



**Facultad de Farmacia – Universidad de Sevilla**

# **ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE MACROCICLOS TIPO CALIXARENO Y ADN**

**Ana Muñoz Wic**





**Departamento de Química Física**

**Facultad de Química – Universidad de Sevilla**

**Trabajo Fin de grado – Grado en Farmacia**

# **ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE MACROCICLOS TIPO CALIXARENO Y ADN**

Trabajo Fin de Grado de tipo Experimental.

Área de Química Física de la Facultad de Química.

Tutora de trabajo: Prof. Pilar López Cornejo

**Ana Muñoz Wic**

**Sevilla, Julio 2017**



## **1.RESUMEN**

Gracias a la posibilidad de diseñar y fabricar diferentes tipos de vectores, según las características del sistema a transportar y a la capacidad para condensar el ADN; los calixarenos se pueden convertir en una de las principales herramientas para los procesos de transfección, dejando atrás los problemas que conllevan los vectores virales y no virales como los lípidos catiónicos y polímeros.

Se ha comprobado su calidad como portador artificial a través de estudios de absorbancia, fluorescencia, dicroísmo circular, melting, viscosidad, AFM, y citotoxicidad; de manera que se verifican sus capacidades de interacción y compactación con el polinucleótido.

**PALABRAS CLAVE:** calixareno, ADN, nanotransportador, intercalación.

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. OBJETIVOS.....	12
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	13
4.1 MATERIALES.....	13
4.2 MÉTODOS.....	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
5.1 Medidas de fluorescencia.....	16
5.2 Viscosidad.....	19
5.3 Dicroísmo circular.....	20
5.4 Melting.....	24
5.5 AFM.....	25
5.6 Citotoxicidad.....	26
6. CONCLUSIONES.....	27
7. BIBLIOGRAFÍA.....	28

## **2. INTRODUCCIÓN**

Según estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, el ADN desnudo y el ARN muestran una capacidad muy pobre para transfectar células, debido a una serie de barreras que tienen que atravesar y su descomposición por nucleasas en medios biológicos (Dominska and Dykxhoorn 2010).

Uno de los mayores retos en terapia génica es encontrar portadores de genes seguros y eficientes. En la última década se ha dedicado mucho esfuerzo a ampliar la gama de compuestos capaces de compactar, proteger, transportar y suministrar ácidos nucleicos a la célula para que exprese las proteínas adecuadas (Junquera and Aicart 2014; Thomas et al. 2003).

En un principio los virus fueron la opción lógica para liberar los genes en el lugar correcto. Los virus recombinantes se construyeron sustituyendo los genes esenciales para la fase de replicación de sus ciclos de vida con los genes terapéuticos de interés (Ortiz Mellet et al. 2011).

Sin embargo, el uso de vectores virales sigue acompañado de algunos riesgos no despreciables, tales como respuestas inmunes adversas violentas y genotoxicidad (Srinivas et al. 2009). Esto es debido al hecho de que, al igual que los virus han evolucionado para infectar células, el sistema inmunológico se ha desarrollado para rechazar lo que percibe como la invasión de patógenos (Ortiz Mellet et al. 2011). Además, su uso presenta limitaciones como la complejidad y alto coste que requieren los procesos de preparación, la producción suele ser en cantidades bastante escasas, las dimensiones restringidas de los filamentos de ácido nucleico que pueden ser transportados por ellos o la posible y comprometida biodisponibilidad debido al gran tamaño molecular que poseen (Mintzer and Simanek 2009).

Teniendo en cuenta las limitaciones y riesgos inherentes existentes en el uso de estos vectores, se ha dirigido mucho la atención al diseño de portadores artificiales (no virales) para la liberación génica (Nayak and Herzog 2010) basados, inicialmente, en la utilización de lípidos catiónicos y, posteriormente, en la de polímeros catiónicos, dendrímeros, ciclodextrinas y nanopartículas (Li and Huang

2007; Mintzer and Simanek 2009).

Estos vectores no virales presentan algunas ventajas frente a los virales, tales como la capacidad de compactar una mayor cantidad de ADN, el no desencadenar una respuesta inmune y tener una producción más barata (Muñoz-Úbeda et al. 2012).

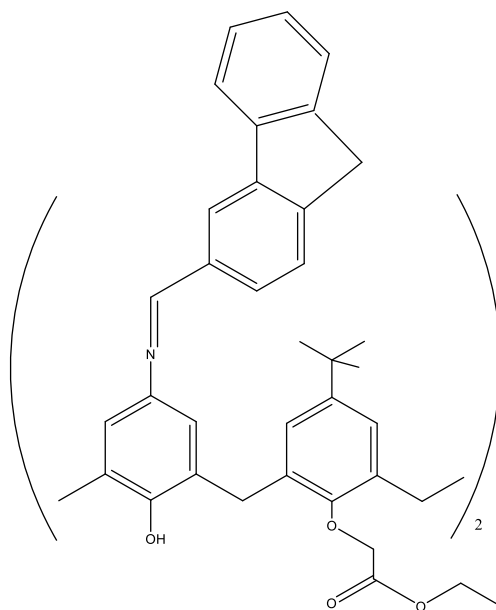
Entre ellos, el desarrollo en el uso de lípidos catiónicos (Hirko et al. 2003; Martin et al. 2005; 2006) y en el de polímeros (Esmailzadeh Gharehdaghi et al. 2014; De Smedt et al. 2000) ha sido particularmente exitoso. Sus complejos con el ADN, llamados lipoplejos y poliplexos respectivamente, muestran una alta eficiencia de transfección in vitro, una inmunogenicidad débil y una capacidad para transportar grandes cantidades de información genética (Mintzer and Simanek 2009).

Sin embargo, el uso de estos sistemas también presentan algunos problemas como es el caso del pobre control estructural que presentan sus complejos con el ADN (Safinya 2001), que son generalmente estructuras grandes, infinitas y polidispersas. Además, los lípidos catiónicos presentan toxicidad moderada-alta y su asociación con las proteínas de suero promueve fagocitosis (Caracciolo et al. 2010; Di Cola et al. 2016). Todo esto hace que el desarrollo de nuevas moléculas y formulaciones capaces de entregar ácidos nucleicos en las células con mayor eficiencia y seguridad todavía esté aún en curso (Gallego-Yerga et al. 2015).

En los últimos años se ha propuesto un gran número de vectores génicos basados en bloques de construcción supramoleculares. Uno de los grupos más importantes está basado en la unión de moléculas macrocíclicas tales como ciclodextrinas, fullerenos, calixarenos (CA) y pilarenos (Aoyama 2004; Ortiz Mellet et al. 2010).

Los calixarenos (ver **fig.1**) son una clase de oligómeros cíclicos formados a través de una condensación de fenol-formaldehído. Tienen forma de "copa" con un borde superior e inferior definido y un anillo central (Mcmahon et al. 2003).





**Figura 1.** Estructura del 5,7-(9H-fluoren-2-il) metileneamino)-11,23-di-tert-butil-25,27-dietoxicarbonilmetileneoxi-26-28-dihidroxicalex[4]arene

Los primeros prototipos explotaron la atracción entre los grupos fosfatos del ADN y los cationes permanentes sobre los calixarenos. Posteriormente se desarrollaron ligandos más sofisticados que utilizaron los enlaces de hidrógeno,  $\pi$ -stacking, la coordinación metálica y el carácter hidrofóbico para reconocer la forma y el estado de carga de los ácidos nucleicos (Peters and Schrader 2016a).

Los calixarenos presentan la peculiaridad de contener en la misma molécula compartimentos hidrofóbicos e hidrofílicos. Las cavidades hidrofóbicas les dan capacidad para atrapar moléculas más pequeñas. Los bencenos que forman esta cavidad pueden estar funcionalizados con grupos iónicos, ya sea en el borde superior o en el borde inferior del armazón del calixareno, aportándole el carácter hidrofílico (Lindman and Dias 2008a). Esta característica mejora significativamente la capacidad de condensación del ácido nucleico y la eficiencia de transfección de los nanocomplejos supramoleculares resultantes (Martinez et al. 2013).

Esto supone una gran ventaja para los calixarenos frente al resto de vectores génicos, ya que pueden preparar distintos derivados con diferentes selectividades en función de los iones y pequeñas moléculas que vayan a hospedar (McMahon et al. 2003). Esa sencillez a la hora de funcionalizarlos hace que los calixarenos se presten bien a muchas aplicaciones (McMahon et al. 2003). Algunas de ellas son aplicaciones biomédicas diversas que incluyen actividades antibacterianas, anticancerígenas, antivirales, antitrombóticas y membranotrópicas, sensores de iones, bloqueo e imitación selectiva de enzimas, así como complejación de proteínas y entrega de genes (Rodik et al. 2009).

Diversos estudios muestran que los derivados de calixareno con propiedades anfífilas son capaces de condensar el ADN en nanopartículas muy pequeñas, mientras que los derivados que llevan cadenas relativamente largas exhibieron una eficiencia de transfección más alta junto con una menor citotoxicidad (Junquera and Aicart 2014). Su esqueleto altamente lipófilo también colabora en su eficiencia y selectividad como ligando para diferentes tipos de cationes (Neidle 2002).

Se ha demostrado también, que cada una de las estructuras de un calixareno, con polaridades diferentes, tiene capacidad para discriminar incluso iones metálicos esféricos con características muy similares (Neidle 2002).

Además, presentan propiedades como la multivalencia, que tiene efecto en fenómenos de condensación del ADN, en los procesos de transfección celular, reconocimiento superficial de proteínas, autoensamblaje, ingeniería cristalina y nanofabricación. Por esta propiedad pueden ser usados como plataforma, gracias a que presentan un número variable de posiciones reactivas para unir las funciones de ligadura, propiedades de conformación bien definidas y, en algunos casos, cavidades capaces de encapsular especies huéspedes (Baldini et al. 2007).

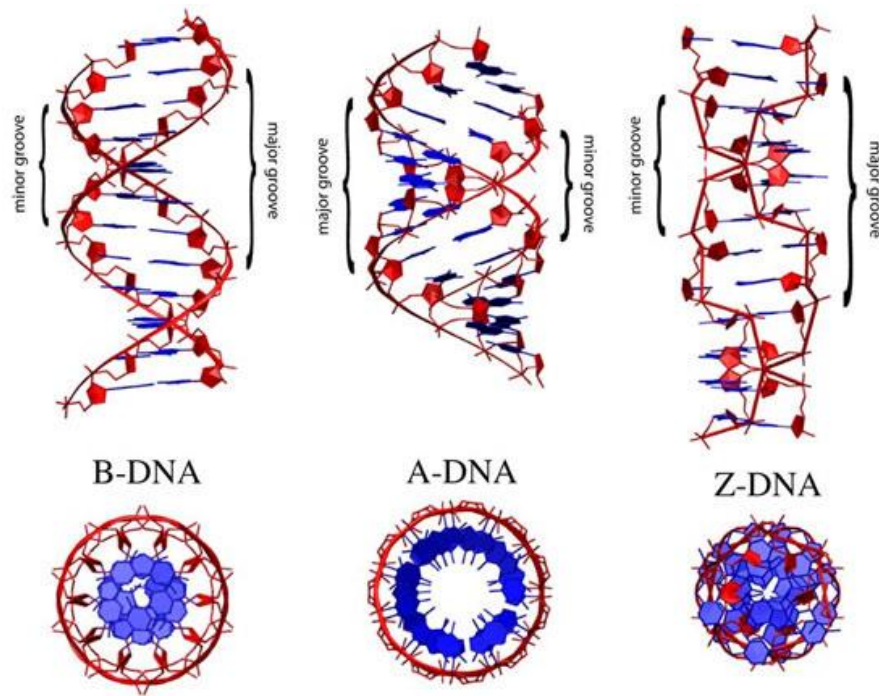
La propiedad de estos macrociclos que más nos interesa es su capacidad para permitir la incorporación controlada de elementos quelantes de ácidos nucleicos. Al igual que cualquier otro ligando, el reconocimiento molecular de los derivados de

ácidos nucleicos por parte de los calixarenos en disolución se puede producir por interacción electrostática con el esqueleto del ADN, por la unión en posiciones *groove* (*minor* y *major*) y/o por intercalación (Peters and Schrader 2016b).

El ADN (ver fig.2) es un polielectrolito con una alta carga negativa. Tiene una estructura bicatenaria debida a enlaces de hidrógeno, e interacciones hidrofóbicas entre pares de bases. La conformación más estable de este polinucleótido bajo condiciones fisiológicas, es la B-ADN (Lindman and Dias 2008b).

Según estudios previos, la interacción del calixareno con el polinucleótido parece romper los enlaces de hidrógeno que hay entre los pares de bases, induciendo así la desnaturalización parcial del ADN (Ostos et al. 2015). Los grupos hidrofóbicos presentes en la doble hebra, se encuentran en gran parte ocultos, mientras que están bastantes expuestos cuando la hebra está sola. Esto hace que las interacciones hidrofóbicas aumenten y por tanto la compactación del ADN esté favorecida, favoreciendo así la transfección (Dias et al. 2008), que sigue siendo el campo de aplicación más prometedor para los calixarenos (Peters and Schrader 2016a).

En los últimos años se han preparado numerosos derivados del calixareno que se unen a ácidos nucleicos de una manera predecible y son capaces de interferir con las funciones biológicas. Sin embargo, no se tiene aún claro cómo tiene lugar la interacción calixareno-ADN (Peters and Schrader 2016a).



**Figura 2.** Estructura del ADN en las distintas conformaciones

### **3. OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo es el empleo de moléculas tipo calixareno como nanotransportadores de medicamentos. Un caso particular de medicamento es el ADN. En este trabajo se estudia la interacción de un tipo concreto de calixareno como nanotransportador de ADN de timo de vaca, con el fin de ver si es posible su uso en terapia génica

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 MATERIALES**

Para llevar a cabo la síntesis del transportador se ha utilizado un calixareno sintetizado por un grupo de investigación irlandés del Instituto Tecnológico de Tallaght (Dublín) con el que se mantiene una colaboración desde hace unos años.

Este calixareno es poco soluble en agua, de modo que se ha empleado un tampón de cacodilato al 0.01M y metanol-agua al 20% (todas las experiencias se han hecho con este tampón sin variar la concentración). Las disoluciones de ADN de timo de vaca (calf thymus DNA), de Sigma-Aldrich, también se prepararon en esta mezcla para mantener constante las características del medio. Las concentraciones del polinucleótido usadas dependieron de la técnica utilizada en cada momento.

Todas las soluciones han sido preparadas con agua desionizada con el sistema Millipore Milli-Q, que da una conductividad de  $10^{-6} \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ . Las medidas se han llevado a cabo a una temperatura constante de  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y un pH fijo de 7,4 con una disolución tampón de cacodilato sódico 0.01M y NaOH.

### **4.2 MÉTODOS**

Se estudió un sistema binario compuesto por dos moléculas: calixareno y ADN. Se realizaron estudios de estabilidad del ADN solo, y estudios de estabilidad de las disoluciones calixareno/ADN a distintas relaciones molares  $X$ , siendo  $X = [\text{calixareno}]/[\text{ADN}]$ .

#### **4.2.1 Medidas de fluorescencia**

Los espectros de emisión se obtuvieron usando un espectrofluorímetro Hitachi- f-2500 conectado a un PC para la grabación y manipulación de los mismos. Se utilizó una cubeta de cuarzo estándar de 10 mm de paso de luz.

Las disoluciones se prepararon manteniendo constante la concentración de calixareno ( $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) y variando la concentración de ADN.

Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 318nm y 410nm. Se utilizó una velocidad de barrido de 1500nm/min.

#### **4.2.2 Medidas de viscosidad**

Las medidas de viscosidad se llevaron a cabo utilizando un microviscosímetro de Ostwald sumergido en un baño de agua a la temperatura fija de 30°C. Las mediciones se repitieron al menos seis veces.

Las medidas se realizaron dejando la concentración de ADN fija ( $4 \times 10^{-5}$ ) y variando la de calixareno para obtener los valores del parámetro X deseado.

#### **4.2.3 Dicroísmo circular**

Los espectros de dicroísmo circular (CD) se registraron en un espectropolarímetro Biologic Mos-450. Se usó el programa Biokine 4.72. Se utilizó una célula de cuarzo estándar de 10 mm de paso de luz. Las experiencias se realizaron en el rango de longitudes de onda de 220 a 350 nm. Todos los espectros fueron corregidos con sus blancos correspondientes y cada espectro se obtuvo a partir de un promedio de 5 barridos, con un tiempo de espera de 5 min entre cada medida.

Las medidas se realizaron dejando la concentración de ADN fija ( $5 \times 10^{-5}$ M) y variando la concentración de calixareno.

#### **4.2.4 Melting**

El estudio de desnaturalización térmica se realizó en un espectrofotómetro equipado con un controlador de temperatura Peltier. El aumento de la temperatura fue de  $0,2^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . La medida de absorbancia se llevó a cabo a una longitud de onda de 258nm. La concentración de ADN utilizada fue de  $5 \times 10^{-5}$ M.

#### **4.2.5 AFM**

Imágenes de AFM fueron obtenidas con un Molecular Imaging PicoPlus 2500 AFM (Agilent Technologies). Se utilizaron soportes de silicio (modelo Pointprobe, Nanoworld) con una frecuencia de resonancia de alrededor de 240 kHz y una

constante de fuerza nominal de 42 N/m. Todas las imágenes AFM se realizaron en aire y en el modo de tapping, con velocidades de aproximadamente 0,5 Hz y con una recopilación de datos de 256×256 píxeles. Con el fin de conseguir buenas imágenes de moléculas de ADN aisladas, fue necesario utilizar disoluciones diluidas del polinucleótido ( $4 \times 10^{-6} \text{M mol dm}^{-3}$ ) debido al gran tamaño de estas moléculas. Las imágenes AFM de los complejos calixareno/ADN se obtuvieron mediante el secado de una gotita de 30  $\mu\text{l}$  de solución de calixareno y ADN previamente depositada sobre mica modificada. El procedimiento de preparación de la muestra fue el siguiente: la superficie de mica se modificó dejando caer una disolución acuosa de APTES al 0,1% (v/v) sobre la misma. Después de 20 minutos, la superficie se lavó con agua ultra pura y se secó al aire. A continuación, se añadió 30  $\mu\text{l}$  de la disolución de ADN (o calixareno/ADN) sobre esta superficie modificada, se incubó durante 30 minutos, se lavó con agua pura y se secó al aire para, posteriormente, obtener las imágenes de AFM.

#### **4.2.6 Ensayos de citotoxicidad**

Para medir la sensibilidad del calixareno, se realizaron medidas de citotoxicidad in vitro usando el ensayo de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de [3-(4,5-dimethylthiazol -2-il)-2,5-diphenyltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, convirtiéndose en un compuesto coloreado de color púrpura (formazán) que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Se llevaron a cabo distintas experiencias variando la concentración del calixareno. Se usaron 4 líneas celulares cancerosas: A549 (Células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas), LS180 (Adenocarcinoma de colon caucásico humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular hepático) y MCF7 (Fundación para el cáncer de Michigan-7); y una línea celular normal: RPE-1.

El medio de cultivo utilizados para el crecimiento de las células dependió de la línea celular utilizada: A549, MCF7, LS180 y HepG2 (DMEM+ 10% FBS + 1%

penicilina/estreptomicina) y RPE-1 (RPMI/F12 + 10% FSB + 1% penicilina/estreptomicina).

## **5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 Medidas de Fluorescencia**

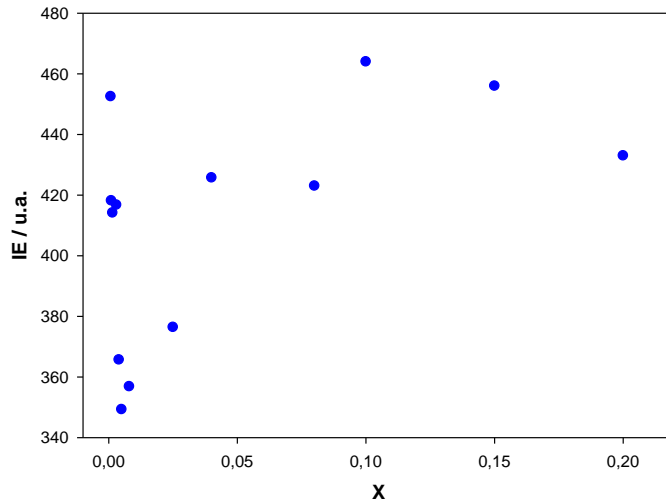
El calixareno estudiado está funcionalizado con anillos aromáticos que lo convierten en moléculas fluorescentes. Esta característica nos facilita el trabajo, en el sentido de que no es necesaria la adición de ninguna otra especie para obtener información acerca del complejo calixareno/ADN.

La **fig.3** muestra la variación que experimenta la intensidad de emisión del calixareno, medida a 318nm, a distintas relaciones molares [calixareno]/[ADN].

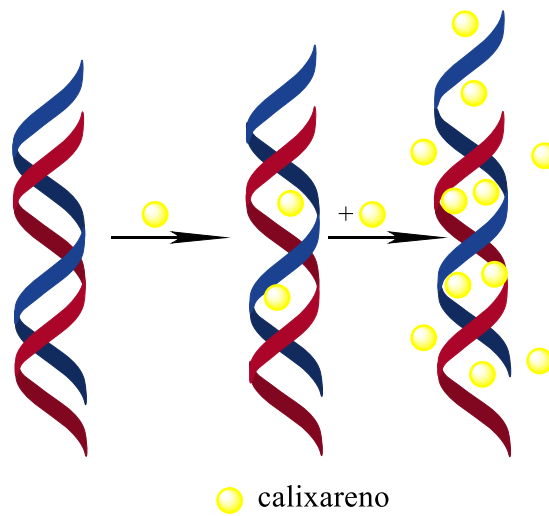
Se observan dos tendencias contrarias. A valores pequeños de X, tiene lugar una disminución de la intensidad de emisión. A partir de un determinado valor de X, aproximadamente  $X=5 \times 10^{-3}$ , la intensidad de emisión comienza a aumentar hasta alcanzar un valor aproximadamente constante.

La intensidad del calixareno disminuye, en un principio, al añadir ADN al medio. La emisión del calixareno estudiada es debida a la excitación de los dos grupos aromáticos policíclicos (fluorenos) que posee. Estos grupos son planos, por lo que es posible que se intercalen entre los pares de bases del polinucleótido. Este hecho puede provocar una disminución de emisión de los mismos al cambiar las características del medio en el que se encuentran los fluorenos. Sin embargo, al aumentar el valor de X, la intensidad de emisión vuelve a aumentar. Esto puede ser debido al hecho de que se forman dímeros de calixareno (ver **fig.4**) al aumentar su concentración en el medio. La formación de dímeros del calixareno usado en este trabajo había sido previamente observado por otros autores (Supian et al. 2010). Por otro lado, este comportamiento también se podría explicar si asumimos que la adición de más calixareno al medio provoca la interacción de estas moléculas con las de calixarenos que en un principio se encontraban intercaladas en el ADN.





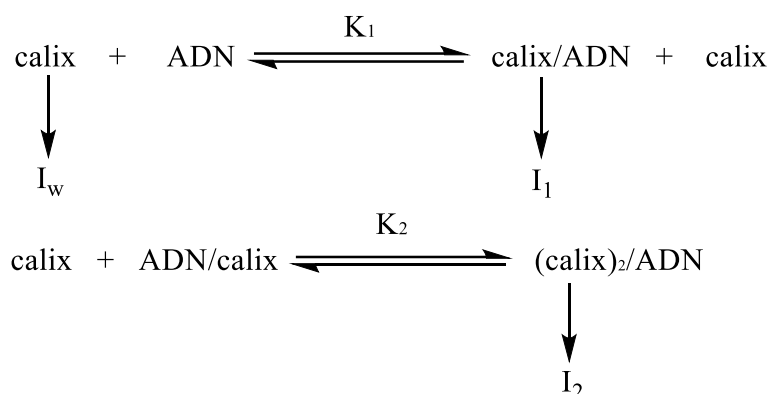
**Figura 3.** Intensidad de emisión de la solución calixareno/ADN a distintos valores de X.



**Figura 4.** Comportamiento del ADN en presencia del calixareno.

Para comprobar este hecho, se ha representado la intensidad de emisión relativa del calixareno, a concentración de calixareno fija, frente a la concentración de ADN (ver **fig 5**). Los resultados muestran dos tendencias bien diferenciadas.

Un sistema de este tipo se podría describir mediante el uso del modelo de dos estados:



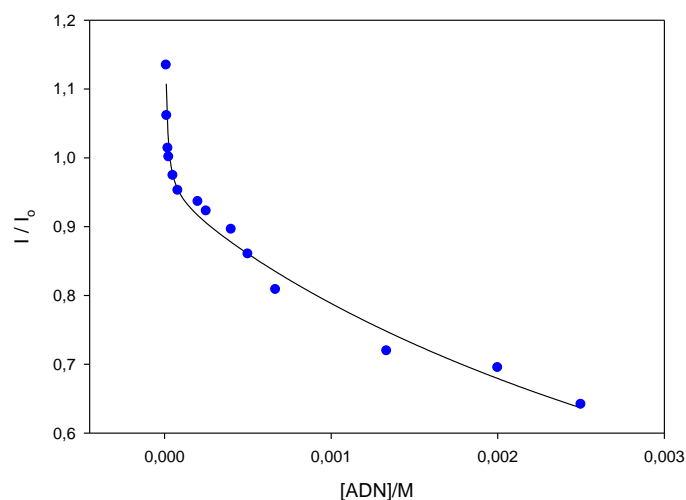
En el que se pueden encontrar distintos tipos de calixarenos, los cuales emiten de maneras distintas.

Para un sistema de este tipo, se puede deducir la siguiente expresión, en la que se incluye la variación que experimenta la intensidad total del sistema en función de la concentración de polinucleótido:

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\left(\frac{I}{I_0}\right)_w + K_1\left(\frac{I}{I_0}\right)_1 K_2 [\text{ADN}] + K_1 K_2 \left(\frac{I}{I_0}\right)_2}{1 + K_1 [\text{ADN}] + K_1 K_2 [\text{ADN}]^2} \quad (1)$$

Se llevó a cabo un ajuste multiparamétrico a partir del cual se obtuvieron las constantes de equilibrio  $K_1$  y  $K_2$ . Los valores obtenidos fueron:  $K_1 = 2.8 \times 10^{-5} \text{M}^{-1}$ , y  $K_2 = 219 \text{M}^{-1}$ .

Estos valores se han obtenido del ajuste (ver **figura 4**) a la ecuación de pseudofase cuadrática (ver esta ecuación 1). La gráfica corresponde al mejor ajuste haciendo una ecuación bicuadrática de pseudofase:



**Figura 4.** Representación de las diferentes intensidades según la concentración de ADN. Los puntos representan los valores experimentales y la línea el mejor ajuste obtenido haciendo uso de la ecuación 1.

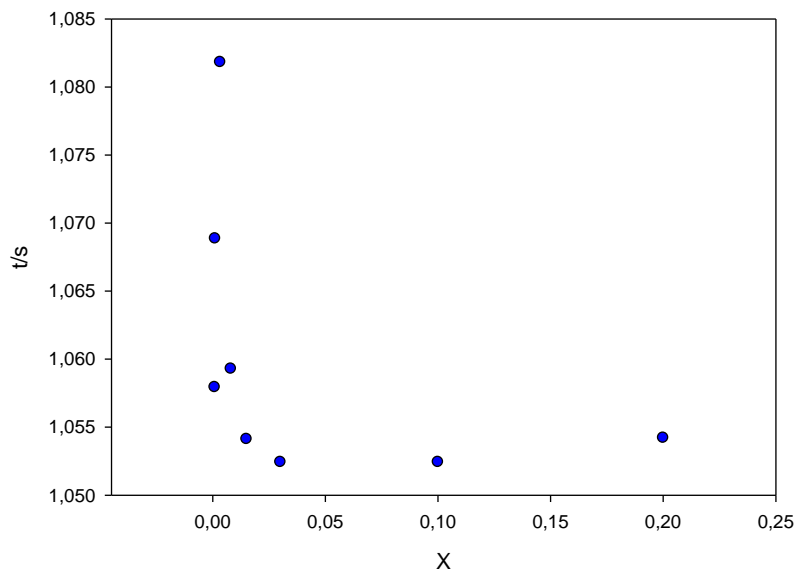
## 5.2 Medidas de viscosidad

A partir de medidas de viscosidad se puede obtener información acerca del tipo de interacción que puede darse entre un ligando y receptor. Así, un proceso de intercalación provoca un aumento de la viscosidad, debido al incremento de la anchura del ADN. Por el contrario, la unión de un ligando en los surcos del ADN induce una constancia o disminución de este parámetro (Beccia et al. 2012; Grueso et al. 2012; Suh and Chaires 1995). El incremento de la viscosidad podría también observarse si tiene lugar una separación de las hebras.

Según los resultados de la **fig.5**, se observan de nuevo dos tendencias contrarias. Además, el cambio ocurre a valores de X muy cercanos a los de la fluorescencia. La viscosidad aumenta cuando se añaden pequeñas cantidades de calixareno a la disolución de ADN, hasta un máximo que se alcanza a valores próximos a  $X=3.33 \times 10^{-3}$ . Este aumento de viscosidad en los resultados indica, por tanto, que la interacción del calixareno con el ADN tiene lugar según un proceso de intercalación de los grupos aromáticos planos de fluoreno entre los pares de bases

nitrogenadas del polinucleótido. La interacción del ADN con este calixareno es fuerte ya que a concentraciones muy pequeñas presenta grandes cambios.

A partir de ese valor de X ( $3.33 \times 10^{-3}$ ) la viscosidad pasa a ser constante si se sigue aumentando la concentración de calixareno. Este comportamiento sugiere que tiene lugar una estabilización del sistema debido a que, a altas concentraciones del macrociclo, estos forman dímeros, hasta llegar a formar agregados si la concentración sigue aumentando. Un comportamiento de este tipo debilita la interacción calixareno/ADN. En este caso, el polinucleótido adoptaría una nueva conformación más similar a la correspondiente a su situación original, y de ahí esta constancia.



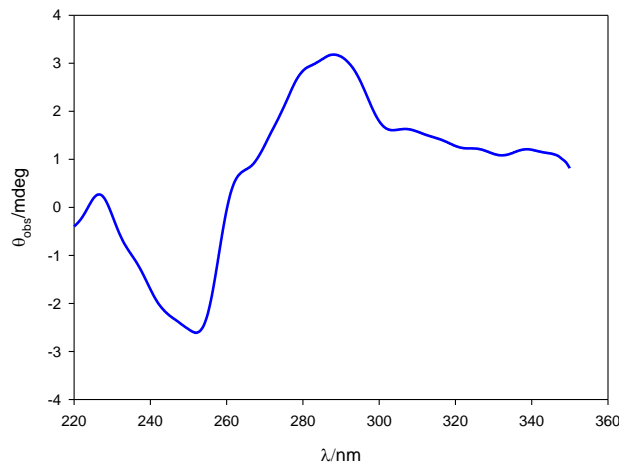
**Figura 5.** Variación de la viscosidad en función del valor de X. Corresponde a un aumento de los datos obtenidos

Para confirmar si estos resultados son debido a que ocurre un cambio conformacional en la estructura del ADN, pasamos a realizar medidas de dicroísmo circular.

### 5.3 Espectros de Dicroísmo Circular (DC)

Se trata de una técnica usada para monitorizar los cambios estructurales en la conformación del ADN.

En la **fig.6** se observa el aspecto que presenta el espectro de ADN en su conformación B, que muestra las características del espectro de DC en la región UV (220-320nm). La banda negativa está relacionada con el giro de la estructura, apareciendo un pico a aproximadamente 248nm. La banda positiva representa el apilamiento de los pares bases, apareciendo un pico a aproximadamente una longitud de onda igual a 280nm. Estas bandas se deben a las interacciones  $\pi$ -stacking entre las bases y a la estructura helicoidal del polinucleótido que proporciona un ambiente asimétrico para las bases (Neidle 2002)



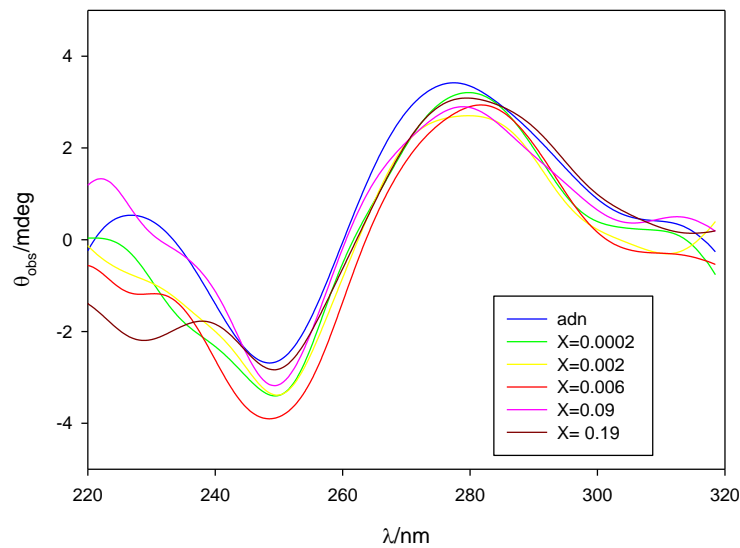
**Figura 6.** Espectro de ADN ( $5 \times 10^{-5} M$ ) de dicroísmo circular

En la **fig.7** vemos cómo las alteraciones estructurales del ADN causadas por las interacciones del calixareno pueden cambiar su espectro de DC. Se observa un primer descenso, o disminución de la elipticidad, del espectro de ADN cuando se añade pequeñas cantidades de calixareno al medio. Esta variación puede deberse a que ocurre una compactación parcial del polinucleótido, es decir, al interaccionar el calixareno mediante intercalación con el ADN éste sufre un cambio en su conformación quizás envolviendo al calixareno. Se habla de una compactación

parcial y no total ya que no desaparece en ningún momento ninguna de las dos bandas características del espectro del polinucleótido.

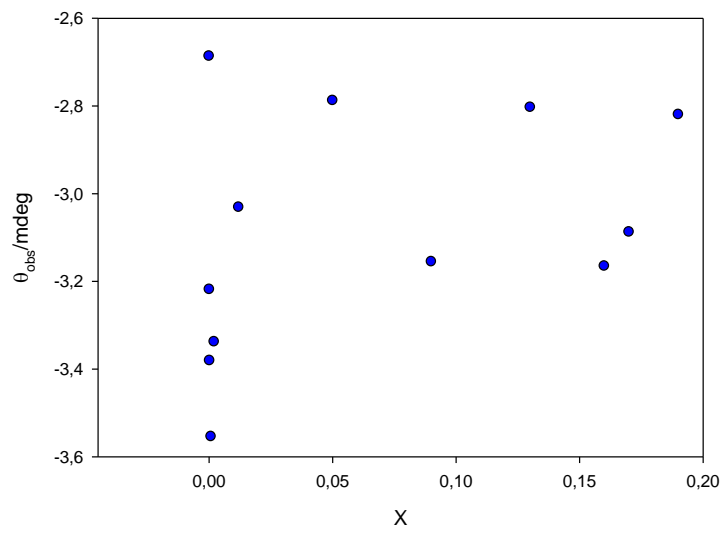
Además, se observa cómo a pequeñas concentraciones de calixareno la banda:

- Se desplaza hacia la derecha, hacia longitudes de onda más altas. Este comportamiento indica la separación de la doble hebra del polinucleótido, es decir, el ADN sufre una desnaturalización parcial.

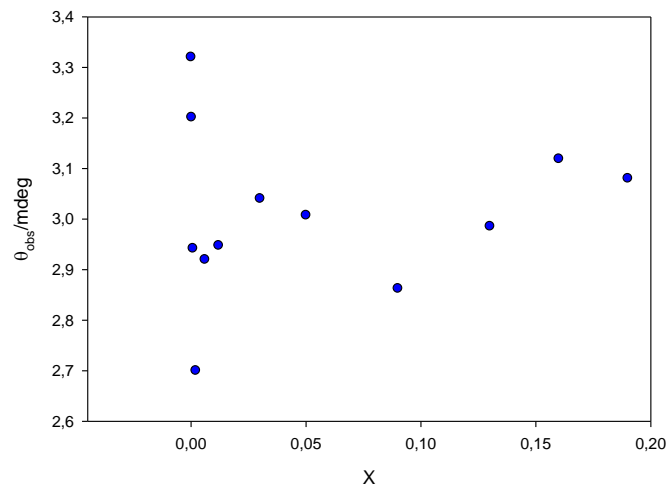


**Figura 7.** Espectro de dicroísmo circular a distintos valores de X.

Para ver estos cambios más detalladamente, puede verse en la **fig.8** los cambios del pico de la banda negativa según varía el valor de X, donde se aprecia primero una disminución, y después un cambio de tendencia, volviendo a recuperar un valor de elipticidad parecido al inicial que se mantiene constante. En la **fig.9** se recogen los valores de elipticidad de la banda positiva al variar X, donde también se aprecian una disminución y un posterior aumento del valor de elipticidad hasta quedar constante (en este caso el valor de la elipticidad en la constancia difiere del valor que presente el ADN sin calixareno).



**Figura 8.** Variación de a 248nm a distintos valores de X

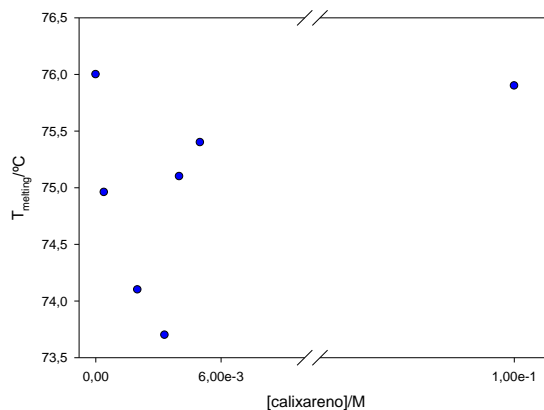


**Figura 9.** Variación de la banda positiva a 280nm a distintos valores de X

## 5.5 Medidas de melting

El estudio de la desnaturalización de las disoluciones de ADN a través de la adición de calor, ofrece información sobre cambios conformacionales en el polinucleótido, así como información sobre la fuerza y el carácter de la interacción ADN/ligando (calixareno en este caso).

La temperatura melting se determinó como el promedio de las temperaturas iniciales y finales del proceso de desnaturalización. Se observó una disminución de la temperatura de melting al aumentar la cantidad de calixareno en el medio y, a partir de un determinado valor del parámetro X, se obtuvo un aumento de dicho valor de temperatura (ver **fig.10**). Se observan de nuevo dos tendencias diferentes: una primera disminución de  $T_m$  al aumentar el valor de la relación molar X de 0 a  $3.30 \times 10^{-3}$ , lo que implica una rotura de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases que lleva a la desestabilización de la doble hebra. Esto facilita la compactación del ADN ya que las interacciones hidrófobas están más favorecidas en el caso de una sola hebra. La mayor compactación que sufre el ADN coincide con el punto más bajo de la gráfica. La segunda tendencia es un aumento posterior para mayores proporciones de  $[\text{calixareno}]/[\text{ADN}]$ , que como sucedía con las medidas de viscosidad. Este aumento observado a partir de un determinado valor de  $[\text{calixareno}]$ , el cual corresponde a un valor de X de aproximadamente  $3.30 \times 10^{-3}$ , se relaciona con un fenómeno de estabilización del ADN debido, quizás, a la formación de dímeros (o agregados en general) entre las distintas moléculas de calixareno.



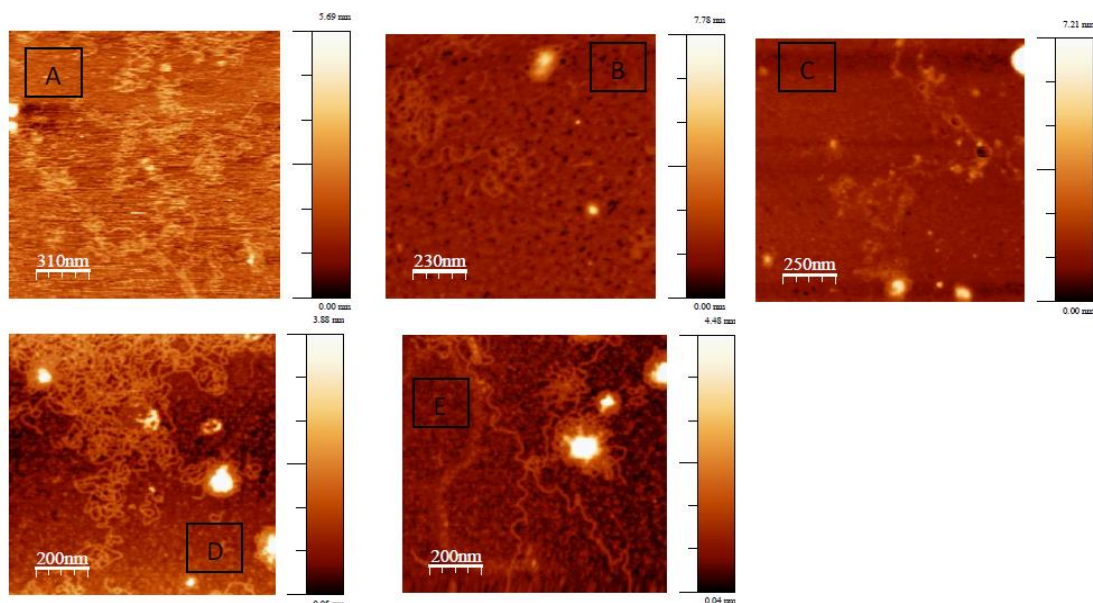
**Figura 10.** Variación de temperatura melting en función de la concentración de calixareno.



## 5.6 AFM

Se han realizado fotografías de muestras de ADN en ausencia y presencia de distintas cantidades de calixareno. En la **Fig.11** (A) se observa la estructura alargada del polinucleótido. Conforme se añade más cantidad de calixareno se observa un cambio estructural del ADN correspondiente a una disminución en el alargamiento de la estructura, esto es, a una compactación parcial del mismo (ver imagen B). A partir de una relación  $X=3 \times 10^{-3}$  (ver imagen C) se observa de nuevo un alargamiento del ácido nucleico, además de un acercamiento entre las hebras del mismo. El ADN no muestra la misma dispersión que la que presentaba cuando se encontraba desnudo, es decir, en ausencia de calixareno (ver imagen A). Este comportamiento puede deberse a la tendencia que presenta el calixareno a formar dímeros, ... (en definitiva, estructuras de autoensamblaje), entre ellas debido a la existencia de interacciones de tipo  $\pi$ -stacking entre los anillos aromáticos que conforman la estructura, como se muestra en la imagen E. La interacción entre las moléculas de calixareno que se encuentran intercaladas en las distintas hebras de polinucleótido provoca el acercamiento de éstas, disminuyendo la dispersión de las mismas. En la **fig. 4** se muestra un ejemplo de cómo sería este comportamiento.

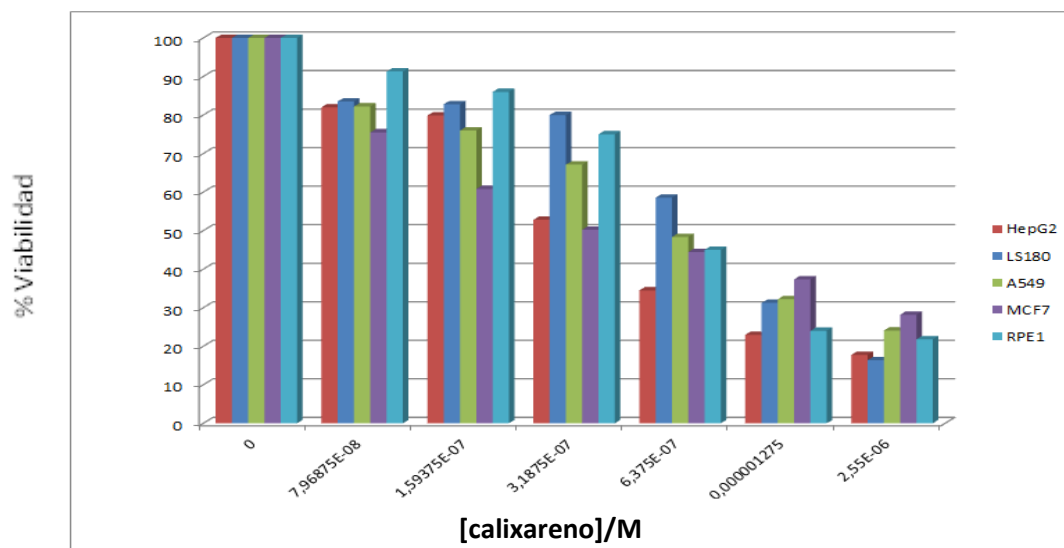
Estos resultados confirman los obtenidos a partir del uso de otras técnicas.



**Figura 11.** Imágenes de AFM de ADN desnudo (A) y del sistema calixareno/ADN (B-E) a distintos valores de la relación molar X (B:  $X=8 \times 10^{-4}$ ; C:  $X=3 \times 10^{-3}$ ; D y E:  $X=1 \times 10^{-2}$ ).

## 5.7 Citotoxicidad

Los resultados (ver **fig. 12**) demuestran que el calixareno utilizado en este trabajo es citotóxico. No se observó grandes diferencias entre las distintas líneas utilizadas, quizás una mayor toxicidad en el caso de la línea HepG2 que se iguala a las concentraciones más elevadas.



**Figura 12:** Medidas de citotoxicidad del calixareno a distintas concentraciones y distintas líneas celulares.

## **6. CONCLUSIONES**

- A través de medidas de fluorescencia vemos que la forma de interaccionar del calixareno a concentraciones bajas con el ADN consiste en una intercalación entre los pares de bases. Si la concentración de calixareno sigue aumentando este formará dímeros con los calixarenos que se intercalaron inicialmente.
- A partir de medidas de viscosidad, se reafirma la existencia de un proceso de intercalación del calixareno en el ADN a pequeñas concentraciones de calixareno, además, sugiere que ocurre un cambio conformacional a cantidades mayores de calixareno debido a la agregación de éstos.
- A partir de las medidas de dicroísmo circular se comprueba que el ADN no pierde su estructura secundaria por completo. No ocurre una compactación total del polinucleótido, sino un cambio parcial en su conformación, en la que disminuye la elipticidad y el apilamiento de los pares de bases.
- La disminución que aparece en las medidas de temperatura melting del ADN, en presencia de pequeñas cantidades de calixareno, está relacionado con la rotura de los puentes de hidrógenos que hay entre los pares de bases que estas interacciones provocan, lo que lleva a la separación de la doble hebra y, al igual que los resultados obtenidos a partir de medidas de viscosidad, la formación de agregados de calixareno cuando la concentración de estos aumenta vuelve a estabilizar el sistema.
- A partir de AFM se confirman los cambios conformacionales que sufre el ADN en presencia de distintas concentraciones de calixareno, pasando ésta de una compactación parcial, a un alargamiento y acercamiento de las hebras.
- En bases a los datos de citotoxicidad obtenidos se puede decir que este calixareno quizás no sea idóneo para ser utilizado como nanotransportador de medicamentos tales como antibióticos. Sin embargo, quizás sí podría actuar como nanotransportador de sustancias anticancerígenas como doxorubicina, citarabina, paclitaxel, etc.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

-Aoyama Y. Macrocyclic Glycoclusters: From Amphiphiles through Nanoparticles to Glycoviruses. *Chem. - A Eur. J.* [Internet]. WILEY-VCH Verlag; 2004 Feb 6 [cited 2017 Jun 15];10(3):588–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/chem.200305288>

-Baldini L, Casnati A, Sansone F, Ungaro R. Calixarene-based multivalent ligands. *Chem. Soc. Rev.* [Internet]. 2007;36(2):254–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/B603082N>

-Beccia MR, Biver T, Pardini A, Spinelli J, Secco F, Venturini M, et al. The Fluorophore 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) Induces DNA Folding in Long Double-Stranded DNA. *Chem. - An Asian J.* [Internet]. 2012 Aug [cited 2017 Jun 16];7(8):1803–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22615219>

-Caracciolo G, Callipo L, De Sanctis SC, Cavaliere C, Pozzi D, Laganà A. Surface adsorption of protein corona controls the cell internalization mechanism of DC-Chol–DOPE/DNA lipoplexes in serum. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* [Internet]. 2010 Mar [cited 2017 May 30];1798(3):536–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917267>

-Di Cola E, Grillo I, Ristori S. Small Angle X-ray and Neutron Scattering: Powerful Tools for Studying the Structure of Drug-Loaded Liposomes. *Pharmaceutics* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2016 Mar 28 [cited 2017 May 30];8(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27043614>

-Dias RS, Magno LM, Valente AJM, Das D, Das PK, Maiti S, et al. Interaction between DNA and Cationic Surfactants: Effect of DNA Conformation and Surfactant Headgroup ? *J. Phys. Chem. B* [Internet]. American Chemical Society; 2008 Nov 20 [cited 2017 Jun 13];112(46):14446–52. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp8027935>

-Dominska M, Dykxhoorn DM. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J. Cell Sci.* [Internet]. 2010 [cited 2017 May 18];123(8). Available from: <http://jcs.biologists.org/content/123/8/1183.short>

- Esmailzadeh Gharehdaghi E, Amani A, Khoshayand MR, Banan M, Esmailzadeh Gharehdaghi E, Amini MA, et al. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimization of processing/formulation parameters. *Nucleic Acid Ther.* [Internet]. Mary Ann Liebert, Inc.; 2014 Dec [cited 2017 May 29];24(6):420–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25272198>
- Gallego-Yerga L, Lomazzi M, Franceschi V, Sansone F, Ortiz Mellet C, Donofrio G, et al. Cyclodextrin- and calixarene-based polycationic amphiphiles as gene delivery systems: a structure-activity relationship study. *Org. Biomol. Chem.* [Internet]. Royal Society of Chemistry; 2015;13(6):1708–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4OB02204A>
- Grueso E, Cerrillos C, Hidalgo J, Lopez-Cornejo P. Compaction and Decompaction of DNA Induced by the Cationic Surfactant CTAB. *Langmuir* [Internet]. American Chemical Society; 2012 Jul 31 [cited 2017 Jun 16];28(30):10968–79. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la302373m>
- Hirko A, Tang F, Hughes JA. Cationic lipid vectors for plasmid DNA delivery. *Curr. Med. Chem.* [Internet]. 2003 Jul [cited 2017 May 29];10(14):1185–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678793>
- Junquera E, Aicart E. Cationic lipids as transfecting agents of DNA in gene therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* [Internet]. 2014 Mar [cited 2017 May 18];14(5):649–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24444161>
- Li S-D, Huang L. Non-viral is superior to viral gene delivery. *J. Control. Release* [Internet]. 2007 Nov 20 [cited 2017 Jun 11];123(3):181–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17935817>
- Lindman B, Dias R. DNA interactions with polymers and surfactants. Wiley-Interscience; 2008a.
- Lindman B, Dias R. DNA interactions with polymers and surfactants. Wiley-Interscience; 2008b.
- Martínez A, Bienvenu C, Jiménez Blanco JL, Vierling P, Mellet CO, García Fernández JM, et al. Amphiphilic Oligoethyleneimine??-Cyclodextrin ?Click? Clusters for Enhanced

DNA Delivery. *J. Org. Chem.* [Internet]. 2013 Aug 16 [cited 2017 Jun 16];78(16):8143–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23859761>

-Martin B, Sainlos M, Aissaoui A, Oudrhiri N, Hauchecorne M, Vigneron J-P, et al. The design of cationic lipids for gene delivery. *Curr. Pharm. Des.* [Internet]. 2005 [cited 2017 May 29];11(3):375–94. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15723632>

-Mcmahon G, Malley SO, Nolan K, Diamond D. Important calixarene derivatives – their synthesis and applications. *Arkivoc* [Internet]. 2003;2003(7):23. Available from:

<http://hdl.handle.net/2027/spo.5550190.0004.704>

-Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chem. Rev.* [Internet].

American Chemical Society; 2009 Feb 11 [cited 2017 May 18];109(2):259–302.

Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr800409e>

-Muñoz-Úbeda M, Misra SK, Barrán-Berdón AL, Datta S, Aicart-Ramos C, Castro-Hartmann P, et al. How Does the Spacer Length of Cationic Gemini Lipids Influence the Lipoplex Formation with Plasmid DNA? Physicochemical and Biochemical

Characterizations and their Relevance in Gene Therapy. *Biomacromolecules* [Internet]. American Chemical Society; 2012 Dec 10 [cited 2017 May 30];13(12):3926–37.

Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm301066w>

-Nayak S, Herzog RW. Progress and prospects: immune responses to viral vectors.

*Gene Ther.* [Internet]. 2010 Mar 12 [cited 2017 May 30];17(3):295–304. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19907498>

-Neidle S. Nucleic acid structure and recognition [Internet]. Oxford University Press;

2002 [cited 2017 Jun 12]. Available from:

[https://books.google.es/books/about/Nucleic\\_Acid\\_Structure\\_and\\_Recognition.html?id=xu2nCZV5UCYC&redir\\_esc=y](https://books.google.es/books/about/Nucleic_Acid_Structure_and_Recognition.html?id=xu2nCZV5UCYC&redir_esc=y)

-Ortiz Mellet C, Benito JM, García Fernández JM. Preorganized, Macromolecular, Gene-Delivery Systems. *Chem. - A Eur. J.* [Internet]. 2010 May 28 [cited 2017 May

31];16(23):6728–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/chem.201000076>

-Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Benito JM. Cyclodextrin-based gene delivery

systems. Chem. Soc. Rev. [Internet]. 2011 Mar [cited 2017 May 29];40(3):1586–608.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042619>

-Ostos FJ, Lebron JA, Moy ML, Deasy M, Lopez-Cornejo P. Binding of DNA by a dinitro-diester calix[4]arene: Denaturation and condensation of DNA. Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;127:65–72. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.019>

-Peters MS, Schrader T. Calix[n]arenes and Nucleic Acids. Calixarenes and Beyond [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016a [cited 2017 Jun 12]. p. 627–69. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-31867-7\\_24](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-31867-7_24)

-Peters MS, Schrader T. Calixarenes and Beyond [Internet]. 2016b. Available from:

<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-31867-7>

-Rodik R V, Boyko VI, Kalchenko VI. Calixarenes in bio-medical researches. Curr. Med. Chem. [Internet]. 2009 [cited 2017 Jun 12];16(13):1630–55. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442137>

-Safinya CR. Structures of lipid–DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. Curr. Opin. Struct. Biol. [Internet]. 2001 [cited 2017 May 29];11(4):440–8.

Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X0000230X>

-De Smedt SC, Demeester J, Hennink WE. Cationic polymer based gene delivery systems. Pharm. Res. [Internet]. 2000 Feb [cited 2017 May 29];17(2):113–26. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751024>

-Srinivas R, Samanta S, Chaudhuri A. Cationic amphiphiles: promising carriers of genetic materials in gene therapy. Chem. Soc. Rev. [Internet]. 2009 Dec [cited 2017

May 18];38(12):3326. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20449052>

-Suh D, Chaires JB. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. Bioorg. Med. Chem. [Internet]. 1995 Jun [cited 2017 Jun 12];3(6):723–8. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7582950>

-Supian FL, Richardson TH, Deasy M, Kelleher F, Ward JP, McKee V. Interaction between Langmuir and Langmuir-Blodgett Films of Two Calix[4]arenes with Aqueous Copper and Lithium Ions. *Langmuir* [Internet]. 2010 Jul 6 [cited 2017 Jun 14];26(13):10906–12. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la100808r>

-Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* [Internet]. 2003 May [cited 2017 May 18];4(5):346–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728277>

Editorial Board. *J. Control. Release.* 2006;116(2).