, D., Cao, Y., Cao, M., Wang, Y., Cao, Y., & Gong, T. (2023). Nanomedicine in cancer therapy.

- Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 293.
<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01536-y>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I)
- Fisher Chemical | Fisher Scientific. (s. f.-b). *Sulfato de sodio, anhidro, certificado AR de análisis*, [https://www.fishersci.es/shop/products/sodium-sulfate-anhydrous-certified-ar-aalysis-fine-powder-3/10520872#?keyword=Sulfato%20de%20Sodio%20\(Na2SO4\)](https://www.fishersci.es/shop/products/sodium-sulfate-anhydrous-certified-ar-aalysis-fine-powder-3/10520872#?keyword=Sulfato%20de%20Sodio%20(Na2SO4))
- Fyhrquist, F., Saijonmaa, O., & Strandberg, T. (2013). The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nature Reviews. Cardiology*, 10(5), 274-283. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2013.30>
- Gale, P. A., & Steed, J. W. (Eds.). (2012). *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials* (1.^a ed.). Ed. Wiley. Chichester. <https://doi.org/10.1002/9780470661345>
- Gans, P., Sabatini, A., & Vacca, A. (1996). Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta*, 43(10), 1739-1753. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(96\)01958-3](https://doi.org/10.1016/0039-9140(96)01958-3)
- García-España, E., Belda, R., González, J., Pitarch, J., & Bianchi, A. (2012). Receptors for Nucleotides. *Supramolecular Chemistry: From Molecules To Nanomaterials*. <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc066>
- Gil Martínez, A. (2023). *Desarrollo de sondas fluorescentes para ADN telomérico*. Tesis doctoral en Facultat de Química, Universitat de València, Valencia, España. 492 pp.
- Gomes, L. J., Outis, M., Gomes, C. S. B., Tomé, A. C., & Moro, A. J. (2024). Development of Fluorescent Chemosensors for Calcium and Lead Detection. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 29(2), 527. <https://doi.org/10.3390/molecules29020527>
- Greider, C. W. (2016). Regulating telomere length from the inside out: the replication fork model. *Genes & Development*, 30(13), 1483-1491. <https://doi.org/10.1101/gad.280578.116>
- Haeusler, A. R., Donnelly, C. J., Periz, G., Simko, E. A. J., Shaw, P. G., Kim, M.-S., Maragakis, N. J., Troncoso, J. C., Pandey, A., Sattler, R., Rothstein, J. D., & Wang, J. (2014). C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature*, 507(7491), 195-200. <https://doi.org/10.1038/nature13124>
- Henderson, E., Hardin, C. C., Walk, S. K., Tinoco, I., & Blackburn, E. H. (1987). Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. *Cell*, 51(6), 899-908. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90577-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90577-0)
- Huffman, K. E., Levene, S. D., Tesmer, V. M., Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Telomere Shortening Is Proportional to the Size of the G-rich Telomeric 3'-Overhang. *Journal Of Biological Chemistry/The Journal Of Biological Chemistry*, 275(26), 19719-19722. <https://doi.org/10.1074/jbc.m002843200>
- Huppert, J. L., & Balasubramanian, S. (2007). G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Research*, 35(2), 406-413. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl11057>
- Inclán Nafria, M. A. (2016). *Nuevos ligandos poliaminicos de tipo escorpiando para*
- Jaekel, A., Lill, P., Whitelam, S., & Saccà, B. (2020). Insights into the Structure and Energy of DNA Nanoassemblies. *Molecules*, 25(23), 5466. <https://doi.org/10.3390/molecules25235466>
- Janic, I., & Kakas, M. (1984). Electronic configuration and spectra of the neutral and protonated forms of triphenylamine. *Journal Of Molecular Structure*, 114, 249-252. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(84\)87137-9](https://doi.org/10.1016/0022-2860(84)87137-9)
- Juskowiak, B. (2006). Analytical potential of the quadruplex DNA-based FRET probes. *Analytica Chimica Acta*, 568(1-2), 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.063>
- Kocak, E., Dykstra, S., Nemeth, A., Coughlin, C. G., Rodgers, K., & McVey, M. (2019). *Supplemental Material for Kocak et al., 2019* (p. 8657436 Bytes). GSA Journals. <https://doi.org/10.25386/GENETICS.9736133>
- Koshland, D. E. (1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 44(2), 98-104. <https://doi.org/10.1073/pnas.44.2.98>
- Lemke, T. L., Williams, D. A., Roche, V. F., & Zito, S. W. (2012). Foye's Principles of Medicinal Chemistry: Seventh Edition. En *Foye's Principles Of Medicinal Chemistry*. Ed. Williams

- and Wilkins. Philadelphia.
<https://creighton.pure.elsevier.com/en/publications/foyes-principles-of-medicinal-chemistry-seventh-edition>
- Libretexts. (2022, 2 noviembre). *11.2: métodos potenciométricos*. LibreTexts Español. [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica_2.1_\(Harvey\)/11%3A_M%C3%A9todos_electroqu%C3%ADmicos/11.02%3A_M%C3%A9todos_Potenciom%C3%A9tricos](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica_2.1_(Harvey)/11%3A_M%C3%A9todos_electroqu%C3%ADmicos/11.02%3A_M%C3%A9todos_Potenciom%C3%A9tricos). <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa695>
- LIFE LENGTH, 2010. Life Length world leader in telomere length measurement I estudios de edad biológica en Madrid, análisis telómeros en Madrid, precio estudio telomérico Madrid, pruebas de enfermedades sexuales en Madrid, investigación desarrollo de productos farmacéuticos en España. Visto 16 de Junio de 2024 <https://lifelength.com/>
- Maehle, A.-H. (2009). A binding question: The evolution of the receptor concept. *Endeavour*, 33(4), 135-140. <https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2009.09.001>
- Malvern Instruments Ltd. (2003). *Zetasizer Nano User Manual*. Reino Unido.
- Mandal, A. K., Suresh, M., Das, P., & Das, A. (2012). Restricted Conformational Flexibility of a Triphenylamine Derivative on the Formation of Host–Guest Complexes with Various Macrocyclic Hosts. *Chemistry*, 18(13), 3906-3917. <https://doi.org/10.1002/chem.201103079>
- Medina, M. A., Rodríguez-Caso, C., & Sánchez-Jiménez, F. (2005). A comprehensive view of polyamine and histamine metabolism to the light of new technologies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(4), 854-864. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00384.x>
- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., & Ralser, M. (2015). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal of Molecular Biology*, 427(21), 3389-3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>
- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., & Ralser, M. (2015). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal Of Molecular Biology/Journal Of Molecular Biology*, 427(21), 3389-3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>
- Mullard, A. (2024). FDA approves first telomerase inhibitor. *Nature Reviews. Drug Discover/Nature Reviews. Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/d41573-024-00102-7>
- Neidle, S. (2009). The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(3), 239-250. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.04.001>
- Neidle, S. (2009). The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes. *Current Opinion In Structural Biology*, 19(3), 239-250. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.04.001>
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. *Journal Of Natural Products*, 66(7), 1022-1037. <https://doi.org/10.1021/np030096l>
- Oh, K.-I., Kim, J., Park, C.-J., & Lee, J.-H. (2020). Dynamics Studies of DNA with Non-canonical Structure Using NMR Spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2673. <https://doi.org/10.3390/ijms21082673>
- O'Sullivan, R. J., & Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(3), 171-181. <https://doi.org/10.1038/nrm2848>
- Panossian, L. (2003). Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiology Of Aging*, 24(1), 77-84. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00043-x](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00043-x)
- Paz, E. A., Garcia-Huidobro, J., & Ignatenko, N. A. (2011). Polyamines in cancer. En *Advances in Clinical Chemistry*. Ed.Elsevier. Vol. 54, pp. 45-70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387025-4.00002-9>
- Pont, I., & González-García, J. (2021). Más enllà de la doble hèlix: L'estructura G-quàdruplex de l'ADN. *Mètode. Annual Review*, 12. <https://doi.org/10.7203/metode.12.16505>
- Pont, I., Martínez-Camarena, Á., Galiana-Roselló, C., Tejero, R., Albelda, M. T., González-García, J., Vilar, R., & García-España, E. (2020). Development of Polyamine-Substituted Triphenylamine Ligands with High Affinity and Selectivity for

- G-Quadruplex DNA. *ChemBioChem*, 21(8), 1167-1177. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900678>
- Pont Niclòs, I. (2019). *Apuntando a estructuras de ADN G4 con nuevos derivados de trifenilamina*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, Valencia, España. 344 pp.
- Prioleau, M.-N. (2017). G-Quadruplexes and DNA Replication Origins. En *DNA Replication*. Ed H. Masai & M. Foiani. Springer Singapore. Vol. 1042, pp. 273-286. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6955-0_13
- Prorok, P., Artufel, M., Aze, A., Coulombe, P., Peiffer, I., Lacroix, L., Guédin, A., Mergny, J.-L., Damaschke, J., Schepers, A., Cayrou, C., Teulade-Fichou, M.-P., Ballester, B., & Méchali, M. (2019). Involvement of G-quadruplex regions in mammalian replication origin activity. *Nature Communications*, 10(1), 3274. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11104-0>
- Qin, W., Long, S., Panunzio, M., & Biondi, S. (2013). Schiff Bases: A Short Survey on an Evergreen Chemistry Tool. *Molecules*, 18(10), 12264-12289. <https://doi.org/10.3390/molecules181012264>
- Reva, I., Lapinski, L., Chattopadhyay, N., & Fausto, R. (2003). Vibrational spectrum and molecular structure of triphenylamine monomer: A combined matrix-isolation FTIR and theoretical study. *Physical Chemistry Chemical Physics/PCCP. Physical Chemistry Chemical Physics*, 5(18), 3844-3850. <https://doi.org/10.1039/b306489a>
- Rossotti, F. J. C., & Rossotti, H. (1965). Potentiometric titrations using Gran plots: A textbook omission. *Journal Of Chemical Education*, 42(7), 375. <https://doi.org/10.1021/ed042p375>
- Shimoyama, Y., Kubota, T., Watanabe, M., Ishibiki, K., & Abe, O. (1989). Predictability of in vivo chemosensitivity by in vitro MTT assay with reference to the clonogenic assay. *Journal Of Surgical Oncology*, 41(1), 12-18. <https://doi.org/10.1002/jso.2930410107>
- Smith, D. K. (2005). A Supramolecular Approach to Medicinal Chemistry: Medicine Beyond the Molecule. *Journal of Chemical Education*, 82(3), 393. <https://doi.org/10.1021/ed082p393>
- Sun, D., & Hurley, L. H. (2009). The Importance of Negative Superhelicity in Inducing the Formation of G-Quadruplex and i-Motif Structures in the c-Myc Promoter: Implications for Drug Targeting and Control of Gene Expression. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 52(9), 2863-2874. <https://doi.org/10.1021/jm900055s>
- TELOYEARS, 2010. *What's Your Cellular Age? Take the TeloYears™ Test*. Visto 16 de Junio de 2024 <http://teloyears.co/>
- Teng, F.-Y., Jiang, Z.-Z., Guo, M., Tan, X.-Z., Chen, F., Xi, X.-G., & Xu, Y. (2021). G-quadruplex DNA: A novel target for drug design. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(19-20), 6557-6583. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03921-8>
- Thermo Scientific | Fisher Scientific. (s. f.). *N-ciclohexil-4-fluorobenzilamina*, 97 %. [https://www.fishersci.es/shop/products/n-cyclohexyl-4-fluorobenzylamine-97-thermo-scientific/15463408#?keyword=\(NaBH4\)](https://www.fishersci.es/shop/products/n-cyclohexyl-4-fluorobenzylamine-97-thermo-scientific/15463408#?keyword=(NaBH4))
- Thermo Scientific Chemicals | Fisher Scientific. (s. f.). *4-(Difenilamino)benzaldehido*, 98 %. <https://www.fishersci.es/shop/products/4-diphenylamino-benzaldehyde-98-thermo-scientific/15432289>
- Thermo Scientific Chemicals | Fisher Scientific. (s. f.). *Tris(2-aminoetil)amina*, 97 %. [https://www.fishersci.es/shop/products/tris-2-aminoethyl-amine-97-thermo-scientific/11403900#?keyword=Tris%20\(2-aminoetil\)](https://www.fishersci.es/shop/products/tris-2-aminoethyl-amine-97-thermo-scientific/11403900#?keyword=Tris%20(2-aminoetil))
- Thomas, T., & Thomas, T. J. (2001). Polyamines in cell growth and cell death: Molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(2), 244-258. <https://doi.org/10.1007/PL00000852>
- Twarużek, M., Zastempowska, E., Soszczyńska, E., & Altyn, I. (2018). The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Acta Universitatis Lodzianis. Folia Biologica Et Oecologica*, 14, 23-32. <https://doi.org/10.1515/fobio-2017-0006>
- Van Schie, J. J. M., Faramarz, A., Balk, J. A., Stewart, G. S., Cantelli, E., Oostra, A. B., Rooimans, M. A., Parish, J. L., De Almeida Estéves, C., Dumic, K., Barisic, I., Diderich, K. E. M., Van Slegtenhorst, M. A., Mahtab, M., Pisani, F. M., Te Riele, H., Ameziane, N., Wolthuis, R. M. F., & De Lange, J. (2020). Warsaw Breakage Syndrome associated DDX11 helicase resolves G-quadruplex structures to support sister chromatid cohesion. *Nature*

- Communications*, 11(1), 4287. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18066-8>
- Verdejo, B., Inclán, M., Clares, M. P., Bonastre-Sabater, I., Ruiz-Gasent, M., & García-España, E. (2021). Fluorescent Chemosensors Based on Polyamine Ligands: A Review. *Chemosensors*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10010001>
- Wellinger, R. J. (2014). In the End, What's the Problem? *Molecular Cell*, 53(6), 855-856. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.008>
- Woster, P. M., & Casero, R. A. (Eds.). (2012). *Polyamine drug discovery*. RSC Publishing.
- Xiang, Y., & Lu, Y. (2013). DNA as Sensors and Imaging Agents for Metal Ions. *Inorganic Chemistry*, 53(4), 1925-1942. <https://doi.org/10.1021/ic4019103>
- Xu, B., He, J., Liu, Y., Xu, B., Zhu, Q., Xie, M., Zheng, Z., Chi, Z., Tian, W., Jin, C., Zhao, F., Zhang, Y., & Xu, J. (2014). High-performance two-photon absorption luminophores: large action cross sections, free from fluorescence quenching and tunable emission of efficient non-doped organic light-emitting diodes. *Journal Of Materials Chemistry. C*, 2(17), 3416. <https://doi.org/10.1039/c3tc32052a>
- Xuan, M., Gu, X., Li, J., Huang, D., Xue, C., & He, Y. (2023). Polyamines: their significance for maintaining health and contributing to diseases. *Cell Communication And Signaling*, 21(1). Reino Unido. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01373-0>
- Yakovchuk, P. (2006). Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Research*, 34(2), 564-574. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj454>
- Yang, D., & Okamoto, K. (2010). Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future Medicinal Chemistry*, 2(4), 619-646. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.172>
- Zakian, V. A. (2012). Telomeres: The beginnings and ends of eukaryotic chromosomes. *Experimental Cell Research*, 318(12), 1456-1460. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.015>

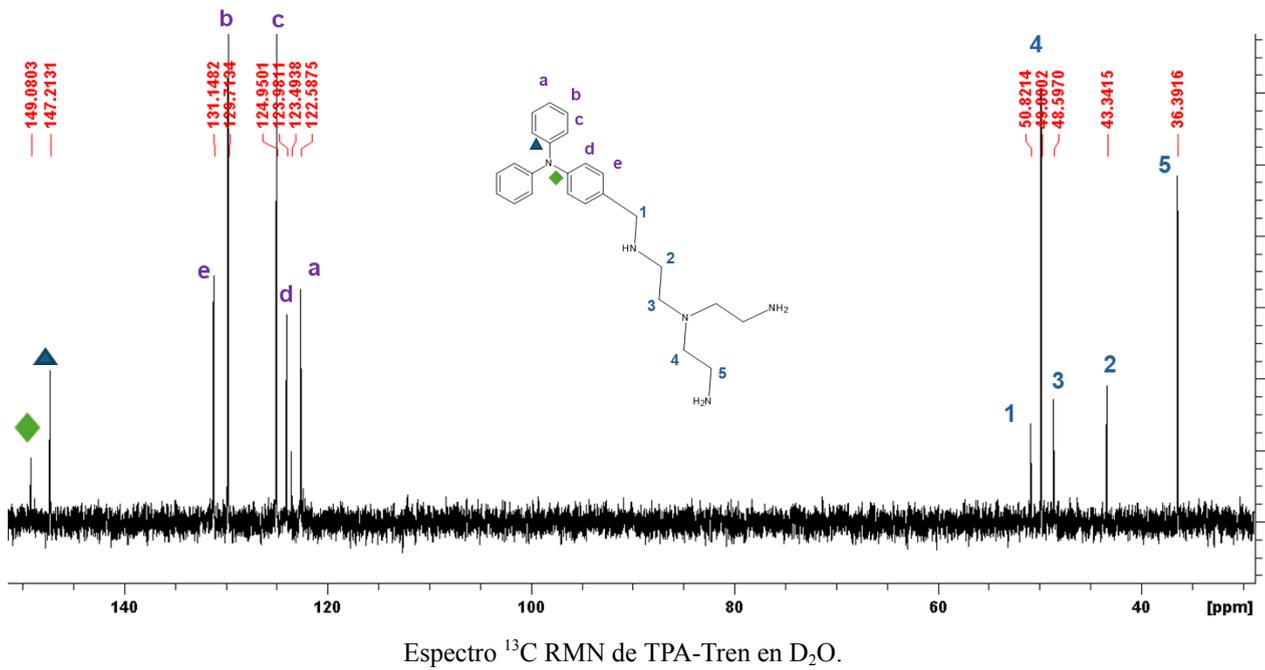
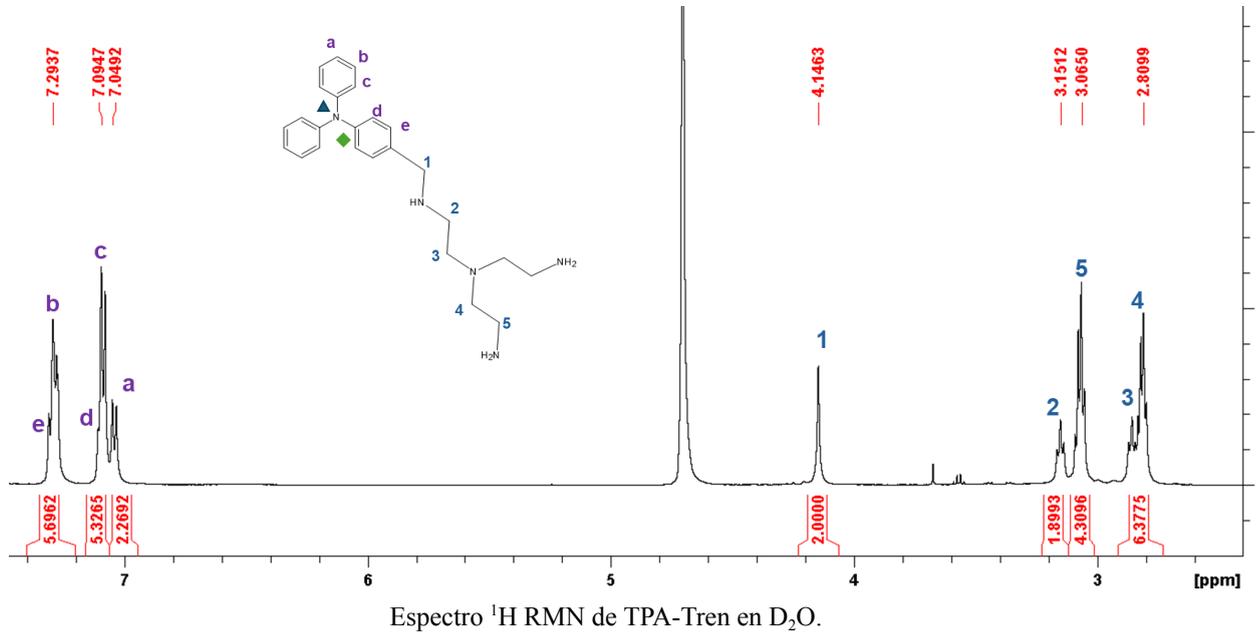
ANEXOS

Índice

Anexo 1. Espectros RMN.....	1
Anexo 2. Espectro HSQC.....	2
Anexo 3. Espectro COSY.....	2

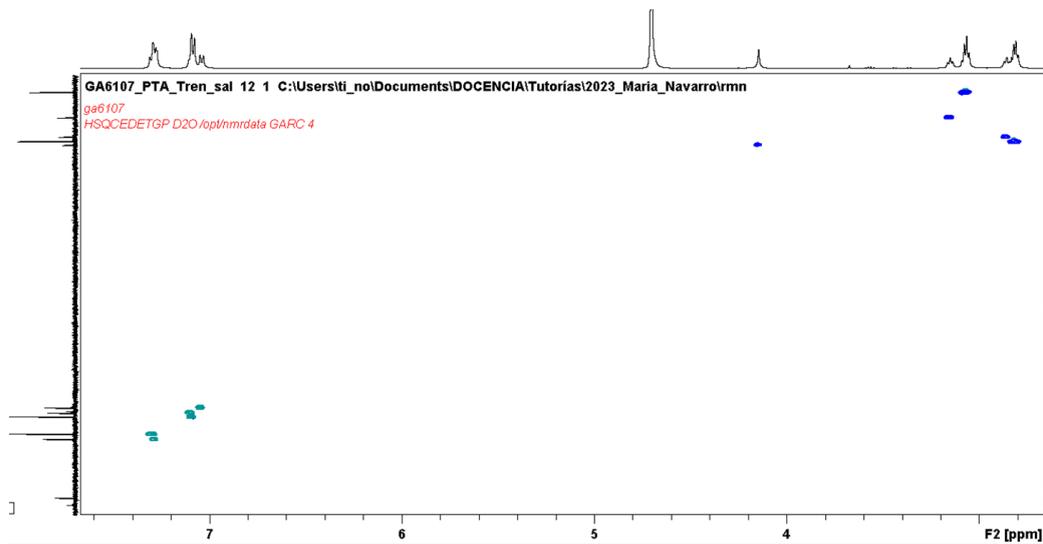
ANEXO 1. Espectros RMN

Caracterización ligando por espectro monodimensional.



ANEXO 2. Espectro HSQC

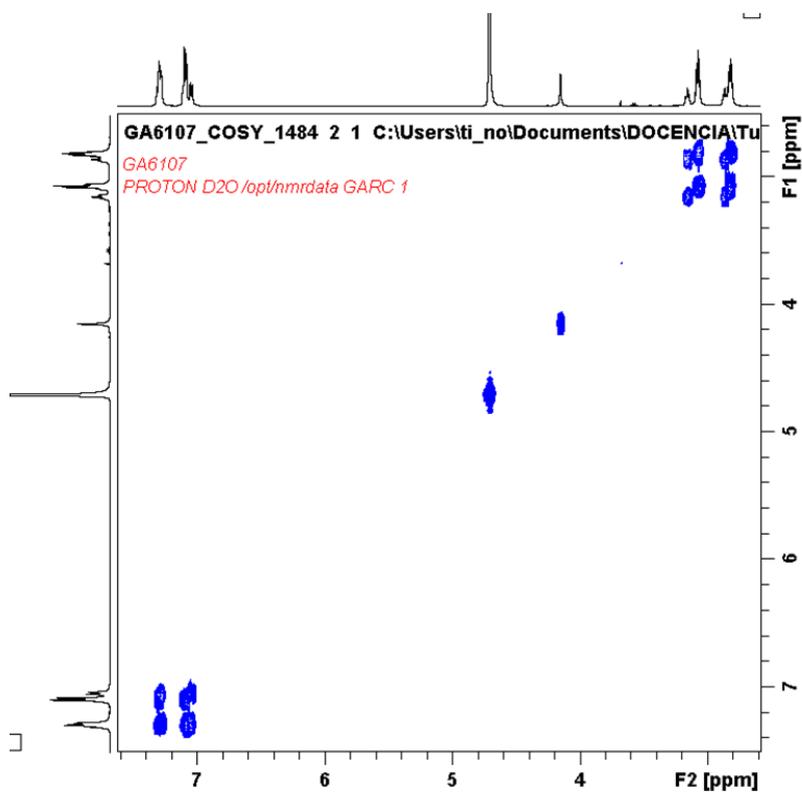
Caracterización ligando por espectro bidimensional heteronuclear.



Espectro HSQC de TPA-Tren en D₂O.

ANEXO 3. Espectro COSY

Caracterización ligando por espectro bidimensional homonuclear.



Espectro COSY de TPA-Tren en D₂O.