

Departamento de Química Física
Facultad de Química
Universidad de Sevilla



**USO DE COMPUESTOS MACROCÍCLICOS
DERIVADOS DE CALIXARENOS COMO
NANOTRANSPORTADORES DE FÁRMACOS**

Memoria del trabajo realizado por
Francisco José Ostos Marcos
para optar al título de Doctor con mención Internacional por
la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2020

TESIS DOCTORAL
EN QUÍMICA

Fdo. Francisco José Ostos Marcos

M^a Luisa Moyá Morán y M^a del Pilar López Cornejo

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Física de la Universidad de Sevilla.

Fdo. M^a Luisa Moyá Morán
Catedrática de Química
Física
Universidad de Sevilla

Fdo. M^a del Pilar López
Cornejo
Catedrática de Química Física
Universidad de Sevilla

Jaime Oviedo López, Profesor Titular y Director del Departamento de Química Física de la Universidad de Sevilla,

Que la tesis doctoral titulada **“Uso de compuestos macrocíclicos derivados de calixarenos como nanotransportadores de fármacos”**, presentada por D. Francisco José Ostos Marcos para la obtención del grado de Doctor con mención Internacional por la Universidad de Sevilla, se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Física de dicha Universidad, bajo la dirección de las profesoras Dña. M^a Luisa Moyá Morán y Dña. M^a del Pilar López Cornejo.

Sevilla, de enero de 2020

Fdo. Jaime Oviedo López

*Lo importante en ciencia no es tanto obtener nuevos hechos
como descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos*

William Lawrence Bragg

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

En estos cuatro años me han acompañado muchas personas en la realización de la tesis. Con estas personas he vivido experiencias científicas que me han hecho crecer intelectualmente. Pero, no menos importante son las experiencias personales que en algunos casos han forjado una verdadera amistad.

Inicialmente, quiero agradecer a una de mis directoras y tutora de tesis Dña. Pilar López Cornejo, la cual me acogió en su grupo cuando aún estaba realizando el Grado en Química. Ella me enseñó a razonar con rigor los resultados científicos así como no desanimarse ante la obtención de resultados negativos. No solo ha sido una relación estrictamente profesional, sino que también ha estado ahí en todos los aspectos. Además, fue quién me presentó a mi otra directora Dña. María Luisa Moyá Morán, con la cual he mantenido una estupenda relación tanto científica como personal y como Pilar, me mostró su apoyo desde el principio. Ambas fueron doctorandas de D. Francisco Sánchez Burgos, una persona bastante brillante y exigente y con el que mantuve conversaciones científicas que invitaban a reflexionar. Además, quiero agradecer a la Universidad de Sevilla (V Plan Propio) por financiar la realización de esta tesis.

Durante este tiempo, he conocido a otras personas que me mostraron su apoyo desde el principio. En primer lugar, me gustaría agradecer a José Antonio Lebrón, quién ha sido mi compañero de laboratorio y considero como un verdadero amigo. Él siempre ha estado presente cuando he necesitado ayuda en cualquier aspecto, así como también hemos compartido buenos momentos con otros compañeros del departamento. Uno de ellos es José María Camerero con el que he compartido congresos e interesantes discusiones científicas. Además, ha sido compañero del mismo laboratorio. Ambos conocen a Carlos Sales

(Harry), quién siempre me ha ayudado cada vez que ha podido sin ningún problema.

Sin embargo, he conocido un listado interminable de personas que me ha acompañado de alguna u otra forma en esta experiencia, entre ellos, se encuentran Inmaculada Escudero, María Jesús Almazán, Sara Nieto, Amparo Clavero, Ana Muñoz, Julia Álvarez, Javier Amaya, José Plata, Elia Grueso, Oliver Kardell, Vanesa Camacho, Aila Jiménez, Rosa Giráldez y Eva Bernal.

También, me gustaría dar las gracias a Manuel Pineda y Francisca Fernández, los cuales forman parte del personal de administración del Departamento de Química Física.

Finalmente, y no menos importante se lo dedico a mis padres, quiénes siempre han aguantado esos momentos en los cuales me sentía frustrado. Pero, no sólo han estado en esos momentos sino también en aquellos que han resultado gratificantes. Porque este día ha llegado gracias a su ayuda incondicional y siempre serán personas fundamentales en mi vida. Asimismo, a mi tío, mi abuelo y mi abuela por parte materna, los quiero muchísimo porque siempre han estado ahí también. Por todos ellos y por mí, nunca dejaré de luchar por mis sueños.

Glosario de símbolos y abreviaturas	i
Abstract	v
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Vectores Virales	2
1.2 Vectores no virales	4
1.3 Terapia Génica	9
1.4 Información genética	12
1.4.1 ADN	13
1.5 Proceso de compactación	18
1.5.1 Control del proceso de compactación/decompactación del ADN mediante parámetros fisicoquímicos	20
1.5.2 Compactación: tamaño, forma y estabilidad	22
1.6 Moléculas anfifílicas	24
1.7 Fenómenos de agregación de moléculas anfifílicas	31
1.8 Liposomas	36
1.8.1 Métodos de preparación de liposomas	38
1.9 Transporte de material genético mediante el uso de monómeros y agregados de moléculas anfifílicas	41
1.9.1 Interacciones de los monómeros de tensioactivo con ADN	42
1.9.2 Interacciones de micelas constituidas por tensioactivos con ADN	45

1.9.3 Interacciones de liposomas constituidos por tensioactivos con ADN	46
1.10 Nanotransportadores como vehículos en la liberación de fármacos	50
1.11 Objetivos	51
1.12 Referencias bibliográficas	52
Capítulo 2. Materiales y métodos	65
2.1 Materiales	65
2.2 Métodos	84
2.3 Referencias bibliográficas	105
Capítulo 3. Calix[4]arenos-schiff neutros. Interacción con ADN	111
3.1 Parte experimental	116
3.2 Resultados y discusión	120
3.3 Conclusiones	146
3.4 Referencias bibliográficas	147
Capítulo 4. P-sulfonatocalix[6]areno. Interacción con ADN y uso como nanotransportador de doxorubicina	155
4.1 Parte experimental	160
4.2 Resultados y discusión	163
4.3 Conclusiones	191

4.4 Referencias bibliográficas	192
Capítulo 5. Calix[4]arenos catiónicos anfífilicos. Síntesis, agregación y uso como nanotransportadores de material genético y doxorubicina	199
5.1 Parte experimental	203
5.2 Resultados y discusión	208
5.3 Conclusiones	237
5.4 Referencias bibliográficas	238
Capítulo 6. Liposomas de calix[4]arenos catiónicos anfífilicos. Interacción con ADN	247
6.1 Parte experimental	252
6.2 Resultados y discusión	260
6.3 Conclusiones	279
6.4 Referencias bibliográficas	280
Conclusions	287
Publicaciones en revistas científicas	291

Glosario de símbolos y abreviaturas

(3-Aminopropil)trietoxisilano (APTES)

1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC)

1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE)

Ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico de sodio (ANS)

Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

Ácido hialurónico (HA)

Ácido Ribonucleico (ARN)

Adenosín difosfato (ADP)

Adenosín trifosfato (ATP)

Adenosina desaminasa (ADA)

Adenovirus (Ads)

Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA)

ADN de doble cadena (dsDNA)

ADN de una sola cadena (ssDNA)

ADN plásmídico (pADN)

Agencia Europea del Medicamento (EMA)

Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC)

Área transversal de la cabeza polar (a_0)

Bromuro de etidio (EtBr)

Calf thymus (ct-DNA)

Capa a capa (LbL)

Carga efectiva (Z_{eff})

Células adenocarcinómicas procedente de las zonas cervical y uterina (HeLa)

Células derivadas de ovario de hámster chino (CHO)

Concentración de Agregación Crítica (CAC)

Concentración Micelar Crítica (CMC)

Concentración Vesicular Crítica (CVC)

Dendrímeros de polidoamina (PAMAM)

Dicroísmo circular (DC)

Dispersión de rayos X de ángulo reducido (SAXS)

Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Doxorrubicina·HCl (DOX·HCl)

Eficiencia de encapsulación (EE)

Espectroscopía bidimensional rotatoria de efecto nuclear Overhauser (ROESY)

Fracción molar de lípido catiónico (α)

Fracción molar de lípido catiónico (α)

Interleucina-2 (IL-2)

Línea celular adenocarcinómica humana procedente del epitelio basal alveolar (A549)

Línea celular adenocarcinómica humana procedente del epitelio del colon (LS180)

Línea celular de cáncer de hígado humano (HepG2)

Línea celular de cáncer de pulmón humano (H358)

Línea celular humana retinal pigmentada del epitelio (RPE-1)

Línea de cáncer de mama humano (MCF7)

Linfocitos Infiltrantes T de Tumor (TIL)

Longitud de la cadena totalmente extendida (l_0)

Longitud de onda de emisión (λ_{em})

Longitud de onda de excitación (λ_{exc})

Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Nanotubos de carbono (CNTs)

Pares de base (bp)

Poliamidoamina (PAA)

Polidispersidad (PDI)

Poli(etilenglicol) (PEG)

Poli(etilenoimina) (PEI)

Potencial zeta (ζ)

Proteína verde fluorescente (GFP)

Relación de masas (L/D)

Resistencia a múltiples fármacos (MDR)

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Rigidez flexional (K)

Sal sódica del ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico (HEPES)

Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID)

Temperatura de fusión (T_m)

Velocímetro láser Doppler (LDV)

Vesículas multilamelares (MLV)

Vesículas multivesiculares (MVV)

Vesículas oligolamelares (OLV)

Vesículas unilamelares gigantes (GUV)

Vesículas unilamelares grandes (LUV)

Vesículas unilamelares pequeñas (SUV)

Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Virus del papiloma (SPV)

Voltametría cíclica (CV)

Volumen ocupado por la cadena hidrofóbica (V_0)

Abstract

Calixarenes are cyclic oligomers formed by phenol units linked by methylene bridges. These macrocycles have become essential platforms for molecular recognition, nanotechnology, drug delivery and catalysis due to their easy functionalization at either the upper and/or lower rim of the supramolecular framework.

The present doctoral thesis is focused on the ability of calixarenes as nanovehicles to transport genetic material and drugs. It is divided in six chapters. A general introduction which covers several topics related to the main goal of this work. Chapter 2 shows a broad description about the materials and methods used to study these systems. Chapters 3, 4, and 5 contains results about calixarenes of different charges and purposes. Finally, Chapter 6 examines the preparation of liposomes containing cationic calixarenes, and demonstrates their potential use in gene therapy.

In Chapter 3 a study of the interaction of two neutral calix[4]arenes with calf-thymus DNA (ct-DNA) is carried out using several techniques. Results show distinct changes in the DNA conformation depending on the X value ($X = [\text{calixarene}]/[\text{DNA}]$). Cytotoxicity assays indicate that it is crucial to control the structural design of these systems in relation to their biocompatibility. Chapter 4 studies the encapsulation of the antineoplastic antibiotic doxorubicin (DOX) by an anionic p-sulfocalix[6]arene. The ability of this calixarene to encapsulate the DOX molecules in its inner cavity as well as the capability of these molecules to bind to the DNA are examined. Cytotoxicity measurements show a decrease in the toxicity of the encapsulated DOX against several cell lines as compared to the free DOX. In Chapter 5 the self-aggregation of four amphiphilic cationic calix[4]arenes in aqueous solutions is investigated. The formation of micelles and vesicles is observed, depending on the concentration range of the calixarenes studied. The interactions between the calixarene

aggregates, micelles and vesicles, and the ct-DNA are analyzed. The results indicate that most of them interact with the polynucleotide, inverting its charge and condensing it, at least partially. In this Chapter, the encapsulation of doxorubicin into the calixarene aggregates and the subsequent release of this antibiotic are also investigated. The results demonstrate the potential of the calixarene micelles as nanocarriers in drug delivery.

Finally, in Chapter 6, liposomes containing the cationic amphiphilic calixarenes of the previous chapters are prepared. A study of the interactions between these liposomes and ct-DNA is carried out. The results show that an inversion of the polynucleotide charge takes place, although only a partial compaction of the DNA molecules occurs. Cytotoxicity assays confirm that these liposomes have a low and/or moderate toxicity against several cell lines. Therefore, some of them can be used as biocompatible nanovectors in gene therapy.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La Nanociencia es un término que hace referencia a la descripción del estudio de las propiedades de los materiales compuestos de “nanopartículas”, es decir, partículas con dimensiones del orden de 1 a 100 nanómetros. Estas propiedades de los materiales no sólo son debidas a las que les aportan sus constituyentes atómicos o moleculares, sino también al conjunto que conforman sus estructuras, y normalmente dependen del tamaño exacto de la nanopartícula. Con el deseo de hacer avanzar la ciencia y la tecnología surge el concepto de Nanotecnología que se define como una “revolución nano”, es decir, el desarrollo de tecnologías emergentes a partir de nuevos materiales nanoestructurados (ej. fullerenos), o propiedades electrónicas (ej. *quantum dots*), o nuevos tipos de arquitecturas basadas en nanodispositivos para su uso en computación, almacenamiento de información y transmisión. Debido a este interés creciente de la Nanotecnología en los laboratorios de todo el mundo y su aplicabilidad en el campo de la Medicina, nace la Nanomedicina que incluye un amplio rango de aplicaciones como pueden ser biosensores,

ingeniería de tejidos, dispositivos de diagnóstico y muchos otros. Todas estas disciplinas confluyen en un campo de estudio en continua expansión que se ocupa del diseño y preparación de nanovehículos, los cuales llevan a cabo el transporte y liberación exitosa de fármacos o genes. Cuando lo que se transporta es material genético se les suele llamar vectores, y cuando son fármacos se les llama nanotransportadores.

Los vectores se dividen en dos subgrupos: vectores virales y vectores no virales (o de origen sintético), de los que nos ocuparemos a continuación.

1.1 Vectores Virales

Los vectores virales fueron los primeros en ser utilizados por Stanfield Rogers y colaboradores¹ en el tratamiento de una deficiencia de la enzima arginasa en fibroblastos de un paciente humano, utilizando el virus del papiloma, descubierto por Shope² (SPV) y por Steven A. Rosenberg y colaboradores³ en la regresión de melanomas metastásicos con linfocitos infiltrantes T de tumor (TIL) e interleucina-2 (IL-2). Hoy en día, son considerados el medio más efectivo de transferencia de genes en la modificación de un tipo celular específico o tejido. Además, pueden ser manipulados para expresar genes terapéuticos, lo que se denominan virus recombinantes. Sin embargo, para ser empleados en terapia génica, que es el tratamiento de una enfermedad mediante la introducción de material genético en las células, es clave suprimir la parte viral crítica que asegure la imposibilidad de su replicación para que no pueda infectar a la célula y que, así, no genere patogenicidad. Además, deben poseer una baja toxicidad, estabilidad en sus genes, especificidad con respecto a un determinado tipo celular, fácil producción y eficiencia en la expresión génica. Una vez, se ha realizado la pertinente modificación del genoma del virus, se inserta el ácido nucleico con propiedades terapéuticas. Desgraciadamente, las modificaciones

de virus suelen ser bastante complejas y sólo se emplean sus variantes más simples: adenovirus⁴ (Ads), retrovirus⁵ (ej. γ -retrovirus y lentivirus), poxvirus⁶ (ej. vaccinia virus), virus adenoasociados,⁷ baculovirus,⁸ y el virus simple del herpes.⁹ Todos ellos han sido modificados con éxito para ser empleados como vectores en transfección.

El trabajo pionero en terapia génica *in vivo* fue realizado utilizando un retrovirus como vector, en concreto para el tratamiento de leucemia en roedores. La principal ventaja de los retrovirus es su capacidad para integrarse en el genoma del huésped y, por lo tanto, mantener la expresión del gen heterólogo durante períodos de tiempo prolongados. Sin embargo, su incapacidad para infectar células que no se dividen y, especialmente, efectos secundarios encontrados en ciertos ensayos del Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID),¹⁰ han restringido sus aplicaciones en este campo.

Aunque los lentivirus pertenezcan a la familia de los retrovirus, presentan unas características especiales. En contraste con los retrovirus convencionales, pueden infectar también células que no se dividen y, por lo tanto, se pueden aplicar para la expresión de células neuronales. En concreto, muchos de los lentivirus que se utilizan están basados en el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH),¹¹ ya que éste permite la inserción de fragmentos de genes de gran tamaño y proporciona una expresión a largo plazo a través de una integración a nivel cromosómico.

Sin embargo, los vectores virales utilizados actualmente en mayor proporción son los basados en adenovirus (20,5 % de los ensayos en 2017).¹² Éstos pueden llevar una mayor carga de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) que los retrovirus, pero esta capacidad aun siendo pequeña, permite la inserción de ciertos genes requeridos para determinadas aplicaciones en ensayos. Particularmente, los adenovirus con carácter oncológico se han convertido en una reveladora promesa en terapias de tratamiento del cáncer.¹³

Actualmente, se comercializan diferentes productos basados en vectores virales.¹² La administración del estado chino ha aceptado el uso de Gendicine para el tratamiento de células cancerosas de cabeza y cuello en 2003. En Europa, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobó en 2012 la comercialización de Glybera® para corregir deficiencias en la lipoproteína lipasa, así como Strimvelis™ en la adenosina desaminasa (ADA). Recientemente, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) ha autorizado el empleo de Kymriah™ y Yescarta™ en leucemia linfoblástica aguda y linfomas de células B y de Luxtuma™ en distrofias retinales. Algunos más se lanzarán al mercado en los próximos meses. Pero, debido principalmente a sus efectos secundarios, se persigue la búsqueda de vectores que sean más seguros, viables y éticos para su empleo en humanos.

1.2 Vectores no virales

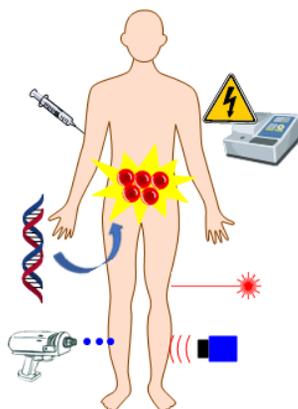
La fuerte respuesta inmunológica que ocasionan los vectores virales es uno de los inconvenientes que ha llevado a los científicos a buscar alternativas más seguras. Por tanto, los vectores no virales se convierten en una elección viable para el transporte de genes. Éstos son normalmente seguros, es decir, muestran una baja respuesta inmune. Además, pueden ser preparados fácilmente a bajo coste y en grandes cantidades. También pueden almacenar diferentes tipos de genes, incluso de gran tamaño, durante prolongados períodos de tiempo debido a su estabilidad. Desafortunadamente, su baja eficiencia de transfección¹⁴ impide su aplicación a mayor escala. Hay dos grupos de métodos para realizar el transporte de ADN sin utilizar vectores virales:

- **Métodos físicos** son aquellos donde el ADN es liberado en el lugar correspondiente sin utilizar ningún vector, sólo mediante

fuerzas de tipo físico que debiliten la membrana celular y en consecuencia, ésta sea más permeable a la transferencia de los genes.¹⁵

- **Métodos químicos**, se emplean cuando el polinucleótido es transportado al núcleo celular mediante un vector no viral, el cual ha sido preparado a través de reacciones de tipo químico.¹⁵

En la década de los ochenta, los métodos físicos se convirtieron en una alternativa a los vectores virales y métodos químicos (fosfato cálcico) para superar las barreras extra e intracelulares que limitan la cantidad de ADN que puede llegar a las células diana.¹⁶ El fundamento de la liberación de genes mediante este método se puede realizar con energía mecánica (bombardeo de partículas o biobalística),¹⁷ ultrasónica,¹⁸ eléctrica (electroporación),¹⁹ inyección hidrodinámica²⁰ (transferencia de genes a alta velocidad) o en forma de láser,²¹ con el fin de crear puntos de rotura temporales en la membrana de la célula diana, provocando daños o defectos transitorios en ésta y permitiendo al polinucleótido entrar en la célula por difusión (ver *Esquema 1.1*). Una de sus ventajas es la simplicidad con respecto a los métodos químicos o virales, permitiendo la entrada al citosol de fragmentos de gran tamaño de ácidos nucleicos, así como también de moléculas a las que las membranas no sean permeables. Además, son efectivos para una o varias células diana en una determinada zona de aplicación y conllevan pequeños riesgos en la dispersión de los agentes de transfección empleados. Sin embargo, es difícil el transporte de los genes al núcleo debido a los pequeños poros creados para pasar a través de la membrana y a la digestión enzimática del ADN o Ácido Ribonucleico (ARN) libre, lo que resulta en una baja eficiencia de transfección y limita sus aplicaciones clínicas. Por otro lado, provocan importantes daños a las células, dificultando su manipulación a una escala de mayor tamaño, protocolos laboriosos y es necesario emplear instrumental costoso.²²



Esquema 1.1. Métodos físicos empleados en terapia génica.

Con el objetivo de superar las desventajas que poseen los métodos físicos y virales, los vectores químicos se postulan como una alternativa prometedora. Estos vectores deben presentar tres características que mejoran el transporte de genes dentro del núcleo celular: neutralización de las cargas negativas del ADN, compactación del polinucleótido para reducir su tamaño y protección del ADN del ataque de las nucleasas intracelulares. Estos objetivos se pueden conseguir cuando el ADN es compactado mediante interacciones de tipo electrostático entre el propio polinucleótido, que se encuentra cargado negativamente, y policationes; o bien encapsulándolo en polímeros biodegradables o adsorbiéndolo en determinadas superficies.

Si la liberación del material genético se lleva a cabo mediante interacciones de tipo electrostático entre el ADN cargado negativamente y un polímero o lípido catiónico, se forma un complejo denominado poliplejo o lipoplejo, respectivamente. La formación de poliplejos se consigue a través de la unión de un polímero cargado positivamente a pH fisiológico y el polinucleótido, dando lugar a un complejo de tamaño nanométrico. En consecuencia, la disminución del tamaño de las moléculas de ADN facilita la

internalización celular y, por tanto, mejora la eficacia en la transfección.²³ Sin embargo, el empleo de poliplexos como sistemas en terapia génica *in vivo* debe salvaguardar ciertos obstáculos como la toxicidad, una baja eficiencia, la polidispersidad del polímero y el desconocimiento acerca de los mecanismos implicados en el transporte de genes mediante este tipo de métodos.²⁴ Actualmente, los investigadores han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de posibles soluciones a este tipo de dificultades, ya sea mediante el diseño de estructuras poliméricas monodispersas y biodegradables, capaces de disminuir la toxicidad del poliplexo, o profundizando en el entendimiento de los mecanismos que tienen lugar en la transfección utilizando estos sistemas.²⁵ Con esta idea en mente, se han utilizado diversos polímeros catiónicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, tales como poli-L-lisina,²⁶ polietilenimina (PEI),²⁷ poliamidoamina²⁷ (PAA), etc.

Por otro lado, es también de especial interés el estudio de los lipoplejos para el desarrollo de nuevos sistemas que mejoren el proceso de transfección. La formación de estas estructuras compactas se encuentra favorecida debido a las interacciones electroestáticas entre el lípido catiónico empleado y los grupos fosfatos presentes en los ácidos nucleicos. Por tanto, estos complejos son capaces de interactuar con las glicoproteínas y los proteoglicanos de la membrana celular, lo cual facilita la liberación de los ácidos nucleicos. Además, son capaces de superar el ataque de las nucleasas extra e intracelulares. Sin embargo, el mayor problema de este tipo de sistemas reside en su baja eficiencia y citotoxicidad que depende de la carga positiva del lipoplejo.²⁸

Centrando la atención en el campo de la Biomedicina, la encapsulación de moléculas activas, biomoléculas, en nanopartículas inorgánicas ha sido estudiada en profundidad con diversos propósitos. Como alternativa a la condensación de moléculas de ADN en presencia de policationes surge la encapsulación de éste mediante el empleo de nanopartículas formadas por un polímero biodegradable, permitiendo eliminar

algunos de los límites en las estrategias de compactación para la protección y liberación del ácido nucleico seguidas hasta ahora. Este método conduce a la formación de estructuras esféricas nanométricas. Entre sus múltiples ventajas destaca la facilidad de eliminación por parte del cuerpo debido a la biodegradabilidad del polímero usado, así como el control de la liberación de los ácidos nucleicos y su adecuada protección. Desgraciadamente, en su preparación se utilizan disolventes orgánicos, altas temperaturas, etc., que pueden destruir la información genética.²⁹ Además, presentan otras desventajas como una baja eficiencia en el proceso de encapsulación, la degradación del polímero en estas condiciones de trabajo y una liberación incompleta del ADN debido a su baja biodisponibilidad.³⁰ Teniendo esto en cuenta, se han buscado otros caminos alternativos para la transfección de material genético. Así, se ha encapsulado ADN y, posteriormente se han realizado experimentos *in vivo*, utilizando estructuras tales como micelas de copolímeros en bloque,³¹ emulsiones inversas,³² liposomas,³³ polímeros naturales ensamblados capa a capa (LbL),³⁴ nanopartículas orgánicas e inorgánicas, nanotubos de carbono (CNTs)³⁵ o nanopartículas basadas en silicio³⁶ o hierro³⁷ superparamagnético.

En las últimas décadas se han llevado a cabo estudios de transporte y liberación de ADN mediante el uso de micropartículas catiónicas, sintetizadas con polímeros y tensioactivos catiónicos, sobre las que se adsorbe el polinucleótido.³⁸ Los resultados han demostrado una mejora de la biodisponibilidad del ADN y un aumento sustancial de la eficiencia de encapsulación.³⁹ Desgraciadamente, las micropartículas se preparan en condiciones tales que el ADN adsorbido sufre un proceso de degradación enzimática, pese a la protección brindada por el polímero.⁴⁰

Actualmente, científicos de todo el mundo centran sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos vectores no vírales más seguros para ser usados con fines terapéuticos.

1.3 Terapia Génica

Entre los años 1970 y 1980, apareció una de las primeras técnicas que fue precursora con fines terapéuticos en humanos y permitía la subclonación de genes procedentes de células mamarias en bacteriófagos y plásmidos procariotas. Paralelamente, se llevaron a cabo investigaciones que utilizaban vectores retrovirales en aves y murinos (subfamilia de los roedores) con el fin de transferir genes en sus células mamarias. Sin embargo, los primeros ensayos de transferencia de genes en humanos se realizaron a finales de 1980, incluyendo el primer estudio de marcado genético de linfocitos T infiltrantes de tumor (TIL)⁴¹ y también de los linfocitos T de sangre periférica de pacientes con inmunodeficiencia combinada (SCID).⁴²

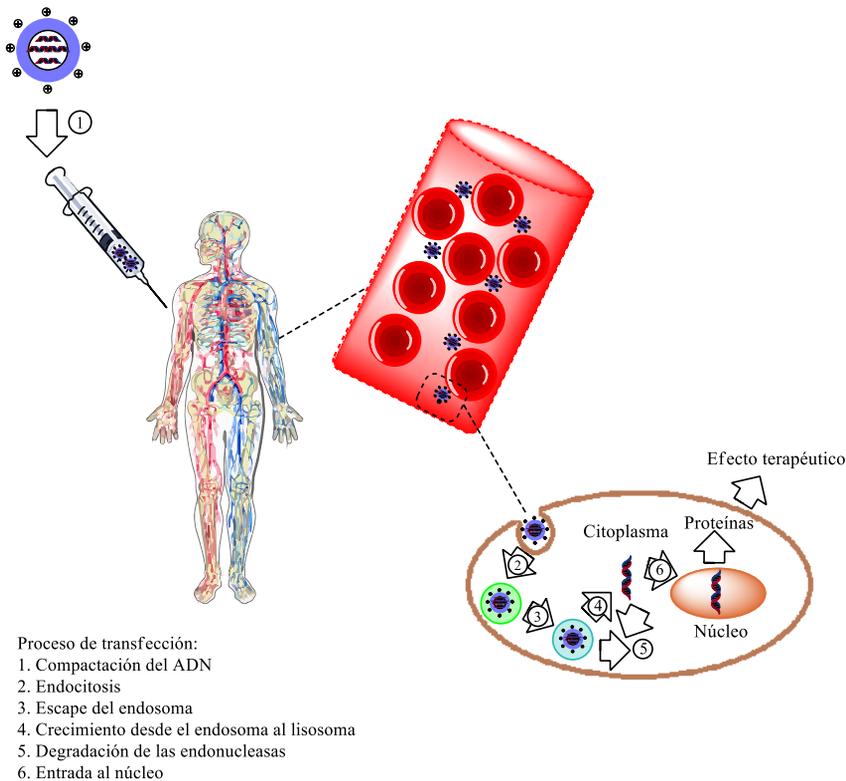
La terapia génica es simplemente un método basado en la introducción de un gen defectuoso o ausente dentro del núcleo celular. Una vez en el núcleo, tiene lugar su expresión mediante la maquinaria celular para producir las proteínas necesarias que lleguen a corregir las condiciones patológicas existentes. Uno de sus mayores problemas es introducir con éxito el material genético dentro del núcleo, es decir, que tenga lugar una eficiente transfección.

En este sentido, surge un creciente interés en el desarrollo de nuevas técnicas que permitan atravesar las membranas celulares y nucleares, ya que éstas son las barreras más importantes que deben superarse para conseguir una transfección eficaz. La modificación química o biológica, o el empaquetamiento del material genético, se presentan como las estrategias más prometedoras. Actualmente, el método más efectivo consiste en la utilización de virus modificados que incorporan el ADN terapéutico en su estructura, los cuales tienen la cualidad inmanente de actuar como llaves biológicas que permitan su paso a través de las membranas y, en consecuencia, llegar al núcleo. Sin embargo, debido a la limitada capacidad de carga, su respuesta autoinmune y las inquietudes que rodean sobre su seguridad, de las que se ha

hablado con anterioridad, se plantea una búsqueda de nuevos vectores como alternativas.

La liberación del ADN, también denominada transfección, es un proceso que consiste en varios pasos. Inicialmente, comienza con la compactación o condensación del polinucleótido para su posterior introducción en el sistema circulatorio y liberación en las células diana, seguido por la internalización celular mediada por endocitosis, liberación endosomática, transporte hacia el núcleo y una decompactación del complejo vector/ADN antes de producirse la traducción en células eucariotas y ejercer el efecto terapéutico deseado (ver *Esquema 1.2*).

El primer paso esencial en el mecanismo detallado anteriormente es la formación del complejo vector/ADN y la consecuente compactación del ácido nucleico. El ADN es un polielectrolito cargado negativamente, debido a la presencia de grupos fosfatos en sus cadenas. En consecuencia, será necesaria la presencia de un vector cargado positivamente, para que las interacciones de tipo electrostático favorezcan la formación del complejo (paso 1). Este paso será abordado en mayor profundidad en el apartado 1.5 de este manuscrito. Tras la compactación del polinucleótido, el complejo vector/ADN tiene que atravesar la membrana celular, que al igual que los ácidos nucleicos se encuentra cargada negativamente (paso 2). Esta primera barrera es selectiva, ya que las moléculas pueden entrar al interior de las células a través de distintos procesos. La endocitosis es un mecanismo clave por el cual las células incorporan partículas grandes o pequeñas, dando lugar a la invaginación de la membrana citoplasmática para formar una vesícula denominada endosoma, que acaba desprendiéndose de la membrana para incorporarse al citosol. Se ha constatado que las vías más importantes en el proceso de transfección mediante endocitosis son: i) endocitosis mediada por receptores, ii) endocitosis que no depende de receptores y iii) macropinocitosis.⁴³



Esquema 1.2. Representación simplificada de los pasos clave implicados en el proceso de transfección que conducen a la expresión de nuevas proteínas con fines terapéuticos.

La endocitosis mediada por receptor es también conocida como endocitosis constituida por vesículas de clatrina (proteína que forma el recubrimiento de las microcavidades de las membranas celulares donde se sitúan receptores de lipoproteínas).⁴³ La endocitosis que no depende de receptores se puede subdividir a su vez en endocitosis mediada por caveolinas (proteínas integrales de la membrana plasmática), endocitosis independiente de clatrin y endocitosis independiente de clatrin y caveolinas. Es de

especial relevancia conocer el mecanismo que regula el proceso de internalización en las células durante la liberación genética, ya que implica una mayor eficacia y esta, a su vez, depende de la composición del sistema utilizado para el transporte y/o su tamaño.

Una vez se han formado los endosomas con los ácidos nucleicos (vector/ADN) en su interior, se debe producir su liberación en el citoplasma y, posteriormente, en el núcleo celular. Estos endosomas se fusionan con los lisosomas (paso 4), que son orgánulos formados en el aparato de Golgi que contienen enzimas hidrolíticas y proteolíticas que se encargan de degradar material intracelular de origen externo o interno que llega a ellos. El pH del interior de los lisosomas es de aproximadamente 4.8, lo que provoca un aumento de la capacidad hidrolítica de los endosomas provocando su ruptura y la salida hacia el citoplasma del complejo vector/ADN. Parte de este complejo sufrirá una decompactación, liberándose ADN que podrá ser degradado por las enzimas endonucleasas (paso 5). Sin embargo, una pequeña parte del complejo vector/ADN atravesará la membrana nuclear, pudiéndose liberar el material genético en el núcleo celular (paso 6).

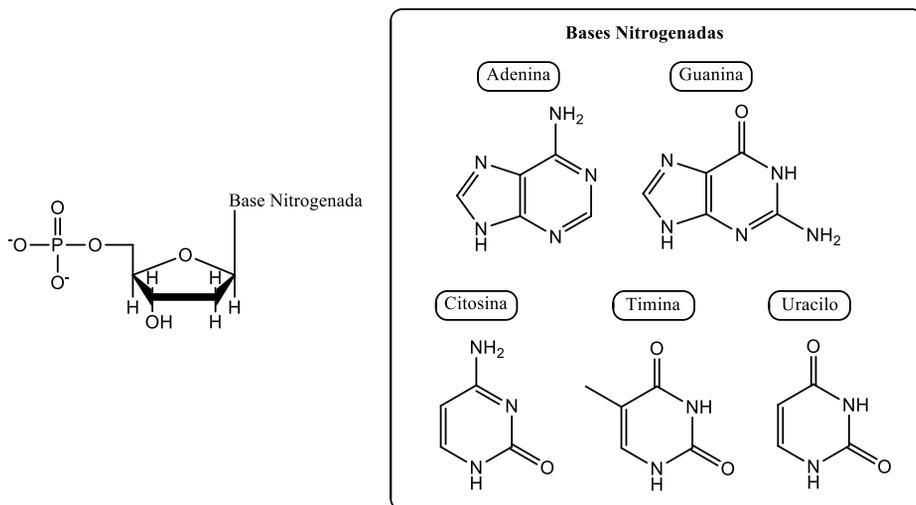
La terapia génica se caracteriza por ser una técnica en continuo crecimiento debido a la complejidad del proceso de transfección, a la multitud de genes que se encuentran asociados a los diferentes estados de las enfermedades, y a la gran cantidad de vectores disponibles que permiten la expresión de estos genes.

1.4 Información genética

En cualquier organismo, su información genética se encuentra almacenada en moléculas de ADN que están constituidas por secuencias de bases nitrogenadas y, por tanto, es necesario profundizar en el conocimiento de esta molécula.

1.4.1 ADN

El ADN es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas para el desarrollo y funciones de los organismos vivos. El principal papel del ADN en la célula es el almacenamiento de esta información. Se trata de un polielectrolito cargado negativamente debido a los grupos fosfatos que posee en sus cadenas. Su estructura es el resultado de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre los nucleótidos que forman parte de dicho polinucleótido. Los nucleótidos están formados por la asociación de un nucleósido (unión entre una base nitrogenada y una pentosa mediante un enlace N-glucosídico) con ácido fosfórico mediante un enlace éster fosfórico (*Esquema 1.3*).

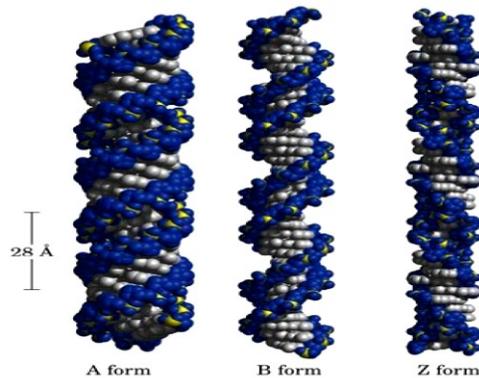


Esquema 1.3. Estructura de un nucleótido y las bases nitrogenadas que conforman parte del ADN y ARN.

Existen dos tipos de bases nitrogenadas, complementarias entre sí: pirimidinas y purinas. El ADN contiene dos bases púricas: adenina (A) y guanina (G), y dos bases pirimidínicas: citosina (C) y timina (T) (en el caso del ARN, la timina es sustituida por uracilo).

En los organismos vivos el ADN se basa en la unión de dos cadenas lineales antiparalelas, unidas a través de enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias, para dar lugar a la doble hélice, la cual existe en varias conformaciones. La conformación más estable bajo condiciones fisiológicas es una forma B-ADN (*Esquema 1.4*), en la que las cadenas se disponen helicoidalmente con un diámetro de aproximadamente 20 Å. Presenta dos periodicidades a lo largo del eje. La primera periodicidad es de 3.4 Å y corresponde a la separación entre las bases adyacentes. Las bases se encuentran relacionadas por un ángulo de rotación de 36°, por lo que la estructura helicoidal se repite cada 10.5 pares de bases en cada cadena, es decir, para un intervalo de 36 Å, siendo ésta la segunda periodicidad. En la estructura helicoidal se puede observar que hay un espacio de separación entre los grupos fosfatos que se conoce con el término de surco (*groove*). Debido a la asimetría entre los pares de bases, existe una zona menos ancha para los surcos (surco menor o *minor groove*) y otra mucho más ancha (surco mayor o *major groove*).

Existen además otras dos estructuras de ADN que han sido bien caracterizadas mediante estudios cristalográficos y que están presentes en la naturaleza, la forma A-ADN y la forma Z-ADN (*Esquema 1.4*). El ADN presenta una conformación de tipo A, bajo condiciones de deshidratación. Así, se producirá este cambio estructural cuando el ADN forme un complejo con especies de carga opuesta, es decir, cuando las repulsiones entre los grupos fosfato del polinucleótido disminuyan. Esta estructura difiere de una de tipo B debido a que presenta un ángulo de rotación de 20° con respecto al eje perpendicular de la doble hélice.



Esquema 1.4. A) Forma A-ADN (bajo condiciones de deshidratación); B) Forma B-ADN (la más estable bajo condiciones fisiológicas); C) Forma Z-ADN (presente en ciertos pares de base).

Por lo tanto, el A-ADN tiene un surco mayor más profundo y estrecho con respecto al B-ADN, y un surco menor que es más accesible a las proteínas, pero que contiene menos información estructural que el surco mayor. También se caracteriza por ser una doble hélice más corta y ancha que la conformación del B-ADN, pero tiene una alta densidad de carga. No se ha podido demostrar la existencia de A-ADN *in vivo*. Sin embargo, es conocido que los apareamientos híbridos de hebras ADN-ARN presentan más bien una conformación A que B, siempre en condiciones fisiológicas (pH= 7).

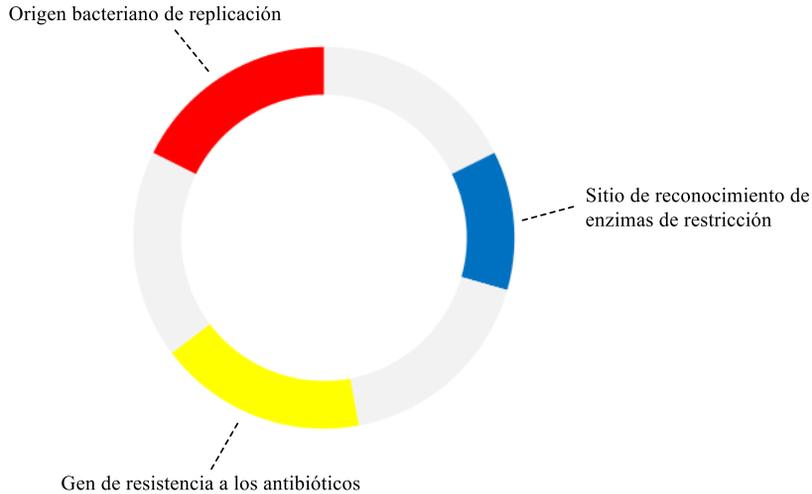
La estructura de tipo Z difiere de los otros dos tipos de conformaciones que adopta el polinucleótido, ya que presenta una doble hélice levógira. Mientras que todos los nucleótidos a lo largo del B-ADN tienen la misma conformación, en una estructura de tipo Z se ven favorecidas secuencias de nucleótidos que presentan alternancias de purinas y pirimidinas. También está presente esta conformación en segmentos de ADN alternando secuencias d(GC) o segmentos de ADN donde las bases han sido metiladas.

En condiciones fisiológicas el Z-ADN es menos estable que el B-ADN debido a las mayores repulsiones electrostáticas de los grupos fosfatos, ya que estos se encuentran más próximos entre sí en una conformación de tipo Z. Dado que la estructura molecular del Z-ADN es considerablemente diferente a la del B-ADN, la reactividad con otras moléculas también será totalmente diferente. Esta es la consecuencia de que una clase de proteínas se unan al Z-ADN y no al B-ADN. El Z-ADN es una conformación transitoria del polinucleótido, aunque se han podido realizar algunos progresos sobre su posible papel biológico.

El empleo de ADN plasmídicos se postula como alternativa a polinucleótidos de cadena más larga en terapia génica, ya que pueden atravesar más fácilmente las diferentes barreras extra e intracelulares.

El término **plásmido** fue presentado por primera vez por el biólogo norteamericano Joshua Lederberg en 1952.⁴⁴ Se define como una pequeña molécula de ADN de doble cadena circular (generalmente 1000-20000 pares de base (bp)) y su replicación es distinta a la del ADN cromosómico en una célula. Éstos existen naturalmente en las células bacterianas y, también, en algunas células eucariotas. Un caso excepcional son los episomas que se pueden replicar de forma autónoma o ser insertados (mediante un proceso de recombinación) en el cromosoma del organismo que los porta y replicarse con el mismo.

Existen plásmidos de diversos tamaños cuya funcionalidad es diferente. En su forma más simple, los plásmidos requieren un origen bacteriano de replicación, un gen de resistencia a los antibióticos y al menos un sitio único de reconocimiento de enzimas de restricción (ver *Esquema 1.5*). Además, este último elemento permite la clonación de un fragmento específico de ADN. Estos elementos permiten la propagación del plásmido dentro de las bacterias y son capaces de seleccionar cualquier bacteria que no porte al plásmido.



Esquema 1.5. Representación general de un plásmido.

La combinación de estos elementos determina el tipo de plásmido. Los más comunes son:

- **Plásmidos de clonación.** Son pequeños y se han optimizado para facilitar la clonación de fragmentos de ADN. Destacan los vectores de entrada Gateway® y los vectores de clonación TOPO™.
- **Plásmidos de expresión.** Se utilizan para la expresión de genes (a los efectos del estudio de estos genes). Dichos vectores pueden dirigir la expresión hacia varios tipos de células.
- **Plásmidos *knock-down*.** Reducen la expresión de un gen endógeno.
- **Plásmidos informadores.** Estudian la función de los elementos genéticos. Estos plásmidos contienen un gen informador (por ejemplo, luciferasa o GFP) que ofrece información acerca de la actividad del elemento genético.

- **Plásmidos víricos.** Son genomas procedentes de virus modificados que se utilizan para entregar eficazmente material genético a las células diana.

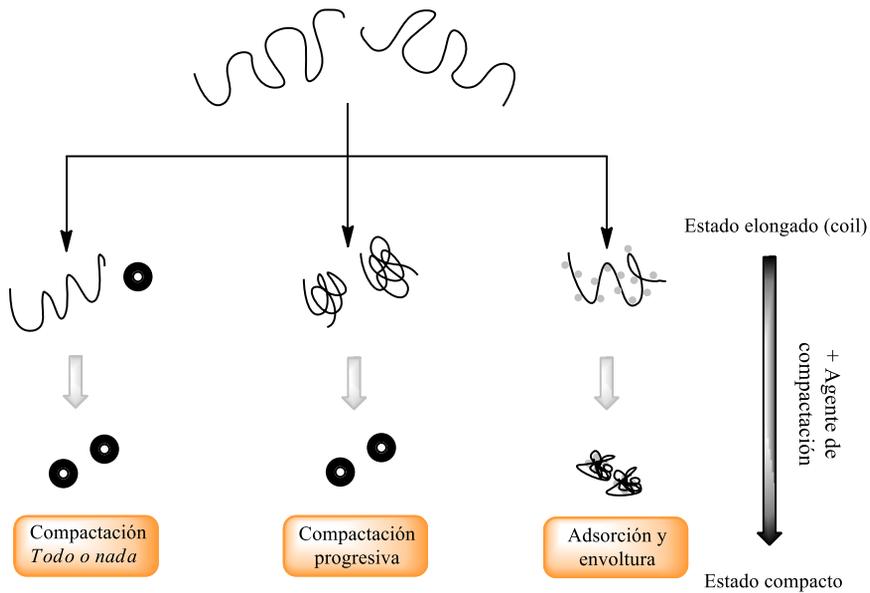
La principal ventaja de los plásmidos reside en una gran estabilidad, así como en sus propiedades de autoreplicación y modificación del gen que deseamos estudiar. Se han utilizado con vectores no vírales y se encuentran en fase preclínica frente a enfermedades tales como cáncer de melanoma,⁴⁵ VIH,⁴⁶ fibrosis quística,⁴⁷ etc.

1.5 Proceso de compactación

En sistemas biológicos, el ADN genómico dentro de las células se encuentra fuertemente compactado para poder distribuirse en un espacio de tamaño micrométrico. Por tanto, este tema ha atraído la atención y ha sido estudiado en profundidad durante décadas. Se entiende por compactación o condensación al proceso en el cual una molécula de ADN sufre una transición desde una conformación en un estado elongado a una forma compacta o globular.

En el siglo pasado, a principios de 1970, comenzaron los primeros estudios teóricos y experimentales sobre la condensación de ADN. Una gran variedad de técnicas experimentales ha sido utilizada desde ese momento para comprender los principios físicos que rigen este fenómeno, así como los factores que controlan la compactación *in vitro* e *in vivo*. Con el avance en el tiempo y el progreso en el desarrollo de las microscopías, sobre 1990, fue posible la visualización del plegamiento de las moléculas de ADN desde su estado más extendido a uno globular, además de permitir interpretar este fenómeno de una forma más precisa.

El ADN en disolución adopta una conformación elongada debido a la fuerte repulsión existente entre los grupos fosfato cargados negativamente que forman parte de su estructura. Tras añadir una concentración adecuada de agentes de compactación, el polinucleótido pasa a un estado condensado. Este fenómeno fue estudiado en profundidad gracias a los estudios realizados por el grupo del profesor Yosikawa, que fue pionero en el análisis de este proceso a nivel de moléculas individuales y permitió la identificación de los diferentes modos de compactación (ver *Esquema 1.6*). El primer modo es el denominado como *todo o nada*, donde no existe un estado intermedio y a su vez coexisten su forma elongada y compacta.⁴⁸ Este comportamiento ha sido generalmente observado cuando se inducen fuerzas de atracción entre todos los pares de bases a lo largo de la cadena del ADN, ya sea mediante la adición de pequeños contraiones multivalentes o provocando situaciones desfavorables entre las unidades monoméricas de ADN y el disolvente (ej. disolventes como el etanol o polímeros neutros). El segundo modo se corresponde con un cambio morfológico progresivo y ocurre cuando las fuerzas de atracción son bastantes fuertes entre el ADN y policationes que contengan en su estructura más de 10 monómeros.⁴⁹ Por último, el tercer mecanismo propuesto se corresponde con el que presentan las cromatinas en células eucariotas y ha sido reportado en experimentos *in vitro* en la literatura a través de nanopartículas catiónicas⁵⁰ o dendrímeros.⁵¹ Sin embargo, son posibles otros mecanismos o rutas intermedias entre los explicados anteriormente. Un caso particular es la condensación de ADN mediante tensioactivos catiónicos donde coexisten moléculas de ADN compactadas y en su estado elongado, siendo un comportamiento intermedio entre el primer y segundo modo.⁵²



Esquema 1.6. Representación de los 3 principales modos de compactación de ADN *in vitro*.

1.5.1 Control del proceso de compactación/decompactación del ADN mediante parámetros fisicoquímicos

Entre la multitud de factores fisicoquímicos que pueden controlar el fenómeno de condensación del polinucleótido, así como su decompactación, destacan: la concentración salina, la constante dieléctrica (ϵ) del medio, la temperatura y otros estímulos externos.

- i) **Un aumento de la concentración salina puede inducir la compactación o decompactación.**⁵³ En presencia de iones multivalentes (+3, +4) y poliaminas (espermina, espermidina), se produce una inhibición de la condensación de las moléculas de ADN al aumentar la concentración salina. Sin embargo, en

presencia de polímeros neutros como el polietilenglicol (PEG), se ha observado un efecto inverso.

Este contraste entre los diferentes comportamientos observados es atribuible a cómo se incorporan los iones que proceden de las sales durante la transición morfológica.

En el caso de los iones multivalentes, el plegamiento de las cadenas de ADN se encuentra asistido mediante un intercambio iónico entre los cationes monovalentes del ADN y los cationes multivalentes. En otras palabras, cuando el polinucleótido se encuentra en su conformación extendida, los cationes multivalentes se encuentran unidos más débilmente a los grupos fosfatos de éste y por ello, en su presencia, el polinucleótido se pliega y compacta. No obstante, si el PEG está presente, las hebras del polinucleótido se pliegan entre sí debido a un efecto de *crowding* o desplazamiento, que da como resultado una distribución de la carga negativa en la superficie. Esto se traduce en una completa unión de los cationes monovalentes con los grupos fosfatos al aumentar la concentración salina.

- ii) **Un incremento de la constante dieléctrica (ϵ) del medio provoca la decompactación del polinucleótido.**⁵⁴ El término electrostático del fenómeno de condensación de moléculas de ADN se encuentra estrechamente ligado a la constante dieléctrica del medio en el que se encuentra disuelto (ϵ). Es bien conocido que esta contribución se contempla en la teoría de Manning-Oosawa debido a un cambio en la longitud de Bjerrum (l_B), que es la distancia por debajo de la cual se pueden formar pares iónicos. En presencia de iones monovalentes y divalentes se ha observado que al disminuir el

ϵ del medio en mezclas alcohol/agua,⁵⁵ se producía un aumento del proceso de compactación.

- iii) **Un aumento de la temperatura puede dar lugar a la compactación o decompactación.**⁵⁶ Cuando las moléculas de ADN son condensadas mediante poliaminas, como la espermina o complejos de $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, un aumento de la temperatura favorece dicho proceso. Este fenómeno es argumentado en base a que la contribución entrópica debida a la sustitución de los cationes monovalentes del ADN es mayor en un estado compacto cuando aumenta T.
- iv) **Un estímulo externo permite la modificación de las cargas del agente de compactación, lo que permite controlar el proceso.** Cuando la valencia de un agente de compactación catiónico es modificada *in situ* al aplicar un estímulo externo, el plegamiento de las cadenas de ADN se puede ver favorecido debido a un aumento de la valencia (de la carga) del mismo. Este comportamiento ha sido demostrado mediante reacciones redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ en presencia de espermina,⁵⁷ variando el pH⁵⁸ o complejaciones de espermina y ATP/ADP.⁵⁹ Una disminución de la valencia tendría el efecto contrario.

1.5.2 Compactación: tamaño, forma y estabilidad

El balance entre la energía superficial y la rigidez del ADN es un paso crucial en el control de la forma del polinucleótido en el proceso de compactación. Este último parámetro puede ser modificado mediante la adición de sales monovalentes que dan como resultado agregados más grandes.⁶⁰ Entre las estructuras más comunes citadas en la literatura se

encuentran los toroides (estructuras con forma de *donuts*), glóbulos esféricos o agregados en forma de barra, flor o raqueta.

Se puede considerar que la formación de un estado condensado es contraintuitiva, principalmente por dos razones. Inicialmente, es sorprendente obtener un agregado estable y compacto de un sistema altamente cargado, es decir, al comenzar el proceso de compactación del ADN todavía permanece un 10 % de su carga original. En segundo lugar, es destacable que estos agregados presenten un tamaño bien definido. La estabilidad de un estado compacto se detalla en la revisión de Bloomfield,⁶¹ donde tres contribuciones repulsivas deben ser consideradas con respecto al término de energía libre: i) flexibilidad, siendo una característica intrínseca de la rigidez del ADN de doble hebra y representa $\sim +1/300k_B T$ por pares de base (bp); ii) el término entrópico entre el polímero y el disolvente ($+1/150k_B T$ por bp); y iii) repulsión electrostática, estimada mediante la teoría de Oosawa ($+1/24k_B T$ por bp). Sin embargo, no se tienen en cuenta las interacciones electrostáticas atractivas en las descripciones de Debye-Hückel y Poisson-Boltzmann, siendo imprescindible considerar las fluctuaciones de los contraiones correlacionadas a distancias cortas ($-0.3k_B T$ por bp). Teniendo en cuenta estas contribuciones repulsivas y atractivas, la energía libre del estado compacto es del orden de $-0.05k_B T$ por bp o -0.1 kJ/moles de bp a temperatura ambiente, el cual es un valor compatible con un estado condensado estable.

Dos posibles causas permiten explicar el tamaño de los agregados de ADN.⁶² Una de ellas es la termodinámica que contempla una energía libre repulsiva a partir de los defectos topológicos intrínsecos de la linealidad del polímero dentro del toroide. Y otra es la cinética, cuya barrera energética aumenta con el tamaño del agregado. Ambas contribuciones crecen positivamente cuando se produce un incremento del tamaño del toroide, lo que podría explicar el limitado tamaño de estos agregados. Experimentalmente, se ha determinado que la longitud de persistencia, la cual es una propiedad mecánica que permite cuantificar la rigidez de polímeros como el ADN, es

dependiente de la concentración de sal y de la presencia de zonas de nucleación.⁶⁰ Mientras que la concentración del agente compactante ejerce normalmente un efecto despreciable sobre el tamaño de los agregados compactados.

No obstante, es importante indicar en esta memoria las diferentes moléculas que pueden actuar como vectores o agentes de compactación, debido a su influencia en este proceso. Se pueden citar nanotubos de carbono (CNTs), nanopartículas de distintos tipos, tensioactivos catiónicos, calixarenos, así como micelas, vesículas y liposomas. Especialmente, el uso de moléculas anfifílicas como nanovectores ha centrado la atención de numerosos estudios en las últimas décadas.

1.6 Moléculas anfifílicas

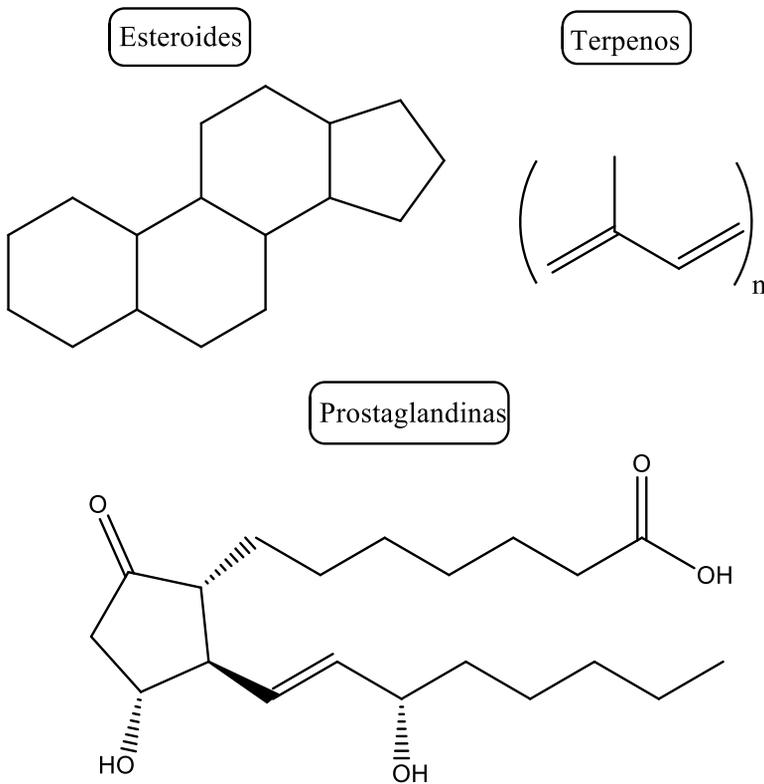
El término **anfifílico** proviene del griego ($\alpha\mu\phi\iota\varsigma$, amphis: ambos y $\phi\iota\lambda\acute{\iota}\alpha$, philia: amor, amistad). Estas moléculas también se denominan anfipáticas y se caracterizan por poseer una parte liófila y otra liófoba a la vez, lo que les ha conferido unas propiedades características han sido utilizadas durante años en numerosos campos de investigación. Estas partes pueden ser descritas como:

- **Parte liófila**, está constituida por una cabeza polar y presenta una fuerte atracción por el disolvente.
- **Parte liófoba**, suele estar formada por una, dos o tres cadenas hidrocarbonas y presenta una baja atracción por el disolvente.

Si el disolvente en el que se encuentran estas estructuras es agua, estas partes se designan como hidrófila e hidrófoba, respectivamente.

Los lípidos son moléculas anfífilas que llevan a cabo muchas de las funciones biológicas clave, como formar parte de los componentes de las membranas celulares, ser fuentes de almacenamiento de energía y participar en mecanismos de señalización celular. Este término es asociado a un grupo de biomoléculas orgánicas que son insolubles al agua, pero solubles en disolventes orgánicos (cloroformo, metanol, etc).

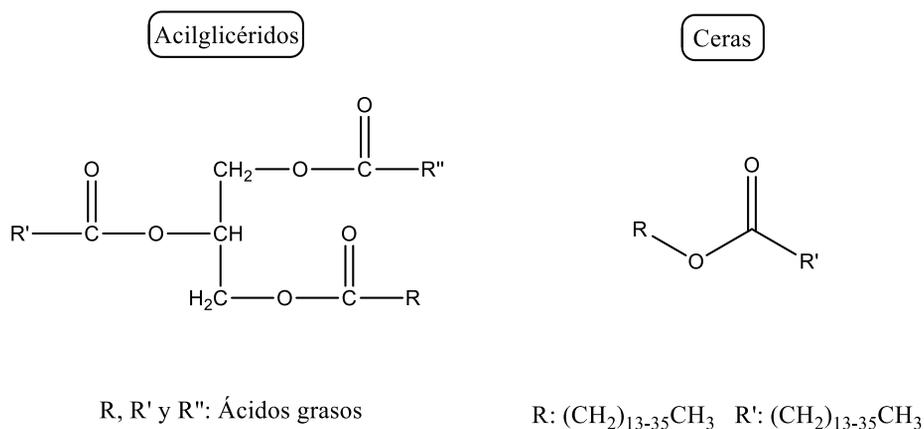
Los lípidos se clasifican en función de su estructura molecular en dos categorías: saponificables, que contienen ácidos grasos unidos a algún otro componente, generalmente mediante un enlace tipo éster, y no saponificables, que no contienen ácidos grasos (terpenos, esteroides y prostaglandinas), aunque también incluyen algunos derivados importantes de éstos (*Esquema 1.7*).



Esquema 1.7. Lípidos insaponificables.

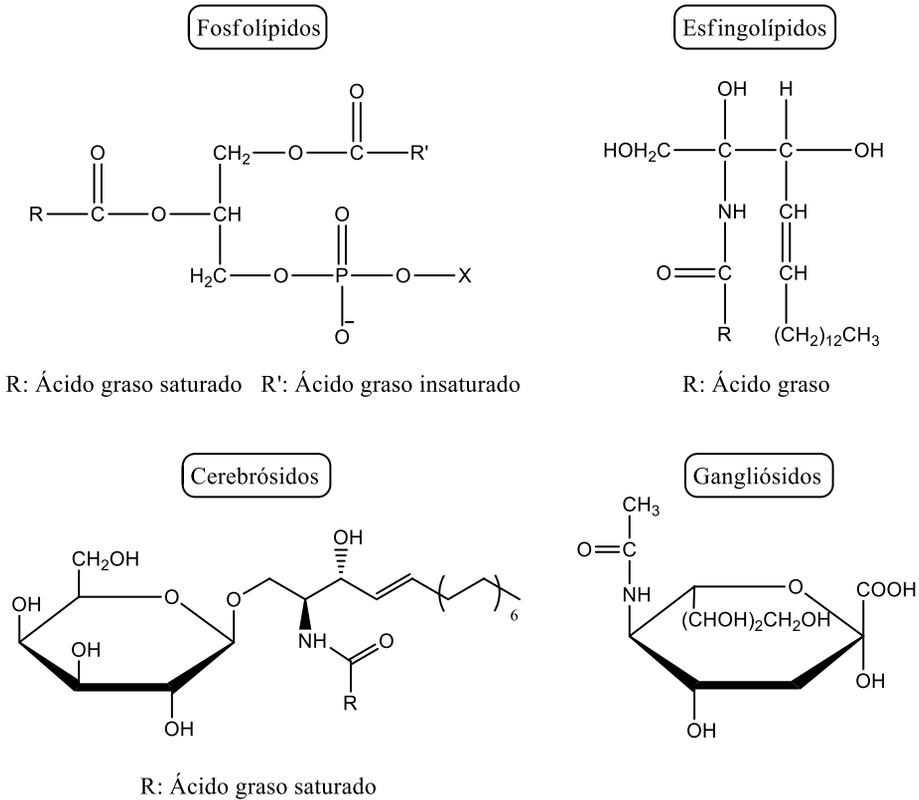
Los lípidos saponificables se subdividen en dos grupos: simples y complejos.

- **Lípidos simples** son aquellos constituidos por ácidos grasos y un alcohol, como los acilglicéridos y ceras (*Esquema 1.8*).



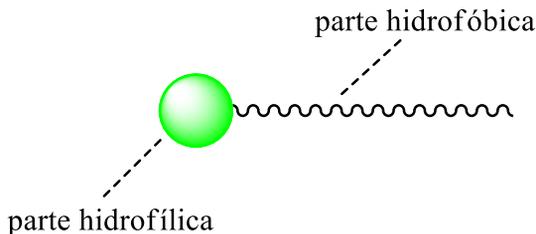
Esquema 1.8. Lípidos saponificables y simples.

- **Lípidos complejos** son aquellos en cuya composición además de un alcohol y uno o más ácidos grasos, se encuentra un ácido fosfórico o un glúcido. También son conocidos como lípidos de membrana debido a que son los principales constituyentes de las membranas celulares. En esta familia se encuentran: fosfoglicéridos, fosfoesfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos (*Esquema 1.9*).



Esquema 1.9. Lípidos saponificables y complejos.

Otro ejemplo de moléculas anfífilas son los tensioactivos, que se orientan preferentemente en la superficie. Se caracterizan por poseer dos partes: una parte polar o hidrófila, que se denomina cabeza, y una parte apolar o hidrófoba, conocida como cola, la cual suele estar constituida por cadenas hidrocarbonadas (*Esquema 1.10*). Estas moléculas se orientan en la interfase de una disolución acuosa de tal forma que su cabeza polar se dirige hacia el agua y la cola hidrofóbica hacia el exterior. Como consecuencia de exceso en la concentración de tensioactivo en la superficie, se produce una disminución de la tensión superficial del agua y es lo que explica la etimología de este término.



Esquema 1.10. Estructura general de un tensioactivo.

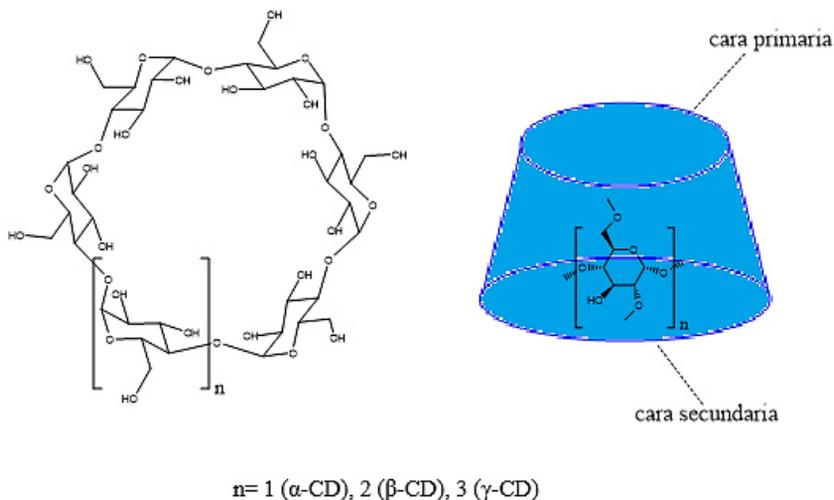
Los tensioactivos se clasifican según la naturaleza de la parte hidrofílica en:

- **Aniónicos**, presentan carga negativa, como por ejemplo sulfatos, sulfonatos, carboxilatos, etc.
- **Catiónicos**, con una cabeza hidrofílica cargada positivamente, por ejemplo, los derivados del ión trimetil amonio ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$).
- **Zwitteriónicos**, éstos contienen cargas positivas y negativas en la misma molécula. Aunque se suelen denominar también anfotéricos, en realidad no son sinónimos. Los anfotéricos cambian su carga con el pH, existiendo un determinado valor del mismo, denominado punto isoelectrico para el que no tienen carga y se comportan como no iónicos. Son surfactantes zwitteriónicos, aquellos que tienen como carga negativa grupos sulfonatos y como carga positiva un grupo amonio, ya que incluso a pH muy bajo conservan ambas cargas. Un ejemplo típico de anfotéricos son las betaínas, que son catiónicas en medio ácido y zwitteriónicas a pH básico.
- **No iónicos**, carecen de grupos polares cargados, pero poseen grupos como los etoxilatos, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$, que muestran

gran afinidad hacia las moléculas de agua debido a las fuertes interacciones dipolo-dipolo en los enlaces de hidrógeno.

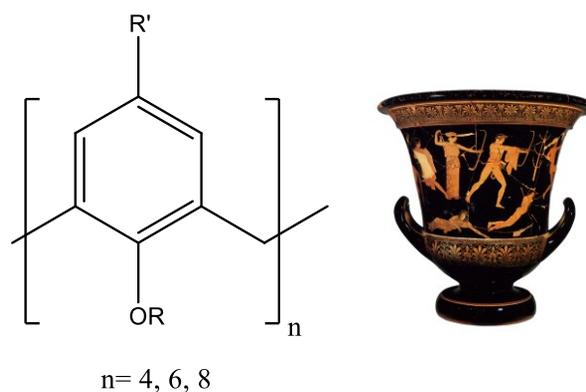
Hoy en día, se trabaja en el diseño de nuevas estructuras anfílicas supramoleculares cuyo comportamiento dependerá de la naturaleza química de los fragmentos hidrofílicos e hidrofóbicos insertados, como las ciclodextrinas y los calixarenos.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, obtenidos mediante digestión enzimática de almidón. Pueden estar formados por 6, 7 y 8 unidades de glucopiranososa (α , β y γ , respectivamente), con grupos hidroxilo primarios y secundarios ubicados en el borde inferior y superior de una estructura con forma de cono truncado (*Esquema 1.11*). El tamaño de la cavidad depende del número de unidades de glucopiranososa que las forma. Estas estructuras presentan un carácter hidrofóbico en su cavidad interior e hidrofílico en su exterior. Además, se pueden insertar grupos iónicos y fragmentos hidrofóbicos, lo que les puede conferir un carácter anfílico.



Esquema 1.11. Estructuras de las ciclodextrinas.

Otro ejemplo de macrociclos que presentan una cavidad y pueden ser funcionalizados son los calixarenos. Éstos son oligómeros cíclicos ($n= 4, 6$ y 8 unidades fenólicas, normalmente), que se obtienen mediante una reacción de condensación entre aldehídos y fenoles y de ahí su similitud con las cráteras de cáliz utilizadas durante la antigua Grecia (*Esquema 1.12*). En comparación con otros sistemas cíclicos, los calixarenos tienen una característica peculiar con respecto a su estructura: pueden adoptar diferentes conformaciones.⁶³ El número de conformaciones aumenta con el número de unidades de benceno que forman el sistema, aunque esto también depende del disolvente.⁶⁴ Estas estructuras macrocíclicas pueden ser modificadas en sus bordes con el objetivo de conferir a estas moléculas un carácter anfifílico, así como diversas propiedades como consecuencia de las múltiples opciones existentes de funcionalización. La principal aplicación de las supraestructuras basadas en calixarenos es el hospedamiento de pequeños iones en su interior. También pueden actuar como transportadores de fármacos o genes.⁶⁵



Esquema 1.12. Estructura general de macrociclos basados en calixarenos.

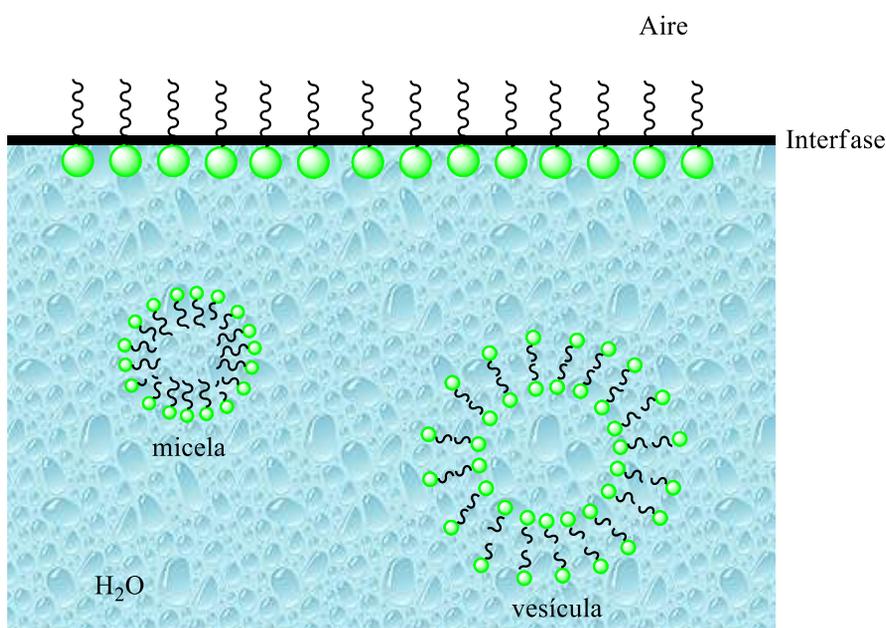
Todas las moléculas anfifílicas mencionadas presentan una capacidad de agregación entre sí para formar estructuras organizadas como son las micelas esféricas, cilíndricas o elongadas y vesículas.

1.7 Fenómenos de agregación de moléculas anfifílicas

Una de las propiedades más características de las moléculas anfifílicas es su capacidad para formar agregados en disolución. La fuerza predominante que causa este fenómeno se debe al efecto hidrofóbico. Este término fue acuñado por Charles Tandford⁶⁶ en la década de 1970 para explicar la tendencia de las moléculas anfifílicas para formar agregados en disolución acuosa. Sin embargo, el principal argumento que permite comprender este fenómeno es la entropía y las propiedades únicas de las moléculas de agua. Cuando un fragmento no polar se encuentra en agua, las moléculas de agua a su alrededor tienden a crear una cavidad para acomodarla. Esto les permite organizarse entre sí, aumentando el grado de estructura, lo cual es desfavorable desde un punto de vista entrópico. Cuando se produce la agregación, esta estructuración desaparece, produciéndose un aumento de entropía que contribuye disminuyendo la energía de Gibbs, lo que favorece la asociación de las moléculas. El efecto hidrofóbico es muy importante en la naturaleza y es el motivo de la formación de las membranas lipídicas, así como del plegamiento de proteínas y la agregación de moléculas anfifílicas.

En agua, debido al efecto hidrofóbico, los anfifilos forman distintas estructuras (agregados), que minimizan el contacto de sus cadenas hidrofóbicas con las moléculas de agua. Si, además, la región hidrófila está cargada, se optimizan las repulsiones electrostáticas. El tipo de agregado no sólo depende de la naturaleza química de la especie, sino también de la concentración, de la temperatura y de la presión. A una concentración muy baja, se orientan formando una monocapa en la interfase agua/aire, es decir, la parte hidrofóbica se encuentra orientada hacia el aire y la parte hidrofóbica hacia la disolución acuosa. A partir de una determinada concentración, las moléculas se asocian entre sí para dar lugar a distintos agregados tales como micelas esféricas o cilíndricas, vesículas, etc (*Esquema 1.13*).

Dos parámetros pueden ser utilizados para caracterizar los agregados. El primero es la Concentración de Agregación Crítica (CAC), que se define como la concentración necesaria de moléculas anfifílicas para formar algún tipo de agregado en disolución acuosa. Cuando es referido a micelas se conoce como Concentración Micelar Crítica (CMC) y se utiliza el término Concentración Vesicular Crítica (CVC) para vesículas. El segundo parámetro se corresponde con el factor de empaquetamiento, que depende de la medida del tamaño de los agregados de los anfifilos.

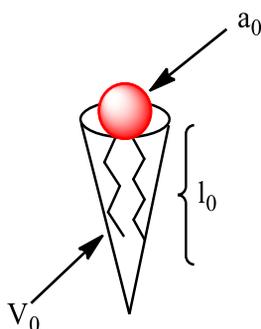


Esquema 1.13. Comportamiento de las moléculas anfifílicas en disolución acuosa.

El parámetro de empaquetamiento propuesto por J. Israelachvili y colaboradores,⁶⁷ describe como se distribuyen efectivamente los lípidos anfifílicos y viene dado mediante la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{V_0}{a_0 l_0} \quad (1.1)$$

donde V_0 es el volumen ocupado por la cadena hidrofóbica, l_0 es la longitud de la cadena totalmente extendida y a_0 es el área transversal de la cabeza polar (ver *Esquema 1.14*). Este parámetro permite predecir la tendencia de ciertas moléculas a formar un determinado tipo de agregado. Hay que resaltar que el comportamiento de estas especies es a menudo influenciado por las propiedades del disolvente, la temperatura y la fuerza iónica.



Esquema 1.14. Representación de los parámetros moleculares de los que depende el factor de empaquetamiento (ρ).

En la *Tabla 1.1* se resume la morfología del agregado en función del valor de su parámetro de empaquetamiento. Los valores de este factor pueden ser $\rho < 1$, $\rho = 1$ y $\rho > 1$, que se corresponden con una forma cónica, planar y cónica invertida, respectivamente.

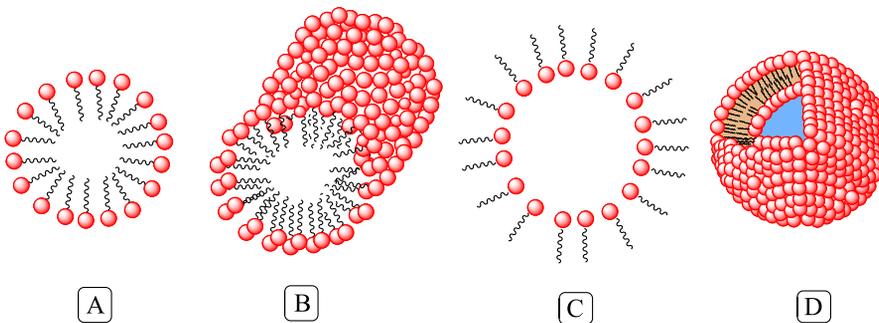
Tabla 1.1. Valores del factor de empaquetamiento y agregados posibles.

Parámetro de empaquetamiento (ρ)	Estructuras
$< 1/3$	Micelas esféricas
$1/3 - 1/2$	Micelas cilíndricas
$1/2 - 1$	Vesículas
1	Bicapas planares
> 1	Micelas invertidas

Una clasificación de los agregados más relevantes según su morfología estructural es la siguiente:

- **Micelas esféricas**, son asociaciones de moléculas anfifílicas en disolventes polares con forma esférica. Las cadenas hidrofóbicas se orientan hacia el interior de la micela y las cabezas polares hacia la disolución, debido principalmente al efecto hidrofóbico, como se mencionó anteriormente. Normalmente, tienen un tamaño de partícula entre 2 y 20 nm.⁶⁸ Se forman de manera espontánea y se trata de un equilibrio de dinámico, ya que continuamente se reorganizan entre sí (*Esquema 1.15A*).
- **Micelas cilíndricas**, también conocidas como elongadas o en forma de barra. Son agregados micelares formados por moléculas anfifílicas cargadas y que contienen un número mayor de moléculas que las esféricas. En ellas las repulsiones electrostáticas entre las cabezas polares son menores porque la condensación de los contraiones condensados en la superficie del agregado es mayor que en las micelas esféricas (*Esquema 1.15B*).

- **Micelas inversas/reversas**, tienen su origen en medios no polares y las dos regiones de las moléculas anfifílicas presentan una orientación contraria a la mostrada en micelas esféricas. Aquí las cadenas hidrocarbonadas están expuestas al disolvente, mientras que las cabezas polares se disponen hacia el interior del agregado (*Esquema 1.15C*).
- **Vesículas**, son estructuras esféricas formadas por una o más bicapas de moléculas anfifílicas naturales, donde las cabezas polares se encuentran orientadas hacia el exterior y el interior de la fase polar. Suelen estar constituidas por lípidos de doble cadena (fosfolípidos y tensioactivos). Además, existen los liposomas, que son vesículas artificiales preparadas a partir de lípidos naturales y sintéticos. Ambas palabras son empleadas en la literatura indistintamente y, debido a la naturaleza de las moléculas anfifílicas empleadas en este trabajo de investigación, serán utilizados ambos términos (*Esquema 1.15D*).



Esquema 1.15. Estructuras de los agregados posibles en moléculas anfifílicas.

A) micela esférica; **B)** micela cilíndrica; **C)** micela inversa y **D)** vesícula.

1.8 Liposomas

El término liposoma deriva de dos palabras griegas: (*lipos*: grasa y *soma*: cuerpo) y fueron descritos por primera vez a mediados de los años 60 por A. Bangham y colaboradores.⁶⁹

Se han propuesto diferentes mecanismos para la formación de liposomas. Uno de los más aceptados sugiere que la creación de una bicapa en un liposoma es una competencia entre dos efectos, la energía asociada a su curvatura y la energía en el borde de la bicapa. En un fragmento plano lamelar con un entorno hidrófilo, se mantendrá una alta tensión superficial en el borde de esa capa lamelar. Aunque, la flexión puede reducir la energía en el borde, también ocasiona un gasto energético debido a la curvatura. Para minimizar aún más esta energía, se requiere una alta temperatura que permite la formación de una esfera cerrada, situación en la que se consigue que la energía en el borde sea igual cero. En este punto, la energía de flexión es máxima y la energía libre de exceso por liposoma, parámetro independiente del radio, es igual a $8/K$, donde K es la rigidez flexional. Esto permite explicar que liposomas más grandes se encuentren favorecidos energéticamente, mientras que los de menor tamaño estén favorecidos entrópicamente.

La composición, así como la naturaleza química de las cadenas hidrocarbonadas y cabezas polares de los lípidos, temperatura y otros como el pH y la fuerza iónica, son variables que contribuyen a la forma y tamaño final de los agregados lipídicos. La estructura química de los lípidos es uno de los parámetros más importantes. Los liposomas están compuestos normalmente por lípidos de doble cadena, ya que su solubilidad es menor que los de cadena simple (unas 10^5 veces menor), dando lugar a la agregación de estas especies al superar la CVC. Por ejemplo, la longitud de la cadena lipídica ejerce un efecto notorio en la hidrofobicidad, disminuyendo el valor de la CVC cuando aumenta la longitud. También se disminuye la CVC al aumentar la temperatura de transición de los lípidos. Además, dobles enlaces en *cis* o en

trans en las cadenas hidrocarbonadas conducen a una disminución drástica de la temperatura de transición, aumentando la CVC. Un efecto importante en el polimorfismo lipídico también es causado por la cabeza polar, en el que su polaridad, carga y características estéricas tienen un papel muy importante.

Además de las características estructurales de los lípidos, la temperatura también influye en las estructuras supramoleculares lipídicas resultantes. Cada molécula lipídica tiene una temperatura de transición de fase específica (también llamada temperatura de fusión o T_m), en la cual los lípidos sufren un cambio de estado de una fase de tipo gel sólido a líquido. En una fase de gel sólido, los lípidos presentan una disposición regular y rígida, mientras que, en una fase líquida, el desorden aumenta en la membrana.

El poliformismo de estas estructuras ha sido estudiado ampliamente, sin embargo, comprender y controlar su formación es una rama de creciente interés para la comunidad científica. Estos agregados pueden presentar morfologías con distintos tamaños y formas. Teniendo en cuenta el número de bicapas (lamelas) y el tamaño de las vesículas se pueden clasificar en distintos grupos.

Cuando los liposomas poseen una única bicapa o lamela, se dividen a su vez en tres subgrupos, que dependen de su tamaño. Vesículas unilamelares pequeñas (SUV), cuyo tamaño es inferior a 100 nm. Cuando el tamaño oscila entre 100 nm y 1 micra se denominan vesículas unilamelares grandes (LUV). Se llaman vesículas unilamelares gigantes cuando son más grandes que una micra (GUV).

Además, existen estructuras de mayor tamaño compuestas de varias bicapas como las vesículas oligolamelares (OLV), vesículas multilamelares (MLV) y vesículas multivesiculares (MVV)⁷⁰ (ver *Tabla 1.2*).

Tabla 1.2. Clasificación de los liposomas en función de la forma y el tamaño.

Número de lamelas	Nombre	Tamaño/nm	Esquema
Unilamelares	SUV	20-100	
	LUV	100-1000	
	GUV	>1000	
Multilamelares	OLV	100-500	
	MLV	500-1000	
	MVV	>1000	

Teniendo en cuenta la composición y el mecanismo de liberación de fármacos, los liposomas pueden ser también clasificados en liposomas convencionales (aniónicos y neutros), liposomas con una larga circulación en sangre (*stealth liposomes*), polimórficos (sensibles a pH y temperatura, y catiónicos) y funcionalizados en su superficie con determinados ligandos que son activos a ciertos receptores de las células.

1.8.1 Métodos de preparación de liposomas

Existen una multitud de métodos para la preparación de estas estructuras lipídicas unilamelares: dispersión simple,⁷¹ evaporación en fase

reversa,⁷² congelación-descongelación⁷³ y deshidratación-hidratación.⁷⁴ Sin embargo, presentan todos una serie de pasos comunes que son los siguientes:

- i. Formación de la bicapa lipídica mediante la eliminación de los disolventes orgánicos en los cuales han sido disueltos los lípidos.
- ii. Dispersión e hidratación de los lípidos en medio acuoso.
- iii. Purificación de las estructuras liposomiales resultantes.
- iv. Análisis, es decir, comprobación de sus características fisicoquímicas.

El método de dispersión simple es uno de los más utilizados y fue detallado en 1965.⁷¹ Este permite la creación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) que presentan aplicaciones con fines terapéuticos. Se caracteriza por los siguientes pasos:

- i. **Formación de la bicapa**, donde los lípidos son disueltos en proporciones adecuadas, utilizando disolventes no polares como el cloroformo, metanol o ciclohexano. Posteriormente, el disolvente es evaporado mediante una centrifugadora- evaporadora o una corriente de nitrógeno, obteniéndose una fina película formada por la bicapa lipídica sobre las paredes del vial.
- ii. **Hidratación y dispersión de la bicapa lipídica**, se realiza en medios acuosos como agua o disoluciones tampón. La hidratación debe realizarse por encima de la T_m (temperatura *melting*) del lípido durante 30 minutos y mediante agitación mecánica. Esto favorece que parte del agua quede atrapada en la bicapa lipídica y el resto en el interior del liposoma, el cual se forma espontáneamente en contacto con la disolución acuosa.

- iii. **Extrusión**, se obtienen liposomas unilamelares con una baja polidispersidad. Se pasan por un filtro de policarbonato de tamaño de poro definido, en el cual quedarán atrapadas aquellas bicapas que no han formado liposomas.

Los SUV también pueden ser sintetizados mediante métodos de inyección de disolvente (éter o etanol). Los lípidos son disueltos en el disolvente, que se añade lentamente sobre agua (caliente en el caso del éter), con la ayuda de una jeringa conectada a una bomba. Subsecuentemente, el disolvente es eliminado al aplicar vacío. Sólo en el caso del etanol, es necesario emplear ultrafiltraciones para eliminar los restos de disolvente debido a la formación de azeótropos (alcohol/agua).

Sin embargo, ha sido demostrado que vesículas multilamelares (MLV) controlan mejor el proceso de liberación de fármacos frente a las de tipo SUV.⁷⁵ Uno de los métodos convencionales que permite la formación de MLVs se basa en la formación de esférulas de disolvente.⁷⁶ Consiste en mezclar vigorosamente una fase orgánica que contiene fosfolípidos y una fase acuosa durante 1 hora en condiciones de bajo vacío. Esto da lugar a una emulsión de aceite en agua, formada por pequeñas esferas de disolvente que contienen lípidos. Posteriormente, la fase orgánica es eliminada por evaporación dando como resultado vesículas de tipo MLV que tienen una distribución de tamaño monodispersa. Entre otros métodos convencionales que dan lugar a este tipo de estructuras lipídicas destacan la hidratación de bicapas de fosfolípidos mediante un flujo hidrodinámico⁷⁷ y la hidratación de proliposomas.⁷⁸

La correcta selección de un método u otro determinará el tamaño y la lamelaridad de las vesículas liposomiales resultantes. En este sentido, esta selección va a depender de: i) las características y las concentraciones de los lípidos, así como la naturaleza de la especie que se quiere encapsular; ii) el

tamaño, la polidispersidad y el número de bicapas de las vesículas; iii) la composición del medio de la dispersión liposomal; y iv) la reproducibilidad en su preparación.

Finalmente, se recomienda almacenar estas nanoestructuras lipídicas a una temperatura de 4° C a pH= 7 para evitar su degradación.

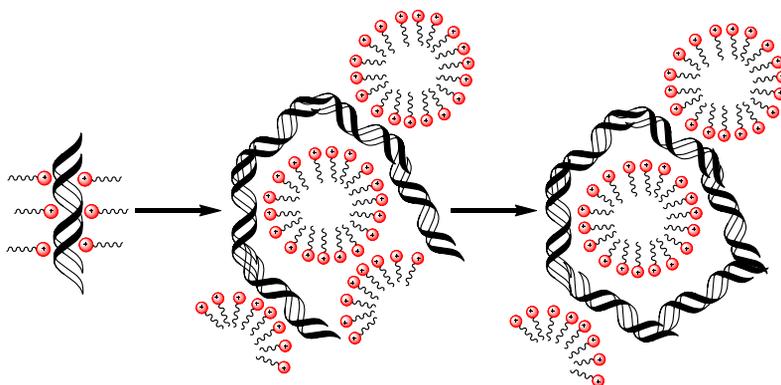
1.9 Transporte de material genético mediante el uso de monómeros y agregados de moléculas anfifílicas

El propósito final del presente trabajo es, principalmente, el empleo de moléculas anfifílicas basadas en macrociclos como vectores de liberación de material genético. Aunque también se estudiará, en algunos casos, el encapsulamiento de fármacos antineoplásicos. Debido a sus características duales de reconocimiento molecular y autoensamblaje, los anfifilos macrocíclicos se han investigado cada vez más como una nueva familia de nanotransportadores de genes. Estas supraestructuras fueron consideradas como “Tensioactivos con sitios de reconocimiento hospedador-huésped”,⁷⁹ cuyas cavidades se encuentran funcionalizadas con grupos hidrofílicos e hidrofóbicos en su superficie exterior. Aprovechando esta comparación con los tensioactivos, la interacción de los monómeros y agregados de éstos con ADN será descrita debido a la escasez de literatura acerca de este tema con calixarenos anfifílicos.

Cabe destacar que la interacción de estas moléculas con el polinucleótido origina cambios conformacionales. Estas transiciones en su morfología se producen como consecuencia de una neutralización de las cargas negativas de los grupos fosfatos, así como una disminución del tamaño de las moléculas de ADN.

1.9.1 Interacciones de los monómeros de tensioactivo con ADN

Hoy en día, las interacciones de los monómeros de tensioactivos catiónicos con ADN es un debate que genera controversia. En la literatura existen dos teorías. En 2006, D. Zhu y R. Evans⁸⁰ sugirieron que estas interacciones se originan como consecuencia de la formación de agregados de estas moléculas anfifílicas en disolución y son estos agregados los que se unen a los grupos fosfatos del ADN. Es decir, este proceso de autoasociación de los monómeros tendrá lugar al alcanzar un determinado valor que se corresponde con la CAC. En definitiva, los autores proponen que la interacción ADN/tensioactivo catiónico depende de las interacciones hidrófobas entre las moléculas de surfactante, pero no de la unión de los monómeros mediante interacciones electrostáticas. Sin embargo, esta idea se contrapone con resultados experimentales y teóricos que demuestran que los monómeros pueden interactuar con el ADN únicamente mediante interacciones electrostáticas y posteriormente, se produce un efecto sinérgico que permite la unión de nuevos monómeros al polinucleótido (*Esquema 1.16*). Este efecto da lugar a la formación de agregados premicelares en la superficie del polinucleótido al alcanzar la CAC.⁸¹



Esquema 1.16. Representación de las diferentes conformaciones morfológicas en función de las interacciones tensioactivo catiónico/ADN según la teoría más aceptada en base a datos experimentales y teóricos.

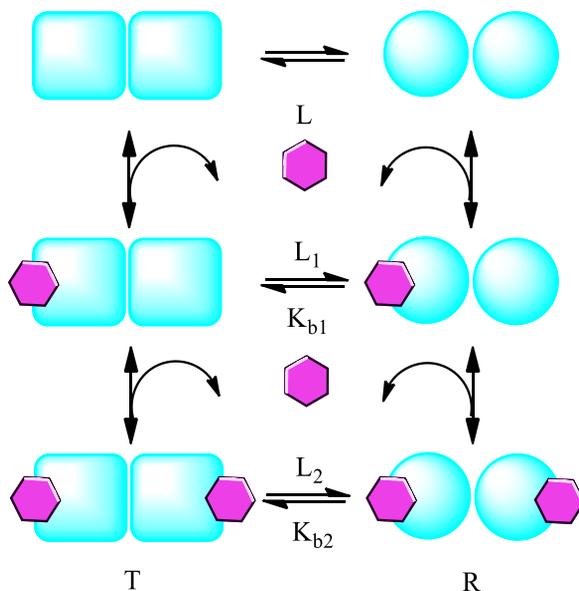
Teniendo en cuenta que esta última idea es la más aceptada por la comunidad científica, se describe a continuación de forma más detallada un posible mecanismo. Este modelo considera que, inicialmente, existen interacciones electrostáticas entre moléculas de tensioactivo catiónico y el ADN cargado negativamente. Sin embargo, la posición exacta donde se producen estas interacciones no se conoce concretamente, pero parece ser que esta unión tiene lugar a través del nitrógeno de las bases debido a su alta densidad electrónica.⁸² Este comportamiento favorece un carácter cooperativo, que ha sido previamente observado,⁸³ y que va acompañado de un cambio conformacional del polinucleótido. Posteriormente, se dan interacciones hidrofóbicas en el interior del ADN,⁸³ formándose enlaces hidrofóbicos. Este efecto hidrofóbico ocurre cuando se supera un determinado valor de la concentración de tensioactivo, denominada CAC. Esta tendencia de las cadenas hidrófobas de los surfactantes a interactuar con el interior hidrófobo del ADN es espontánea, dado que minimiza el contacto con las moléculas de agua. Por otro lado, interacciones debidas al apilamiento de las bases están relacionadas con contribuciones entrópicas que favorecen la unión de las cadenas hidrofóbicas de los tensioactivos con el interior de la doble hélice del ADN.

La cooperatividad se puede definir como el proceso de interacción mediante el cual un ligando se une a un determinado sitio en un receptor (enzima, proteínas, ADN, etc.) e influye en la unión de otra molécula de ligando en un segundo sitio. Este fenómeno es cuantificable a través de la constante de interacción (K_b) del ligando con respecto al sitio de unión de la macromolécula (*Esquema 1.17*). Aunque la interacción entre monómeros de tensioactivos y ADN presenta un carácter cooperativo, en la naturaleza existen diversos comportamientos con otras moléculas:

- Un **efecto cooperativo** se produce cuando es más favorable la unión de una segunda molécula de ligando en una zona, donde

previamente se encuentra asociada una primera molécula del mismo. Como resultado, $K_{b1} > K_{b2}$.

- Un **efecto anticooperativo** presenta un comportamiento contrario al caso anterior, es decir, favorece la unión de un ligando en una región donde no existe previamente ninguna otra molécula asociada. Por tanto, $K_{b1} < K_{b2}$.
- Un **efecto no cooperativo** se caracteriza por la misma afinidad de unión de un ligando hacia una zona u otra, independientemente de que previamente se haya asociado o no otra molécula de éste y esto resulta en una similitud entre sus constantes de interacción ($K_{b1} \approx K_{b2}$).



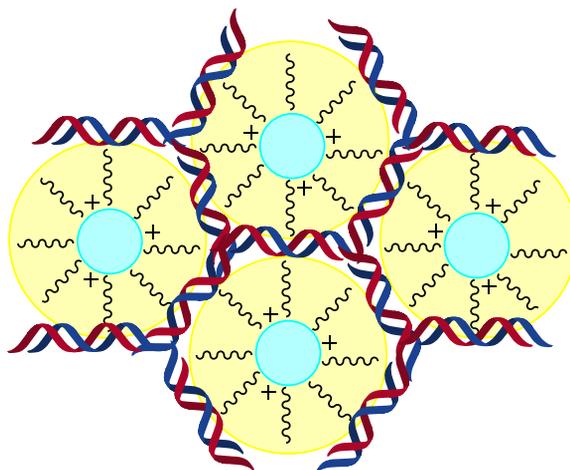
Esquema 1.17. Representación del fenómeno de cooperatividad en receptores (proteínas, ADN, etc) desde un estado elongado (T) a un estado más compacto (R).

Como resultado de las interacciones entre los monómeros de tensioactivos catiónicos y el polinucleótido, se produce el fenómeno de compactación, donde se produce un cambio conformacional del ADN desde un estado de doble hélice totalmente extendida a un estado globular, como anteriormente se ha descrito.

1.9.2 Interacciones de micelas constituidas por tensioactivos con ADN

Las características de estos y otros agregados de moléculas anfifílicas ya han sido detalladas en esta memoria. En esta sección, nos centraremos en sus interacciones en presencia de polímeros tales como el ADN. Particularmente, se trata de un tema que necesita ser estudiado, debido a la falta de información en la bibliografía. Por lo tanto, surgen dudas acerca de este tipo de interacciones, ya que las micelas son agregados dinámicos de monómeros y estos pueden unirse al ADN y resulta difícil cuantificar las contribuciones correspondientes a cada de las partes de estos sistemas. Sin embargo, recientemente se ha publicado un trabajo donde se ha estudiado la variación de la CMC de metalomicelas derivadas del tris(2,2'-bipiridil) rutenio (II) ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) en presencia de ADN, demostrando que a una determinada concentración de polinucleótido ambas estructuras interactúan con éste.⁸⁴ También existen algunos estudios previos de miceloplejos, es decir, complejos formados por micelas poliméricas y ADN. Este tipo de micelas se caracterizan por contener copolímeros de bloque (bloques poliméricos dispuestos en una secuencia lineal) de longitud variable. Cuando la longitud del copolímero es mayor que el radio de la micela, la estructura de ésta difiere de la de micelas convencionales formadas por tensioactivos. Los resultados sugieren que la interacción entre estas micelas y el polinucleótido depende de la longitud del copolímero y de la relación de concentración micela/ADN, formándose

miceloplejos bajo un control cinético o un control termodinámico, donde la relación de cargas y la fuerza iónica juegan un papel fundamental.⁸⁵ La formación de estos complejos se debe a la asociación del polinucleótido en la superficie de las micelas, actuando como un puente de unión entre estos agregados (ver *Esquema 1.18*).



Esquema 1.18. Interacciones entre micelas poliméricas catiónicas y ADN (miceloplejos).

1.9.3 Interacciones de liposomas constituidos por tensioactivos con ADN

Normalmente el nombre que se emplea para los complejos resultantes de las interacciones entre liposomas y ADN es el de lipoplejo, que procede de la traducción del término original en inglés (*lipoplex*) y fue introducido en 1997 por P. L. Felgner y colaboradores.⁸⁶ Se utiliza para denominar a los complejos formados por un ácido nucleico (ADN, ARN u oligonucleótidos sintéticos) y una composición lipídica en la que se encuentra una proporción de lípido cargado positivamente. Dicha carga neta positiva en la superficie del liposoma asegura la estabilidad de la formulación, una característica que se

pierde gradualmente cuando la carga superficial se encuentra próxima a la neutralidad, promoviendo fenómenos de agregación y fusión.

La teoría DLVO fue desarrollada por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek en torno a los años 40^{87,88} y permite explicar la estabilidad de las suspensiones coloidales. Dicha estabilidad es el balance entre dos componentes, fuerzas repulsivas de origen electrostático y fuerzas atractivas de London-van der Waals. La repulsión electrostática es significativa cuando dos partículas coloidales se acercan y sus dobles capas eléctricas se solapan. El término atractivo corresponde a las interacciones de London-Van der Waals y es el resultado de las fuerzas entre las moléculas en cada partícula coloidal y son aditivas. Por tanto, el valor neto de la interacción puede ser atractivo o repulsivo en función de la magnitud de estas dos fuerzas. Además, la interacción entre las partículas depende de la distancia, y suponiendo que las partículas que interactúan son muy grandes comparadas con los iones del polielectrolito de su alrededor, pueden permanecer inmóviles en la disolución. Asimismo, esta teoría considera que la distribución de carga en la superficie del lipoplejo es uniforme, de modo que no explica aquellos casos en los que la distribución sea irregular.

Sin embargo, cuando se adicionan polielectrolitos cargados sobre una disolución de partículas coloidales cargadas, se producen dos fenómenos: inversión de carga de la partícula y condensación del polielectrolito.⁸⁹ Este primer fenómeno ocurre cuando poliiones de carga contraria se depositan sobre la superficie de la partícula, pudiendo llegar a invertirse el signo de la carga efectiva de la partícula. En consecuencia, esta inversión coincide con un segundo proceso que consiste en la formación de agregados sobre la partícula y en la disolución. El tamaño de los agregados aumenta con la concentración del poli-ión hasta alcanzar un valor máximo que se corresponde con el punto en el que la carga de la partícula se anula. Si la concentración de poli-ión sigue creciendo, se invierte el signo de la carga y esta empieza a aumentar, y el tamaño vuelve a su valor inicial o un poco mayor debido al grosor del

polielectrolito depositado sobre la partícula. Además, la formación de los agregados no depende de la naturaleza de las especies implicadas. Este fenómeno se ha observado en multitud de sistemas tales como liposomas catiónicos interaccionando con polielectrolitos aniónicos⁸⁹ y en liposomas aniónicos-no iónicos (niosomas híbridos) interaccionando con polielectrolitos catiónicos.⁹⁰

El proceso de formación de los lipoplejos determina sus características fisicoquímicas y, consecuentemente, modula su actividad biológica. En los últimos años, se ha llevado a cabo un considerable esfuerzo para obtener los parámetros que afectan a la formación y la resultante estructura y morfología de estos complejos. Sin embargo, este mecanismo de formación de los lipoplejos es el primer paso necesario para entender como los complejos lípido/ADN liberan el material genético en las células, y es considerado una piedra angular para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de genes en el futuro. Estos complejos forman espontáneamente agregados supramoleculares cuyo tamaño oscila entre 100 nm a 1 μ m. Diferentes estudios han investigado la cinética de este proceso y es evidente la existencia de varias etapas.⁹¹ En un primer paso, que ocurre normalmente en cuestión de milisegundos,⁹² los grupos fosfatos cargados negativamente interaccionan con las cabezas catiónicas de los lípidos mediante interacciones electrostáticas,⁹⁴ que juegan un papel fundamental en la termodinámica de los complejos. En consecuencia, se produce un aumento de la entropía debido a la deshidratación y liberación de los contraiones unidos al ADN y a las superficies lipídicas hacia la disolución. La continua adición de liposomas hasta una determinada concentración y densidad de carga resulta en la fusión de las membranas lipídicas y la condensación del ADN. Como resultado, los lipoplejos son estables cuando alcanzan un punto isoeléctrico con una molécula de lípido catiónico por base de nucleótido cargada negativamente, es decir, cuando se produce un fenómeno de inversión de carga o sobrecarga que fue previsto por la teoría DLVO anteriormente mencionada.

En una segunda etapa, cuando se siguen añadiendo liposomas a los lipoplejos ya formados, se ha demostrado que un exceso de polinucleótido puede llegar a formar parte de estos complejos, mientras que un exceso de lípidos no puede. Esto puede ser explicado en base a una barrera energética repulsiva entre las cargas electrostáticas positivas de los liposomas y los lipoplejos formados, que supera las fuerzas de London-van der Waals atractivas de corto alcance y evita la agregación y fusión de la membrana lipídica.⁹³

La cinética de agregación puede ser modulada mediante la concentración total de los componentes y la temperatura, mientras que la estabilidad de estos agregados depende de sus interacciones. Estas pueden ser controladas mediante el tipo de lípido (y en el caso de las mezclas, la composición de la monocapa) y la relación de carga, definida como la relación entre las cargas del lípido catiónico y las cargas del ADN (L/D), y, también, mediante las interacciones específicas entre las moléculas de ADN (hidrófobas y electrostáticas).

En especial, es importante controlar las interacciones electrostáticas y el balance de cargas en la formación de los lipoplejos, ya que determinan la aplicación de los liposomas como vectores eficientes en transfección génica. Es fundamental entender estas interacciones electrostáticas mediante la modificación de la composición de los liposomas. Esta composición en liposomas mixtos puede ser definida en función de la fracción molar de lípido catiónico (α), que es igual a la relación entre el número de moles de lípidos catiónicos y el número de moles de lípidos totales. Sin embargo, la composición en lipoplejos influye en el balance de cargas y puede ser variada con respecto al valor de L/D, anteriormente descrito. Como consecuencia, aparece un punto de electroneutralidad para cada valor de α , donde la carga efectiva (Z_{eff}) es igual 1 y por tanto, las cargas se igualan y el lipoplejo tendría una carga cero.

1.10 Nanotransportadores como vehículos en la liberación de fármacos

Recientemente, los nanosistemas han recibido especial atención en el campo de la Nanomedicina para la liberación de fármacos. Estos nanotransportadores se dirigen eficazmente hacia la zona afectada, controlando la biodistribución inespecífica de los medicamentos en las células y tejidos y su rápido metabolismo o excreción del cuerpo. Debido al impresionante progreso en Ciencia de Materiales y Farmacia, se ha diseñado una amplia gama de nanotransportadores con diversos tamaños, morfologías y propiedades. Se incluyen los liposomas,⁹⁴ nanopartículas poliméricas,⁹⁵ micelas,⁸⁴ dendrímeros,⁹⁶ nanopartículas de oro,⁹⁷ calixarenos⁹⁸ y estructuras mesoporosas.⁹⁹ El tamaño de estos vectores es a menudo pequeño (desde unas decenas a unos cientos de nanómetros) para permitir su administración parenteral (intravenosa, intraarterial, intramuscular y subcutánea) u oral y promover su difusión dentro de la célula. Además, nuevas metodologías de funcionalización de su superficie otorgan a los nanotransportadores la capacidad de controlar, al menos en parte, su farmacocinética y biodistribución. Un ejemplo es el caso de la PEGilación, que es el proceso de unión de cadenas de polietilenglicol (PEG), y que resulta en la repulsión estérica de las opsoninas de la sangre (moléculas, como los anticuerpos, que mejoran la fagocitosis) y proporciona una mayor vida útil *in vivo*. Además, causa una capacidad específica de extravasación a través del endotelio de los tejidos inflamados. Cuando se hace una funcionalización con ligandos biológicamente activos se facilita la selección de células específicas.

Actualmente, es un campo en auge y su principal objetivo es la mejora de la administración de fármacos, para hacerla más eficiente en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, Alzheimer, etc., intentando minimizar los efectos secundarios.

1.11 Objetivos

El principal objetivo de esta Tesis es la síntesis y caracterización de nanosistemas, basados en el uso de diversos calixarenos funcionalizados, con potencial uso como vectores no virales. Se ha investigado el uso de estos macrociclos como nanotransportadores tanto de ácido desoxirribonucleico como del agente antineoplásico doxorubicina.

1.12 Referencias bibliográficas

1. Rogers S, Lowenthal A, Terheggen HG, C. J. Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. *J. Exp. Med.* **137**, 1091–1096 (1973).
2. Shope, R. E. & Hurst, E. W. INFECTIOUS PAPILLOMATOSIS OF RABBITS : WITH A NOTE ON THE HISTOPATHOLOGY. *J. Exp. Med.* **58**, 607–624 (1933).
3. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, M. R. & Al., E. Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* **323**, 570–578 (1990).
4. Oh, E., Hong, J., Kwon, O. J. & Yun, C. O. A hypoxia- and telomerase-responsive oncolytic adenovirus expressing secretable trimeric TRAIL triggers tumour-specific apoptosis and promotes viral dispersion in TRAIL-resistant glioblastoma. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
5. Poletti, V. *et al.* Preclinical Development of a Lentiviral Vector for Gene Therapy of X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **9**, 257–269 (2018).
6. Ricordel, M. *et al.* Vaccinia Virus Shuffling: deVV5, a Novel Chimeric Poxvirus with Improved Oncolytic Potency. *Cancers (Basel)*. **10**, 231 (2018).
7. Rakoczy, E. P. *et al.* Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 year follow-up of a phase 1 randomised clinical trial. *Lancet* **386**, 2395–2403 (2015).
8. Gottardo, M. F. *et al.* Baculovirus-based gene silencing of Humanin for the treatment of pituitary tumors. *Apoptosis* **23**, 143–151 (2018).
9. Jin, Y. *et al.* Cholangiocarcinoma: molecular imaging-guided radiofrequency hyperthermia-enhanced intratumoral herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy. *Am. J. Cancer Res.* **8**, 502–513 (2018).

10. Konishi, M., Kawamoto, K., Izumikawa, M., Kuriyama, H. & Yamashita, T. Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors. *J. Gene Med.* **10**, 610–618 (2008).
11. Vigna, E. & Naldini, L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J. Gene Med.* **2**, 308–316 (2000).
12. Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein, M. & Abedi, M. R. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide To 2017 - an Update. *J. Gene Med.* e3015 (2018). doi:10.1002/jgm.3015
13. Niemann, J. & Kühnel, F. Oncolytic viruses: adenoviruses. *Virus Genes* **53**, 700–706 (2017).
14. Bergen, J. M., Park, I. K., Horner, P. J. & Pun, S. H. Nonviral approaches for neuronal delivery of nucleic acids. *Pharm. Res.* **25**, 983–998 (2008).
15. Gao, X., Kim, K.-S. & Liu, D. Nonviral gene delivery: What we know and what is next. *AAPS J.* **9**, E92–E104 (2007).
16. Alsaggar, M. & Liu, D. Physical Methods for Gene Transfer. in **88**, 1–24 (Advances in Genetics, 2015).
17. Peking, P. *et al.* A Gene Gun-mediated Nonviral RNA trans-splicing Strategy for Col7a1 Repair. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **5**, e287 (2016).
18. Zhao, R. *et al.* Ultrasound assisted gene and photodynamic synergistic therapy with multifunctional FOXA1-siRNA loaded porphyrin microbubbles for enhancing therapeutic efficacy for breast cancer. *Biomaterials* **173**, 58–70 (2018).
19. Sun, Y. *et al.* Coinjection of IL2 DNA enhances E7-specific antitumor immunity elicited by intravaginal therapeutic HPV DNA vaccination with electroporation. *Gene Ther.* **24**, 408–415 (2017).
20. Dul, M. *et al.* Hydrodynamic gene delivery in human skin using a hollow microneedle device. *J. Control. Release* **265**, 120–131 (2017).
21. Rahmathulla, G. *et al.* MRI-guided laser interstitial thermal therapy in neuro-

- oncology: a review of its current clinical applications. *Oncology* **87**, 67–82 (2014).
22. Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y. & He, N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics* **4**, 240–255 (2014).
 23. Zhang, S. *et al.* Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J. Control. Release* **100**, 165–180 (2004).
 24. Edinger, D. & Wagner, E. Bioresponsive polymers for the delivery of therapeutic nucleic acids. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **3**, 33–46 (2011).
 25. Schaffert, D. & Wagner, E. Gene therapy progress and prospects: Synthetic polymer-based systems. *Gene Ther.* **15**, 1131–1138 (2008).
 26. Wu, G. Y. & Wu, C. H. Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J. Biol. Chem.* **263**, 14621–14624 (1988).
 27. Rudolph, C., Lausier, J., Naundorf, S., Müller, R. H. & Rosenecker, J. In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. *J. Gene Med.* **2**, 269–278 (2000).
 28. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Release* **114**, 100–109 (2006).
 29. Ando, S., Putnam, D., Pack, D. W. & Langer, R. PLGA microspheres containing plasmid DNA: Preservation of supercoiled DNA via cryopreparation and carbohydrate stabilization. *J. Pharm. Sci.* **88**, 126–130 (1999).
 30. Fu, K., Pack, D. W., Klibanov, A. M. & Langer, R. Visual Evidence of Acidic Environment Within Degrading Poly(lactic-co-glycolic) (PLGA) Microspheres. *Pharm. Res.* **17**, 100–106 (2000).
 31. Haladjova, E., Rangelov, S., Tsvetanov, C. B. & Pispas, S. DNA encapsulation via nanotemplates from cationic block copolymer micelles. *Soft Matter* **8**, 2884–2889 (2012).

32. Vonarbourg, A. *et al.* The encapsulation of DNA molecules within biomimetic lipid nanocapsules. *Biomaterials* **30**, 3197–3204 (2009).
33. Jeffs, L. B. *et al.* A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. *Pharm. Res.* **22**, 362–372 (2005).
34. Jaganathan, H., Gieseck, R. L. & Ivanisevic, A. Transverse Relaxivity Changes after Layer-by-Layer Encapsulation of Multicomponent DNA Templated Nanostructures. *J. Phys. Chem. C* **114**, 22508–22513 (2010).
35. Okada, T., Kaneko, T., Hatakeyama, R. & Tohji, K. Electrically triggered insertion of single-stranded DNA into single-walled carbon nanotubes. *Chem. Phys. Lett.* **417**, 288–292 (2006).
36. Wang, L., Zhao, W. & Tan, W. Bioconjugated silica nanoparticles: Development and applications. *Nano Res.* **1**, 99–115 (2008).
37. Ibraheem, D., Elaissari, A. & Fessi, H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int. J. Pharm.* **459**, 70–83 (2014).
38. Singh, M., Briones, M., Ott, G. & O’Hagan, D. Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 811–816 (2000).
39. Kasturi, S. P., Sachaphibulkij, K. & Roy, K. Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles for delivery of plasmid DNA vaccines. *Biomaterials* **26**, 6375–6385 (2005).
40. Oster, C. G. *et al.* Cationic microparticles consisting of poly(lactide-co-glycolide) and polyethylenimine as carriers systems for parental DNA vaccination. *J. Control. Release* **104**, 359–377 (2005).
41. Rosenberg, S. A. *et al.* Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *N. Engl. J. Med.* **323**, 570–578 (1990).
42. Blaese, R. M. *et al.* T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science (80-)*. **270**, 475–480 (1995).

43. Sevimli, S. *et al.* The endocytic pathway and therapeutic efficiency of doxorubicin conjugated cholesterol-derived polymers. *Biomater. Sci.* **3**, 323–335 (2015).
44. Lederberg, J. Cell Genetics and Hereditary Symbiosis. *Physiol. Rev.* **32**, 403–430 (1952).
45. Rosenberg, S. A. *et al.* Inability to Immunize Patients with Metastatic Melanoma Using Plasmid DNA Encoding the gp100 Melanoma-Melanocyte Antigen. *Hum. Gene Ther.* **14**, 709–714 (2003).
46. Gurunathan, S., Klinman, D. M. & Seder, R. A. DNA Vaccines: Immunology, Application, and Optimization. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 927–974 (2000).
47. Alton, E. *et al.* Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* **353**, 947–954 (1999).
48. Yoshikawa, K., Takahashi, M., Vasilevskaya, V. V. & Khokhlov, A. R. Large Discrete Transition in a Single DNA Molecule Appears Continuous in the Ensemble. *Phys. Rev. Lett.* **76**, 3029–3031 (1996).
49. Akitaya, T. *et al.* Weak interaction induces an ON/OFF switch, whereas strong interaction causes gradual change: Folding transition of a long duplex DNA chain by poly-L-lysine. *Biomacromolecules* **8**, 273–278 (2007).
50. Zinchenko, A. A., Sakaue, T., Araki, S., Yoshikawa, K. & Baigl, D. Single-Chain Compaction of Long Duplex DNA by Cationic Nanoparticles: Modes of Interaction and Comparison with Chromatin. *J. Phys. Chem. B* **111**, 3019–3031 (2007).
51. Chen, W., Turro, N. J. & Tomalia, D. A. Using Ethidium Bromide To Probe the Interactions between DNA and Dendrimers. *Langmuir* **16**, 15–19 (2000).
52. Mel'nikov, S. M., Sergeev, V. G. & Yoshikawa, K. Discrete Coil—Globule Transition of Large DNA Induced by Cationic Surfactant. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2401–2408 (1995).
53. Yoshikawa, K. Controlling the higher-order structure of giant DNA

- molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52**, 235–244 (2001).
54. Flock, S., Labarbe, R. & Houssier, C. Dielectric constant and ionic strength effects on DNA precipitation. *Biophys. J.* **70**, 1456–1465 (1996).
 55. Wilson, R. W. & Bloomfield, V. A. Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid. A light-scattering study. *Biochemistry* **18**, 2192–2196 (1979).
 56. Mayama, H., Iwataki, T. & Yoshikawa, K. Thermodynamics in the folding phase-transition of single T4DNA molecules in poly(ethylene glycol) solution. *Chem. Phys. Lett.* **318**, 113–117 (2000).
 57. Yamasaki, Y. & Yoshikawa, K. Higher order structure of DNA controlled by the redox state of Fe²⁺/Fe³⁺. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 10573–10578 (1997).
 58. Makita, N. & Yoshikawa, K. Proton concentration (pH) switches the higher-order structure of DNA in the presence of spermine. *Biophys. Chem.* **99**, 43–53 (2002).
 59. Makita, N. & Yoshikawa, K. ATP/ADP switches the higher-order structure of DNA in the presence of spermidine. *FEBS Lett.* **460**, 333–337 (1999).
 60. Conwell, C. C., Vilfan, I. D. & Hud, N. V. Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 9296–9301 (2003).
 61. Bloomfield, V. A. DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers* **44**, 269–282 (1997).
 62. Gelbart, W. M. *Electrostatic Effects in Soft Matter and Biophysics*. (Springer, Netherlands, 2001).
 63. Shinkai, S., Araki, K., Koreishi, H., Tsubaki, T. & Manabe, O. On the Acidity of the Hydroxyl Groups in Calix[4]arenes and the Dissociation-dependent Conformational Change. *Chem. Lett.* **15**, 1351–1354 (1986).
 64. Perret, F., Bonnard, V., Danylyuk, O., Suwinska, K. & Coleman, A. W. Conformational extremes in the supramolecular assemblies of para-sulfonato-calix[8]arene. *New J. Chem.* **30**, 987–990 (2006).

65. Ma, X. & Zhao, Y. Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host–Guest Interactions. *Chem. Rev.* **115**, 7794–7839 (2015).
66. Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes (2nd Edition)*. (John Wiley & Sons, New York, 1980).
67. Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J. & Ninham, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **72**, 1525–1568 (1976).
68. Joseph, M., Trinh, H. M. & Mitra, A. K. Peptide and Protein-Based Therapeutic Agents*. in *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices* 145–167 (Elsevier, 2017).
69. Bangham, A. D. & Horne, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* **8**, 660–668 (1964).
70. Laouini, A. *et al.* Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **1**, 147–168 (2012).
71. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238–52 (1965).
72. Szoka, F. & Papahadjopoulos, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 4194–8 (1978).
73. Pick, U. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 186–194 (1981).
74. Shew, R. L. & Deamer, D. W. A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **816**, 1–8 (1985).
75. Betageri, G. V. & Parsons, D. L. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. *Int. J. Pharm.* **81**, 235–241 (1992).
76. Kim, S., Jacobs, R. E. & White, S. H. Preparation of multilamellar vesicles of defined size-distribution by solvent-spherule evaporation. *Biochim. Biophys.*

- Acta* **812**, 793–801 (1985).
77. Bangham, A. D., De Gier, J. & Greville, G. D. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. *Chem. Phys. Lipids* **1**, 225–246 (1967).
 78. Payne, N. I., Ambrose, C. V., Timmins, P., Ward, M. D. & Ridgway, F. Proliposomes: A Novel Solution to an Old Problem. *J. Pharm. Sci.* **75**, 325–329 (1986).
 79. Shinkai, S., Mori, S., Koreishi, H., Tsubaki, T. & Manabe, O. Hexasulfonated calix[6]arene derivatives: a new class of catalysts, surfactants, and host molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2409–2416 (1986).
 80. Zhu, D. M. & Evans, R. K. Molecular mechanism and thermodynamics study of plasmid DNA and cationic surfactants interactions. *Langmuir* **22**, 3735–3743 (2006).
 81. Bathaie, S. Z., Moosavi-Movahedi, A. A. & Saboury, A. A. Energetic and binding properties of DNA upon interaction with dodecyl trimethylammonium bromide. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1001–5 (1999).
 82. Kollman, P. A. & Allen, L. C. Theory of the hydrogen bond. *Chem. Rev.* **72**, 283–303 (1972).
 83. Herskovits, T. T. Nonaqueous Solutions of DNA; Denaturation by Urea and Its Methyl Derivatives *. *Biochemistry* **2**, 335–340 (1963).
 84. Lebrón, J. A. *et al.* Preparation and characterization of metallomicelles of Ru(II). Cytotoxic activity and use as vector. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **175**, 116–125 (2019).
 85. Jiang, Y. *et al.* Complexation of Linear DNA and Poly(styrenesulfonate) with Cationic Copolymer Micelles: Effect of Polyanion Flexibility. *J. Phys. Chem. B* **121**, 6708–6720 (2017).
 86. Felgner, P. L. *et al.* Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum. Gene Ther.* **8**, 511–2 (1997).
 87. Derjaguin, B. & Landau, L. Theory of the stability of strongly charged

- lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Prog. Surf. Sci.* **43**, 30–59 (1993).
88. Verwey, E. J. W. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *J. Phys. Colloid Chem.* **51**, 631–636 (1947).
89. Bordi, F., Cametti, C., Sennato, S. & Viscomi, D. Polyion-induced liposomal vesicle aggregation: A radiowave dielectric relaxation study. *J. Chem. Phys.* **126**, 024902 (2007).
90. Sennato, S. *et al.* Hybrid niosome complexation in the presence of oppositely charged polyions. *J. Phys. Chem. B* **112**, 3720–3727 (2008).
91. Pozharski, E. V. & MacDonald, R. C. Single lipoplex study of cationic lipid-DNA, self-assembled complexes. *Mol. Pharm.* **4**, 962–974 (2007).
92. Barreleiro, P. C. A., May, R. P. & Lindman, B. Mechanism of formation of DNA–cationic vesicle complexes. *Faraday Discuss.* **122**, 191–201 (2003).
93. Caracciolo, G. & Amenitsch, H. Cationic liposome/DNA complexes: from structure to interactions with cellular membranes. *Eur. Biophys. J.* **41**, 815–829 (2012).
94. Lei, M. *et al.* Dual-functionalized liposome by co-delivery of paclitaxel with sorafenib for synergistic antitumor efficacy and reversion of multidrug resistance. *Drug Deliv.* **26**, 262–272 (2019).
95. Kumari, A., Yadav, S. K. & Yadav, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **75**, 1–18 (2010).
96. Pan, J. *et al.* Polyamidoamine dendrimers-based nanomedicine for combination therapy with siRNA and chemotherapeutics to overcome multidrug resistance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **136**, 18–28 (2019).
97. Fratoddi, I. *et al.* Effects of topical methotrexate loaded gold nanoparticle in cutaneous inflammatory mouse model. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **17**, 276–286 (2019).
98. Cagil, E. M., Hameed, O. & Ozcan, F. Production of a new platform based

calixarene nanofiber for controlled release of the drugs. *Mater. Sci. Eng. C* **100**, 466–474 (2019).

99. Yang, P., Gai, S. & Lin, J. Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 3679–3698 (2012).

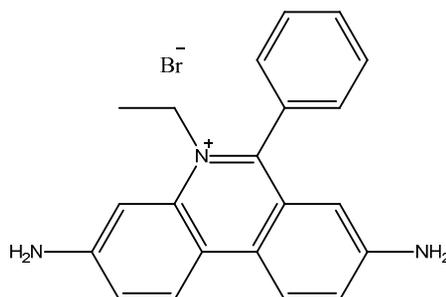
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Los reactivos utilizados en este trabajo de investigación son los que se detallan a continuación:

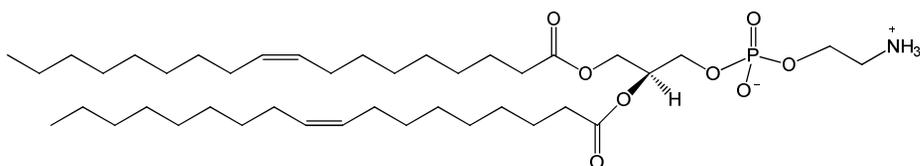
- **Cacodilato sódico trihidratado** ($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) fue adquirido en Sigma- Aldrich (CAS: 6131-99-3).
- **Cloroformo** (CHCl_3) fue adquirido en Merck (CAS: 67-66-3).
- **Cloruro sódico** (NaCl) fue adquirido en Merck (CAS: 7647-14-5).
- **Sal sódica del ácido 4-(2-Hidroxiethyl)piperazin-1-etanosulfónico (HEPES)**: $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}$) fue adquirida en Sigma Aldrich (CAS: 75277-39-3).
- **Metanol** (CH_3OH) para espectroscopía Uvasol® fue adquirido en Merck (CAS: 67-56-1).
- **Acetato de etilo** ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) para espectroscopía Uvasol® fue adquirido en Merck (CAS: 141-78-6).
- **Nitrobenceno** ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$) fue adquirido en Sigma Aldrich (CAS: 98-95-3).

- **Bromuro de etidio (EtBr: C₂₁H₂₀BrN₃)** fue adquirido en Sigma Aldrich (CAS: 1239-45-8). Es una sonda plana fluorescente que destaca por su unión espontánea al ADN¹ (Esquema 2.1).



Esquema 2.1. Estructura del bromuro de etidio (EtBr).

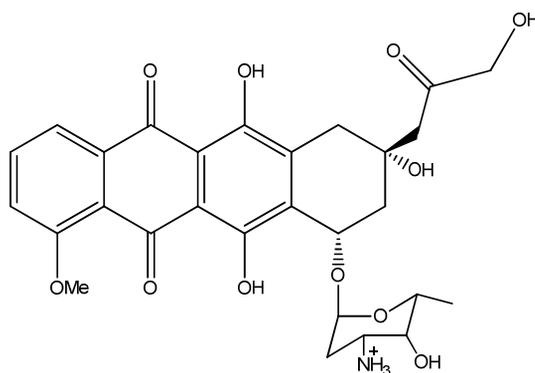
- **1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE: C₄₁H₇₈NO₈P)** fue adquirido en Avanti Polar Lipids (CAS: 4004-05-1). Se trata de un fosfolípido zwitteriónico a pH fisiológico (pH= 7.4), perteneciente a la familia de las glicerofosfato etanolaminas que consiste en dos cadenas de ácido oleico (18 átomos de C) en las posiciones C-1 y C-2 del esqueleto del glicerol (ver Esquema 2.2).



Esquema 2.2. Estructura del 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

- **Doxorrubicina·HCl (DOX·HCl: C₂₇H₂₉NO₁₁·HCl)** fue adquirida en Enzo Life Sciences (CAS: 25316-40-9). Es un antineoplásico de

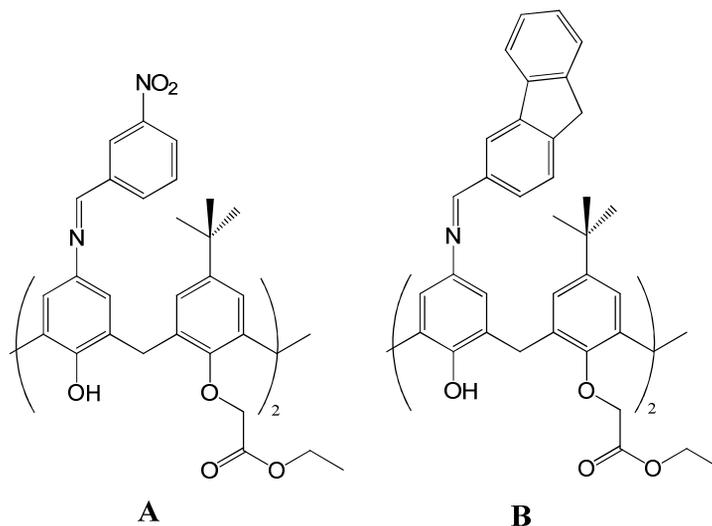
amplio espectro derivado de la familia de las antraciclinas y su principal función es inhibir la acción de la topoisomerasa II, la cual está implicada en la división y el crecimiento celular (*Esquema 2.3*).



Esquema 2.3. Estructura de la doxorubicina·HCl (DOX·HCl) cargada positivamente a pH= 7.4.

- **Calixarenos-Schiff**

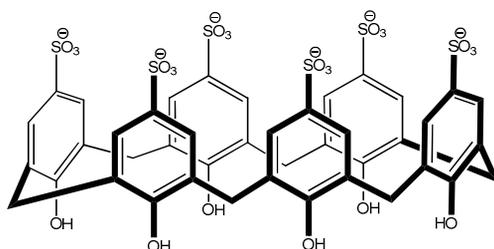
Se caracterizan por la presencia en el borde superior o inferior de un grupo funcional imina ($R_1R_2C=NR_3$), donde R_3 puede ser un H o un grupo arilo o alquilo. Esto ha resultado en la formación de receptores que han mostrado un gran potencial en el reconocimiento de cationes, particularmente con metales de transición.² En el presente estudio, se han empleado dos tipos de calixarenos neutros a pH= 7.4, que han sido sintetizados por el grupo de la Dra. Mary Deasy en el Institute of Technology Tallaght, Dublín (Irlanda)^{3,4} y sus estructuras se muestran en el *Esquema 2.4*.



Esquema 2.4. Estructuras de los calixarenos-Schiff utilizados en esta tesis (**A:** 5,17-(3-nitrobenzilidenamino)-11,23-di-tert-butil-25,27-dietoxicarbonil metilenoxi-26,28-dihidroxicalex[4]areno ($C_{58}H_{60}N_4O_{12} \cdot H_2O$) y **B:** 5,17-(9H-Fluoren-2-il)metilenamino)-11,23-ditert-butil-25,27 dietoxicarbonil metilenoxi-26,28-dihidroxicalex[4]areno ($C_{72}H_{70}N_2O_8 \cdot H_2O$).

- **Calixarenos aniónicos**

p-sulfonatocalix[6]areno hidratado ($C_{42}H_{36}O_{24}S_6 \cdot xH_2O$), fue adquirido en Alfa Aesar (CAS: 205652-55-7) (*Esquema 2.5*).

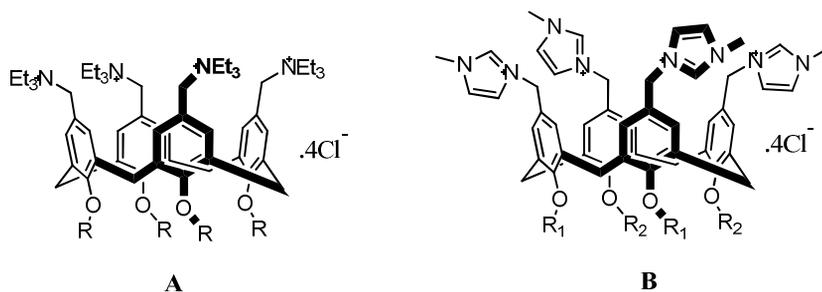


Esquema 2.5. Estructura del calix[6]areno aniónico.

- **Calixarenos catiónicos**

Se han empleado una serie de calix[4]arenos cargados positivamente con carácter anfifílico, variando la longitud de las cadenas alquílicas en el borde inferior y la naturaleza del grupo catiónico (amonio o metilimidazolinio) en el borde superior, como se muestra en el *Esquema 2.6*. Los macrociclos que se encuentran funcionalizados en su borde superior con un grupo metilimidazolinio y 4 cadenas de 12 y 16 átomos de C, respectivamente en su borde inferior, han sido adquiridos en Life Chemicals. Sin embargo, el calixareno que posee un grupo metilimidazolinio en su borde superior y 2 cadenas de 3 átomos de C + 2 cadenas de 16 átomos de C en su borde inferior ha sido sintetizado por el grupo del Dr. Vitaly Kalchenko del Institute of Organic Chemistry of the National Academy of Sciences (NAS), Kiev (Ucrania). Todos estos macrociclos se muestran en el *Esquema 2.6B*. A continuación, se muestra su nomenclatura, fórmula química y abreviatura utilizada en esta memoria:

- Tetracloruro de 5,11,17,23-Tetra(3-metilimidazolinio)-metilen-25,26,27,28-tetradodeciloxicalix[4]areno ($C_{96}H_{148}Cl_4N_8O_4$ con **ID de producto** (F1170-0374): $(Im_{12})_4$)
- Tetracloruro de 5,11,17,23-Tetra(3-metilimidazolinio)-metilen-25,27-dihexadeciloxi-26,28-dipropoxicalix[4]areno ($C_{86}H_{128}Cl_4N_8O_4$: $(Im_{16}Im_3)_2$)
- Tetracloruro de 5,11,17,23-Tetra(3-metilimidazolinio)-metilen-25,26,27,28-tetrahexadeciloxicalix[4]areno ($C_{112}H_{180}Cl_4N_8O_4$ con **ID de producto** (F1170-0375): $(Im_{16})_4$)

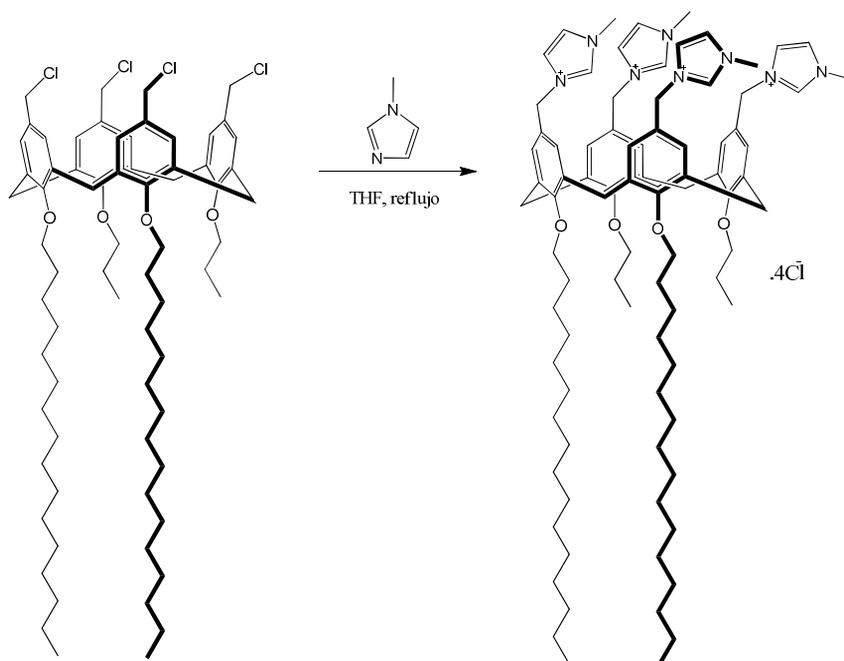


R = (CH₂)₁₁CH₃ (TEAC4)

i) R ₁ = (CH ₂) ₁₁ CH ₃	R ₂ = (CH ₂) ₁₁ CH ₃	(Im ₁₂) ₄
ii) R ₁ = (CH ₂) ₁₅ CH ₃	R ₂ = (CH ₂) ₂ CH ₃	(Im ₁₆ Im ₃) ₂
iii) R ₁ = (CH ₂) ₁₅ CH ₃	R ₂ = (CH ₂) ₁₅ CH ₃	(Im ₁₆) ₄

Esquema 2.6. Estructura de los macrociclos catiónicos utilizados en esta memoria.

A continuación, se muestra en el *Esquema 2.7*, la ruta sintética llevada a cabo para obtener el tetracloruro de 5,11,17,23-Tetra(3-metilimidazolinio)-metileno-25,27-dihexadeciloxi-26,28-dipropoxicalix[4]areno (Im₁₆Im₃)₂.



Esquema 2.7. Ruta sintética del calix[4]areno catiónico ((Im₁₆Im₃)₂).

Tetracloruro de 5,11,17,23-Tetra(3-metilimidazolinio)-metilen-25,27-dihexadeciloxi-26,28-dipropoxicalix[4]areno (Im₁₆Im₃)₂. A una disolución de 260 mg de tetraclorometilcalix[4]areno⁵ (0.226 mmol) en tetrahidrofurano (8 mL) fue añadida una disolución de 135 mg de N-metil imidazol (1.60 mmol) en tetrahidrofurano (3 mL), bajo agitación. La mezcla de reacción fue llevada a reflujo durante 18 h. Después de ser enfriada esta mezcla, fue añadido 10 mL de dietil éter y esta mezcla fue agitada durante 2 h. El precipitado formado fue filtrado y redisoluto en metanol. El metanol fue evaporado a presión reducida (0.05 mm Hg, 20 °C, 4 h) para obtener un sólido de color ligeramente anaranjado (100 mg, 30%) (ver en *Figura 2.1*, *Figura 2.2* y *Figura 2.3*).

¹H NMR ((CD₃)₂S=O, 399.98 MHz) δ ppm: 0.94 y 0.81 (2 brt, 12H, -O-CH₂-CH₂-(CH₂)₁₃-CH₃, -O-CH₂-CH₂-CH₃), 1.44-1.09 (brs, 52H, 8H, -O-CH₂-CH₂-(CH₂)₁₃-CH₃), 1.84 (m, 8H, -O-CH₂-CH₂-(CH₂)₁₃-CH₃, O-CH₂-CH₂-CH₃), 3.16 (brd, 4H, ArCH_{eq}Ar), 3.89 y 3.69 (2 s, 12H, -N-CH₃), 3.90 y 3.81 (2 brt, 8H, -O-CH₂-CH₂-(CH₂)₁₃-CH₃, -O-CH₂-CH₂-CH₃), 4.28 (brd, 4H, ArCH_{ax}Ar), 5.28 y 5.16 (2 s, 8H, Ar-CH₂-N-), 7.03 y 6.84 (2 s, 8H, *m*-ArH), 7.92 y 7.78 (2 brs, 8H, **4-** y **5-imidazolil**), 9.76 y 9.72 (2 s, 4H, **2-Imidazolil**).

¹³C NMR ((CD₃)₂S=O, 125.71 MHz) δ ppm: 156.89, 156.43, 137.16, 136.98, 135.87, 134.92, 129.29, 129.16, 129.08, 128.97, 124.21, 124.15, 122.72, 122.50, 77.03, 75.28, 56.46, 51.98, 36.28, 31.78, 30.36, 30.15, 29.76, 29.71, 29.52, 29.19, 26.07, 23.28, 22.56, 14.31, 10.63.

ESI-MS (m/z) calculado para C₈₆H₁₂₈N₈O₄⁴⁺: 334.28; encontrado: 334.25

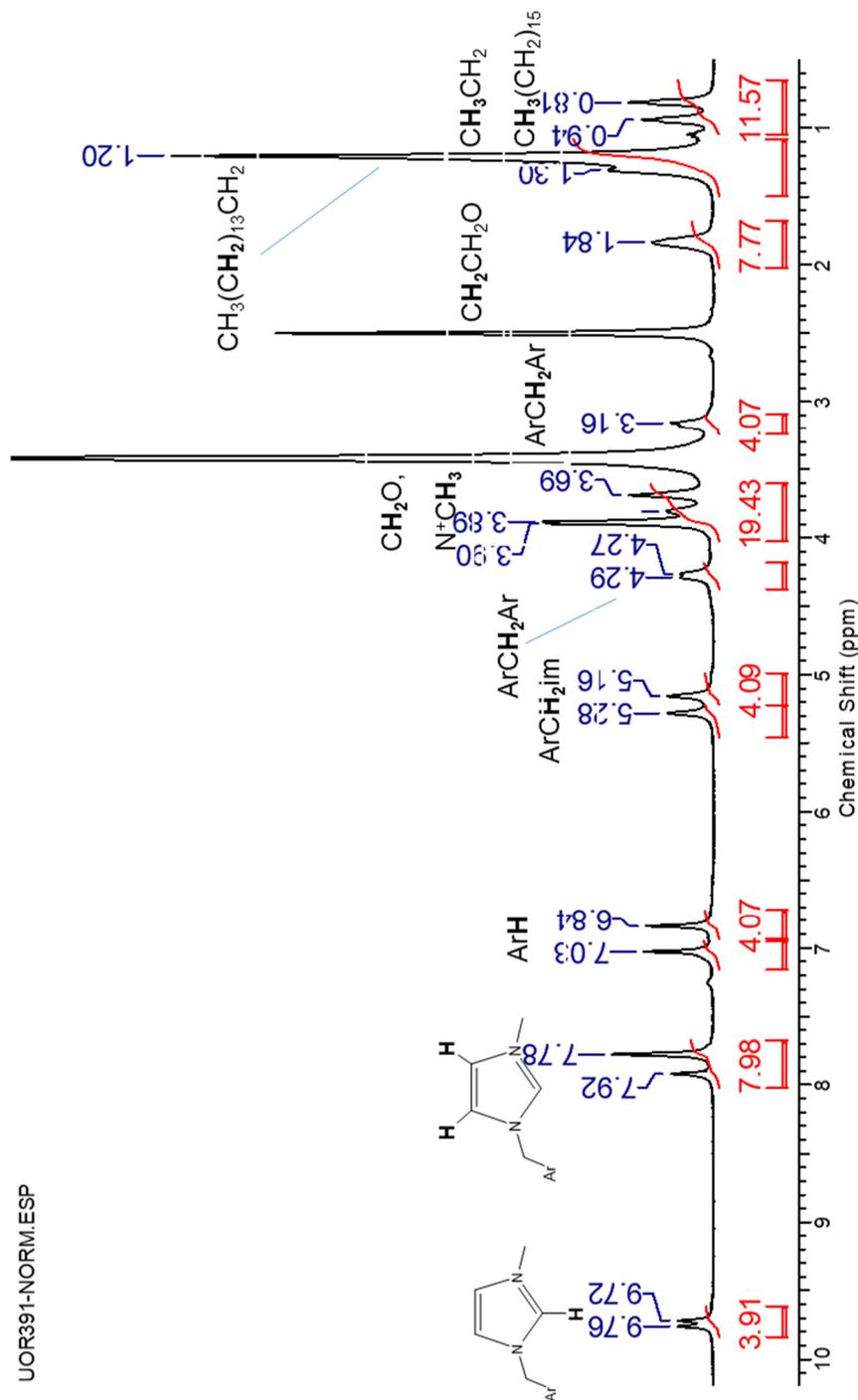


Figura 2.1. Espectro de ¹H NMR ((CD₃)₂S=O, 399.98 MHz) del tetracloruro de 5,11,17,23-Tetra(3-metilimidazolinio)-metilen-25,27-dihexadeciloxi-26,28-dipropoxicalix[4]areno (Im₁₆Im₃)₂

UOR391_C13_001001r

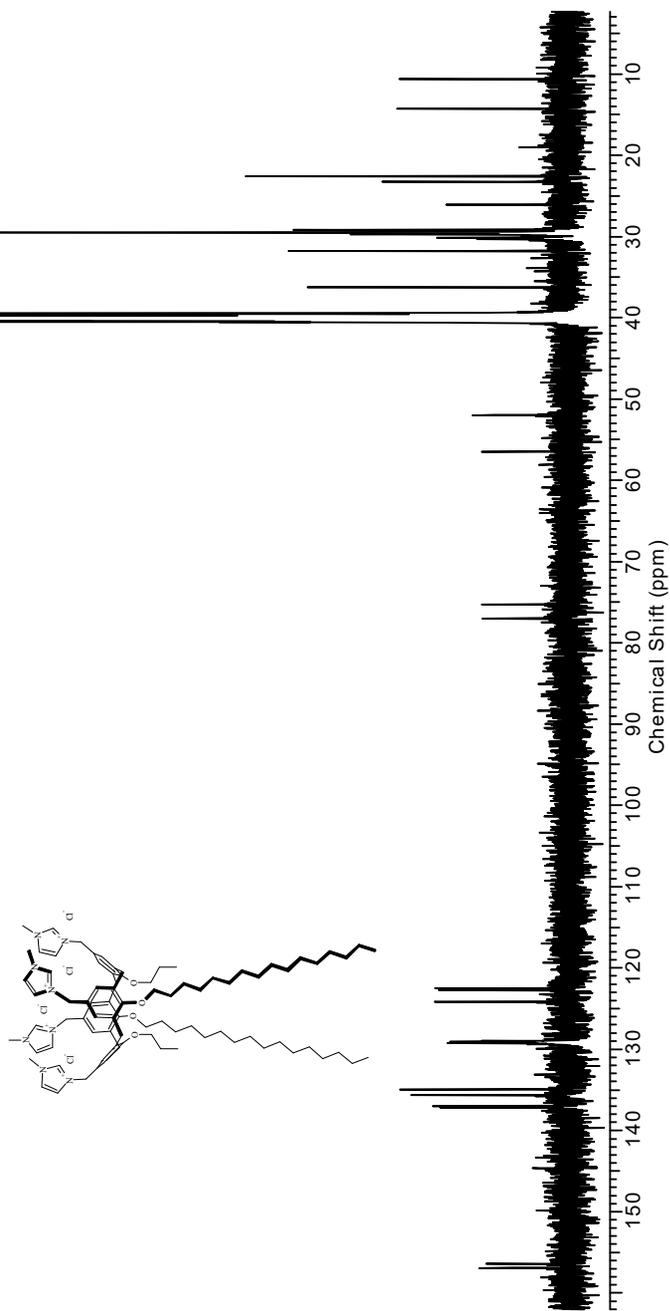


Figura 2.2. Espectro de ^{13}C NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{S}=\text{O}$, 125.71 MHz) del tetracloruro de 5,11,17,23-Tetra(3-metilimidazolinio)-metilen-25,27-dihexadeciloxi-26,28-dipropoxicalix[4]areno ($\text{Im}_{1,6}\text{Im}_3$)₂

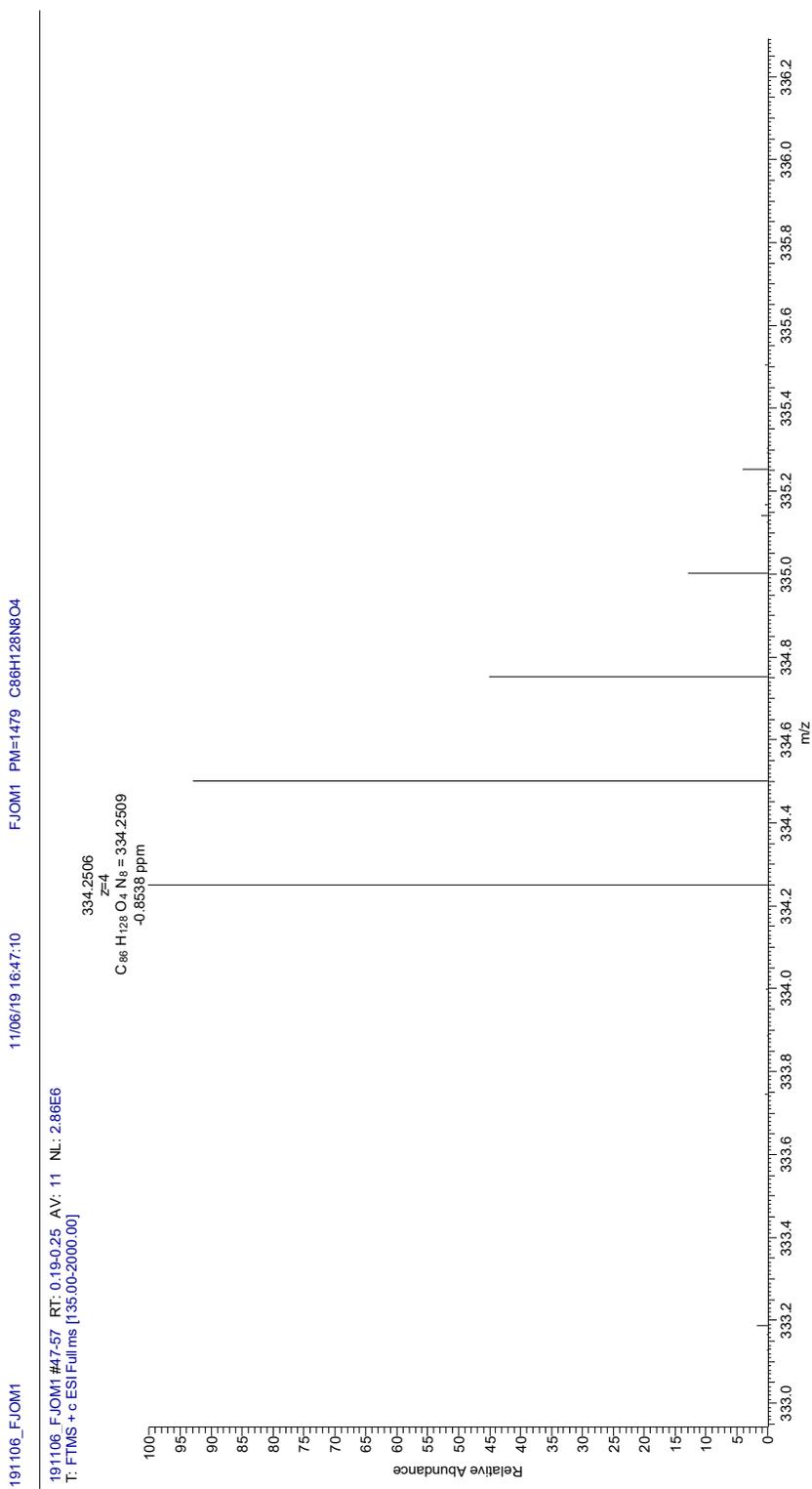
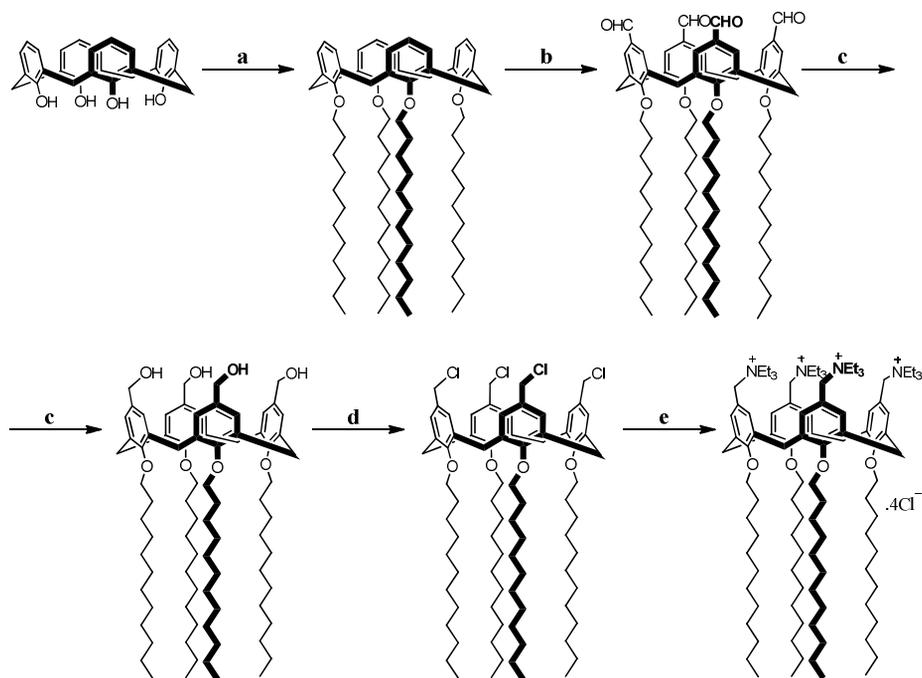


Figura 2.3. Espectro de masas del tetracloruro de 5,11,17,23-Tetra(3-metilimidazolino)-metilen-25,27-dihexadeciloxi-26,28-dipropoxicalix[4]areno ($(Im)_6Im_3)_2$

El calix[4]areno con grupos amonios fue sintetizado por el doctorando en colaboración con el grupo de la Dra. Inmaculada Robina Ramírez del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla (*Esquema 2.6A*).

Este vector lipídico basado en un calixareno policationico utilizado es el tetracloruro de 5,11,17,23-tetratrietilamonio-metilen-25,26,27,28-tetradodeciloxicalix[4]areno ($C_{104}H_{184}Cl_4N_4O_4$), referido en esta memoria como TEAC₄, se sintetizó como se describe en la literatura,⁶⁻⁸ aunque el paso de formilación se realizó utilizando un procedimiento ligeramente modificado al descrito en la bibliografía.^{7,8} Finalmente, la sal de amonio resultante de calix[4]areno se obtuvo por primera vez. A continuación, se detalla más en profundidad cada uno de los pasos (**a-e**) a seguir en la síntesis del receptor (*Esquema 2.8*):



a: DMF-NaH/10 min, n-C₁₂H₂₅Br/15 h a 80 °C ; **b:** HMTA, TFA/reflujo ; **c:** NaBH₄, EtOH, THF, r.t., 18 h ; **d:** SOCl₂, r.t., 18 h ; **e:** NEt₃, acetona/ reflujo, 2 días

Esquema 2.8. Ruta sintética del calix[4]areno catiónico (TEAC₄).

25,26,27,28-tetradodeciloicalix[4]areno (a). A una disolución de 2.22 g (5.22 mmol) de calix[4]areno en DMF anhidra (44 mL) fue añadido 0.97 g (24.8 mmol) de NaH (62 % en aceite). Después de agitar durante 10 min a temperatura ambiente, 6.23 g (24.8 mmol) de bromuro de dodecilo fueron añadidos. La mezcla fue agitada durante 15 h a 80 °C. Luego, el disolvente fue eliminado a presión reducida. Una mezcla de agua-hielo fue añadida a la mezcla de reacción y agitada durante 1 h. El precipitado resultante fue filtrado y lavado con agua y metanol. Este precipitado fue purificado mediante recristalización en cloroformo/metanol (2 veces) y secado a presión reducida para obtener 4.99 g (85%) de un sólido cristalino de color blanco.⁶

¹ H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ ppm: 0.89 (t, ³J = 6.68 Hz, 12H, CH₃(CH₂)₁₁O-), 1.27-1.33 (m, 72H, CH₃(CH₂)₉CH₂CH₂CH₂O-), 1.88-1.93 (m, 8H, CH₂CH₂O-), 3.14 (d, ²J = 13.38 Hz, 4 H, ArCH_{eq}Ar), 3.87 (t, ³J = 7.44 Hz, 8H, CH₂O-), 4.44 (d, ²J = 13.29 Hz, 4H, ArCH_{ax}Ar), 6.53-6.62 (m, 12H, H_{Ar}).

ESI-MS (m/z) calculado para C₇₆H₁₂₀O₄Na: 1119.91; encontrado: 1119.91

5,11,17,23-tetraformil-25,26,27,28-tetradodeciloicalix[4]areno (b). A una disolución de 4.61 g de hexametilentetramina (32.8 mmol) en TFA (42 mL) fue agitada a 100 °C durante 10 min. Luego, 1.00 g de 25,26,27,28-tetradodeciloicalix[4]areno (0.91 mmol) fue añadido y la mezcla fue agitada a reflujo durante 2 días. La mezcla fue enfriada a temperatura ambiente y luego, se vertió sobre una disolución 1 M de HCl (109 mL) y CH₂Cl₂ (37 mL), y se agitó vigorosamente durante 1 h. La mezcla fue extraída con CH₂Cl₂ (100 mL) y su fase orgánica fue lavada con una disolución saturada de NaHCO₃ y NaCl (100 mL) hasta pH= 7.4, secado sobre Na₂SO₄ y finalmente, el disolvente fue eliminado a presión reducida. Sin embargo, este procedimiento fue repetido una vez más para obtener un sólido de color amarillo (950 mg, 86%, R_f = 0.36 (EtOAc : CH, 3:7)).^{7,8}

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ ppm: 0.88 (t, $^3\text{J} = 6.54$ Hz, 12H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-$), 1.26-1.36 (m, 72H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 1.88 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.34 (d, $^2\text{J} = 13.95$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 3.96 (t, $^3\text{J} = 7.38$ Hz, 8H, $\text{CH}_2\text{O}-$), 4.49 (d, $^2\text{J} = 13.77$ Hz, 4H, $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{Ar}$), 7.15 (s, 8H, H_{Ar}), 9.58 (s, 4H, CHO).

ESI-MS (m/z) calculado para $\text{C}_{80}\text{H}_{120}\text{O}_8\text{Na}$: 1231.89; encontrado: 1231.89

5,11,17,23-tetrametilhidroxi-25,26,27,28-tetradodeciloicalix[4]areno (c).

Bajo atmósfera de argón, etanol absoluto (20 mL) fue añadido a una disolución en agitación de 950 mg de 5,11,17,23-tetraformil-25,26,27,28-tetradodeciloicalix[4]areno (0.79 mmol) en THF seco (4 mL). Luego, 1.02 g de NaBH_4 (27.5 mmol) fueron añadidos a 0°C y la mezcla se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. La mezcla fue disuelta en CH_2Cl_2 (43 mL) y se añadió posteriormente una disolución 1 M de HCl (79 mL) y fue agitada durante 1 h. Luego, la mezcla fue extraída en CH_2Cl_2 . La combinación de las fases orgánicas fue lavada con una disolución 1 M de HCl (3×100 mL) y una disolución saturada de NaHCO_3 y NaCl (300 mL) hasta $\text{pH} = 7.4$ y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente fue eliminado a presión reducida. El crudo de reacción fue purificado mediante columna de cromatografía (DCM : MeOH, 20 : 1 \rightarrow 15 : 1) para dar un sólido de color blanco (426 mg, 45%, $R_f = 0.28$ (DCM : MeOH, 15:1)).⁷

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ ppm: 0.88 (t, $^3\text{J} = 6.57$ Hz, 12H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-$), 1.27-1.36 (m, 72H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 1.93 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.16 (d, $^2\text{J} = 13.11$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 3.87 (t, $^3\text{J} = 7.56$ Hz, 8H, $\text{CH}_2\text{O}-$), 4.34 (s, 8H, ArCH_2OH), 4.43 (d, $^2\text{J} = 13.08$ Hz, 4H, $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{Ar}$), 6.76 (s, 8H, H_{Ar})

ESI-MS (m/z) calculado para $\text{C}_{80}\text{H}_{128}\text{O}_8\text{Na}$: 1239.96; encontrado: 1239.95

5,11,17,23-tetrametilcloruro-25,26,27,28-tetradodeciloxicalix[4]areno (d).

Bajo atmósfera de argón, 1.7 mL de cloruro de tionilo (24.0 mmol) fueron añadidos a 5,11,17,23-tetrametilhidroxi-25,26,27,28-tetradodeciloxicalix[4]areno (0.4 mmol) en CH₂Cl₂ seco (13 mL) y la mezcla fue agitada durante 18 h a temperatura ambiente. Ésta fue concentrada a presión reducida y el sólido resultante fue disuelto en CH₂Cl₂ (58 mL), lavado con una disolución saturada de NaHCO₃ hasta pH= 7.4 y secado sobre Na₂SO₄. El disolvente fue eliminado a presión reducida para obtener un sólido de color amarillo pálido (412 mg, 91%).⁷

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ ppm: 0.88 (t, ³J = 6.71 Hz, 12H, CH₃(CH₂)₁₁O-), 1.27-1.36 (m, 72H, CH₃(CH₂)₉CH₂CH₂CH₂O-), 1.89 (m, 8H, CH₂CH₂O-), 3.13 (d, ²J = 13.41 Hz, 4 H, ArCH_{eq}Ar), 3.86 (t, ³J = 7.50 Hz, 8H, CH₂O-), 4.30 (s, 8H, ArCH₂Cl), 4.40 (d, ²J = 13.26 Hz, 4H, ArCH_{ax}Ar), 6.65 (s, 8H, H_{Ar})

ESI-MS (m/z) calculado para C₈₀H₁₂₄Cl₄O₄Na: 1311.82; encontrado: 1311.81

Tetracloruro de 5,11,17,23-tetratrietilamonio-metilen-25,26,27,28-tetradodeciloxicalix[4]areno (TEAC4) (e).

Una disolución de 412 mg de 5,11,17,23-tetrametilcloruro-25,26,27,28-tetradodeciloxicalix[4]areno (0.32 mmol) y 2.3 mL de trietilamina (16 mmol) en acetona (66 mL) fue agitada a reflujo durante 2 días. Luego, la mezcla fue enfriada a temperatura ambiente y el disolvente fue eliminado a presión reducida hasta conservar aproximadamente 7 mL de disolvente. El precipitado resultante fue filtrado y lavado con acetona fría (15 mL) y secado a vacío para dar un sólido blanco (307 mg, 57 %) (ver en *Figura 2.4*, *Figura 2.5* y *Figura 2.6*).

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ ppm: 0.87 (t, ³J = 6.70 Hz, 12H, CH₃(CH₂)₁₁O-), 1.07-1.56 (m, 108H, CH₃(CH₂)₉CH₂CH₂CH₂O- and N⁺(CH₂CH₃)₃), 2.00 (m, 8H, CH₂CH₂O-), 3.32 (m, 21H, ArCH_{eq}Ar and N⁺(CH₂CH₃)₃), 3.86 (t, ³J

= 7.70 Hz, 8H, CH_2O -), 4.37 (d, $^2J = 12.63$ Hz, 4H, $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{Ar}$), 4.83 (s, 8H, $\text{ArCH}_2\text{NEt}_3$), 7.58 (s, 8H, H_{Ar})

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ ppm: 157.50, 135.25, 134.17, 122.83, 76.08, 62.81, 53.45, 32.08, 30.56, 30.15, 30.00, 29.97, 29.90, 29.55, 26.37, 22.82, 14.23, 8.76

ESI-MS (m/z) calculado para $\text{C}_{104}\text{H}_{184}\text{N}_4\text{O}_4^{4+}$: 388.60; encontrado: 388.61

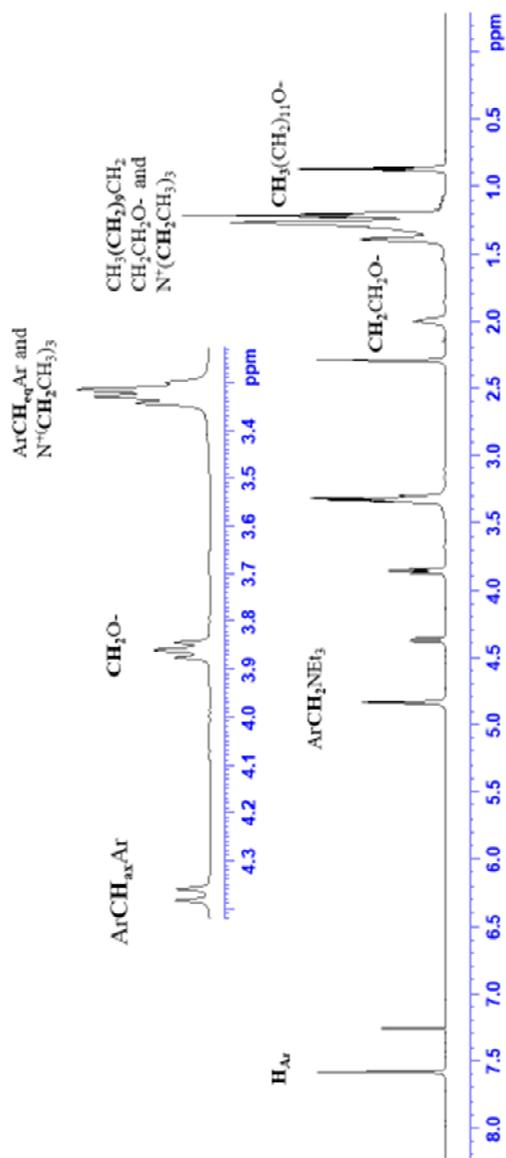


Figura 2.4. Espectro de ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) del tetrachloruro de 5,11,17,23-tetra-triethylammonio-metilen-25,26,27,28-tetradecilocalix[4]areno (TEAC4)

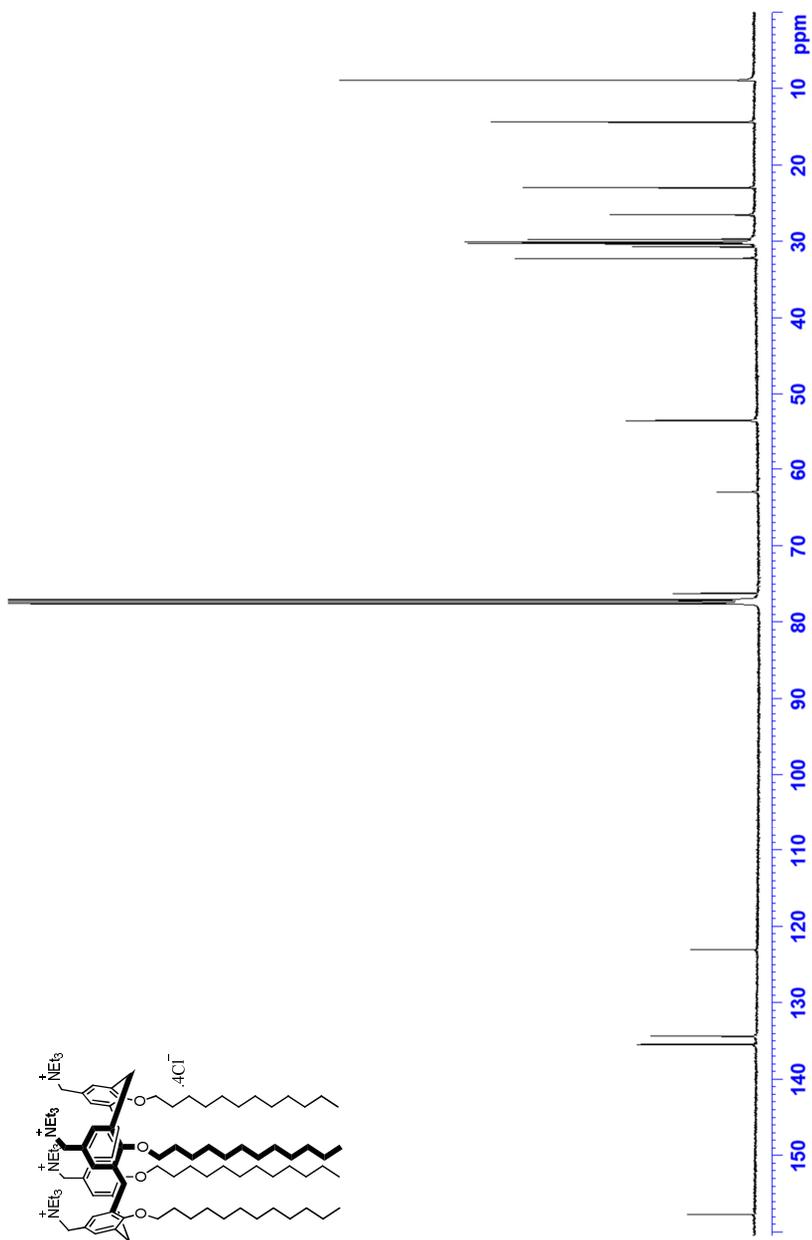


Figura 2.5. Espectro de ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) del tetracloruro de 5,11,17,23-tetratrietilamonio-metilen-25,26,27,28-tetradodeciloicalix[4]areno (TEAC4)

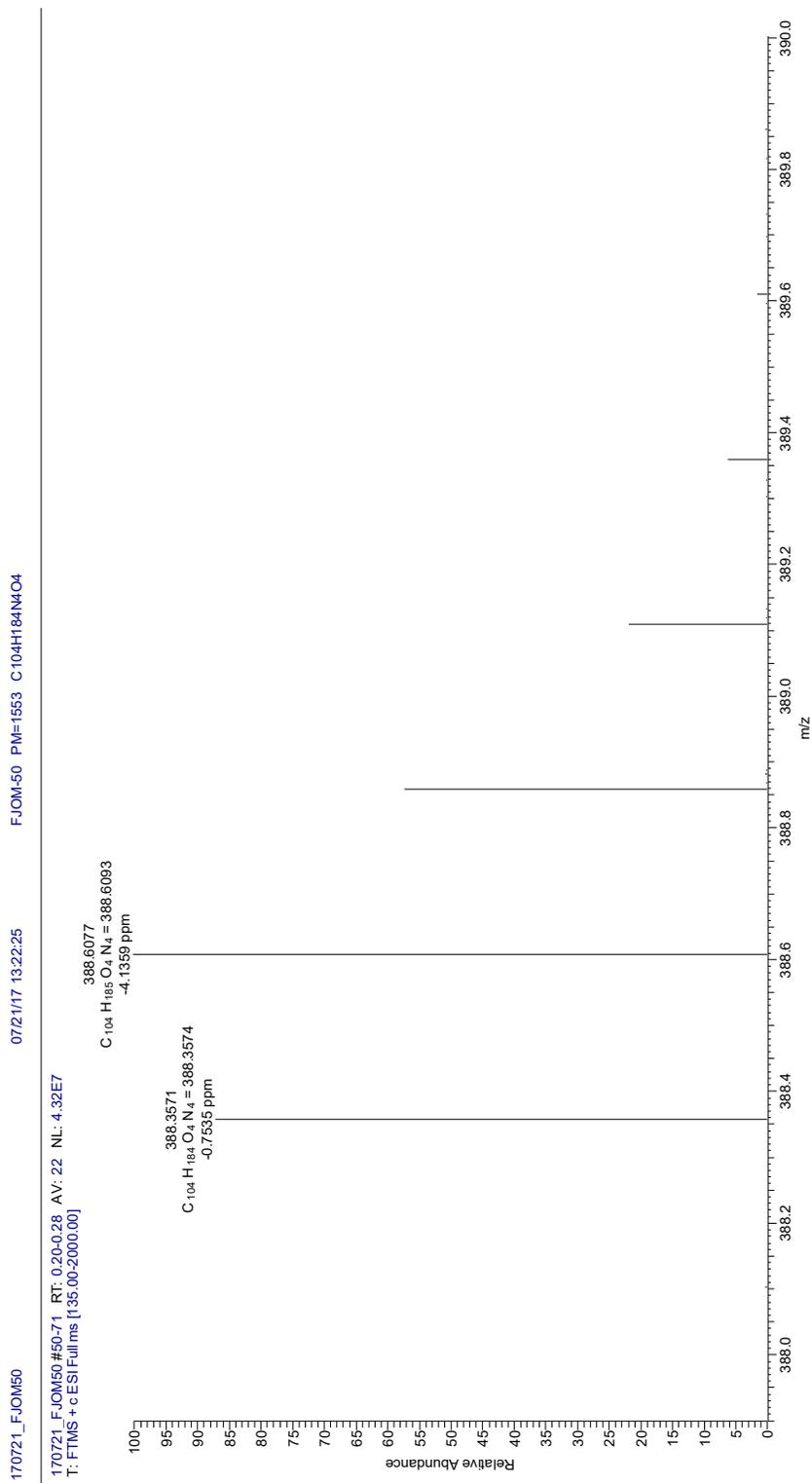


Figura 2.6. Espectro de masas del tetracloruro de 5,11,17,23-tetratrietilamonio-metilen-25,26,27,28-tetradododeciloxicalix[4]areno (TEAC4)

- **ADN de timo de ternera (calf thymus: ct-DNA)** fue adquirido en Sigma-Aldrich (CAS: 73049-39-5) y se encuentra en forma de sal sódica liofilizada (41.9 % moles de G-C y 58.1 % moles de A-T). La concentración de polinucleótido se expresa por pares de bases y fue determinada espectrofotométricamente a partir del valor del coeficiente de extinción molar ($6600 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ a 260 nm).⁹ Se comprobó que su longitud es de aproximadamente 10,000 pares de bases (bp) por molécula de ADN mediante un gel de electroforesis.¹⁰ Además, se confirmó la ausencia de proteínas en las disoluciones preparadas mediante la relación de absorbancias a 260 y 280 nm, ya que presentaban valores entre 1.8 y 1.9.¹¹

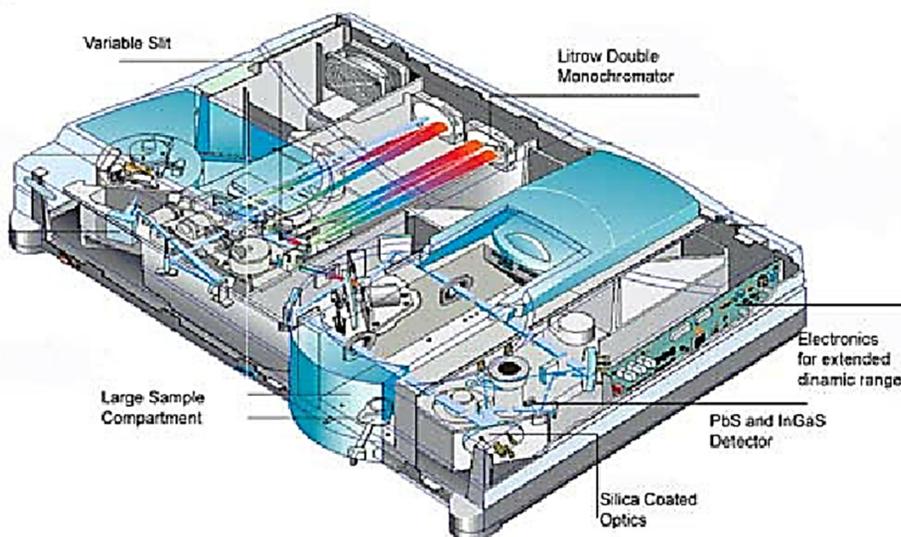
Todos los reactivos comerciales empleados fueron de grado analítico y han sido utilizados sin ninguna purificación. Además, todas las disoluciones han sido preparadas a fuerza iónica y pH constante (mezcla tampón HEPES 40 mM, HEPES 10 mM o cacodilato, a pH= 7.4), utilizando agua desionizada con una conductividad $<10^{-6} \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ mediante un sistema Millipore Milli-Q.

2.2 Métodos

En el presente trabajo de investigación han sido utilizadas una multitud de técnicas para caracterizar cada uno de los sistemas estudiados.

2.2.1 Espectrofotometría de absorción UV-vis

Es una técnica espectroscópica fundamental para la caracterización fisicoquímica de los sistemas en estudio. Los espectros de absorbancia fueron obtenidos mediante un espectrofotómetro CARY 500 SCAN UV-Vis-NIR (Varian) que se encuentra conectado a un ordenador (*Esquema 2.9*). Los datos fueron registrados cada 1 nm según el rango del espectro electromagnético estudiado para cada sistema. Una cubeta estándar de cuarzo de 10 mm fue utilizada para estas medidas.

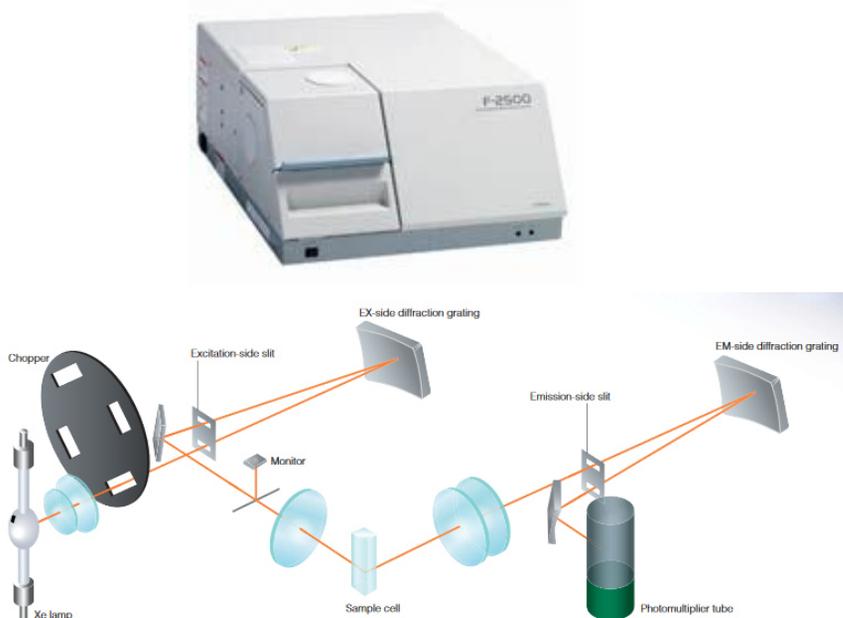


Esquema 2.9. Funcionamiento de un espectrofotómetro CARY 500 SCAN UV-vis-NIR (Varian).¹²

La temperatura se mantiene constante mediante una cámara termostatazada conectada a un criostato de flujo Lauda.

2.2.2 Espectrofluorimetría

Las medidas de fluorescencia fueron llevadas a cabo en un espectrofluorímetro Hitachi-F-2500 conectado a un ordenador para la adquisición y análisis de los espectros (*Esquema 2.10*). La temperatura se encuentra controlada a 298.15 ± 0.15 K ó 303.15 ± 0.15 K, dependiendo del capítulo, mediante un baño con termostato de inmersión J.P. Selecta, S. A. Las experiencias fueron realizadas en función del sistema estudiado, variando el potencial de la lámpara (400 o 700 V), la longitud de onda de excitación (λ_{exc}), las rendijas de excitación y emisión (2.5, 5, 10 ó 20 nm), la velocidad de barrido (1500 nm/min) y el rango del espectro electromagnético a estudiar. Una cubeta estándar de cuarzo de 10 mm de paso óptico fue empleada.



Esquema 2.10. Sistema óptico de un Hitachi-F-2500 (Hitachi, Ltd).

2.2.3 Dicroísmo circular (DC)

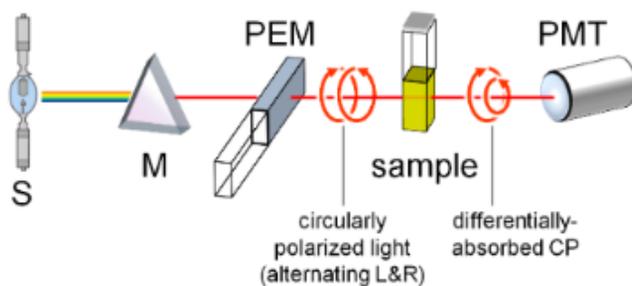
Se trata de una técnica espectroscópica de absorción electrónica basada en el cambio de configuración electrónica molecular de un estado fundamental a un estado excitado debido a la absorción de radiación electromagnética polarizada. Su señal se obtiene como la diferencia entre las absorbancias de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha. Es aplicable en sustancias ópticamente activas (quirales), es decir, que no disponen de un plano de simetría y no son superponibles con su imagen especular. Las medidas de dicroísmo circular (DC) fueron realizadas mediante un espectropolarímetro Biologic Mos-450 (*Esquema 2.11*). Se utilizó una cubeta de cuarzo estándar de 10 mm de paso de luz. Cada espectro se obtuvo a partir de un promedio de 10 barridos a una temperatura fija de 298.15 ± 0.15 K o 303.15 ± 0.15 K con un tiempo de equilibrado de 5 minutos antes de cada barrido.

La temperatura se mantiene constante mediante una cámara termostatazada conectada a un criostato de flujo Lauda.

Los espectros obtenidos se expresaron en términos de elipticidad molar, que se define mediante la siguiente ecuación:

$$\Theta = \frac{\Theta_{obs}}{10CL} \quad (2.1)$$

donde Θ_{obs} es la elipticidad observada (en miligrados), C es la concentración molar de la especie ópticamente activa y L es la longitud de la cubeta en cm.

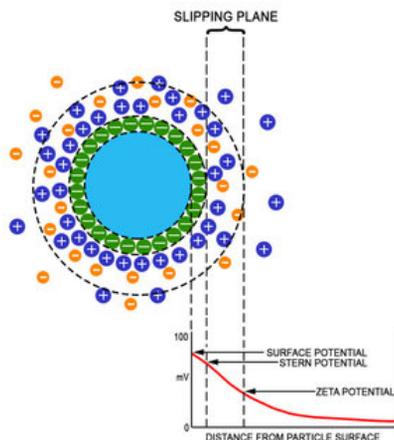


Esquema 2.11. Equipo de dicroísmo circular Biologic Mos-450 e ilustración de su funcionamiento.¹³ Leyenda: S, fuente; M, monocromador (selector de longitud de onda); PEM, modulador fotoelástico que produce luz polarizada hacia la izquierda y hacia la derecha alternativamente; PMT, fotomultiplicador (detector).

2.2.4 Potencial Zeta (ζ)

El potencial zeta (ζ) se define como el potencial en el límite del plano de deslizamiento o cizallamiento hidrodinámico que rodea a la superficie de la partícula. Este límite se encuentra entre la capa difusa, donde los iones están unidos menos fuertemente, y la región interior de los iones más fuertemente unidos, la capa de Stern (*Esquema 2.12*). Además, se encuentra relacionado

con la estabilidad en sistemas coloidales según la teoría DLVO,^{14,15} anteriormente descrita en el Capítulo 1.



Esquema 2.12. Representación del punto del potencial zeta en el modelo de doble capa.¹⁶

Este potencial se obtiene a partir de las medidas experimentales de la movilidad electroforética (μ) de estas partículas cargadas cuando se mueven en el seno de un campo eléctrico y esta relación es dada por la ecuación de Henry:

$$\mu = \frac{2\zeta\epsilon}{3\eta} f(K_a) \quad (2.2)$$

donde ϵ es la constante dieléctrica del disolvente, η es la viscosidad del líquido dispersante, y $f(K_a)$ es la función de Henry (generalmente 1 o 1.5).

Comúnmente, la aproximación de Smoluchowski de la ecuación de Henry (2.2) es empleada para la determinación de disoluciones acuosas con

una concentración de electrolito moderada, para el cual $f(K_a)$ tiene un valor de 1.5. Por tanto, la ecuación queda expresada de la siguiente forma:

$$\mu = \frac{\zeta \varepsilon}{\eta} \quad (2.3)$$

Los experimentos de potencial zeta se llevaron a cabo con un Zetasizer Nano ZS Malvern Instrument Ltd. (Reino Unido), que se encuentra en el servicio de Caracterización Funcional de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Este equipo mide la movilidad electroforética de la muestra a partir de la velocidad de las partículas utilizando un velocímetro láser Doppler (LDV). Se empleó una cubeta DTS1070 con un capilar de policarbonato y se realizaron 10 repeticiones para obtener el valor promedio de potencial zeta a 298.15 ± 0.15 K (Figura 2.7).



Figura 2.7. Zetasizer Nano ZS Malvern Instrument Ltd. (Reino Unido) del servicio de Caracterización Funcional de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

2.2.5 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Esta técnica evalúa el diámetro hidrodinámico de partículas que hay en disolución, y su comportamiento en función de la temperatura. El diámetro

hidrodinámico, o diámetro de Stokes-Einstein, está definido como el diámetro de una esfera rígida hipotética cuya velocidad de difusión es la misma que la media de las velocidades de difusión de sus diferentes orientaciones espaciales con un comportamiento Browniano. Se expresa mediante la ecuación 2.4. Este diámetro se calcula a partir de datos de los coeficientes de difusión obtenidos mediante medidas de DLS.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (2.4)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta del fluido, η es la viscosidad del fluido y r es el radio hidrodinámico de la partícula.

En la práctica, las moléculas no son rígidas ni esféricas, sino que se comportan como especies dinámicas que pueden interactuar con el disolvente en el que están disueltas. Por este motivo, el radio calculado es indicativo del tamaño aparente teniendo en cuenta los procesos de atracción y asociación con las moléculas del disolvente, y de ahí su nombre de radio hidrodinámico.

Estas medidas se realizaron en el mismo equipo que determina el potencial zeta (*Figura 2.7*). En este caso, la muestra fue iluminada con un láser con una disposición de detección fija de 90° al centro del área de la celda, y se analizó la fluctuación en la intensidad de la luz dispersada. Los resultados obtenidos fueron el promedio de 10 medidas y se empleó una cubeta de policarbonato DTS1070 a una temperatura de 298.15 ± 0.15 K.

2.2.6 Viscosimetría

Las propiedades macroscópicas de los sistemas microheterogéneos pueden ser fácilmente medidas mediante viscosidades.¹⁷ Este tipo de medidas son consideradas como las pruebas menos ambiguas y más críticas de un

modelo de unión en disolución en ausencia de datos estructurales cristalográficos. Con respecto a las disoluciones de ADN, se pueden distinguir los distintos modos de unión de un ligando con el polinucleótido a partir de este tipo de medidas. Así, la intercalación provoca un aumento de la longitud del polinucleótido al separarse las hebras de ADN y esto produce a su vez un aumento de la viscosidad de la disolución.¹⁸ Por el contrario, si es una unión de tipo *groove* o electrostática no ocurre un aumento de la longitud del polinucleótido, sino una disminución o constancia de dicha propiedad.¹⁹

La relación de viscosidades en el polinucleótido se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad (2.5)$$

donde t y t_0 es el tiempo observado en presencia y ausencia de ligando.

Los experimentos de viscosidad se llevaron a cabo en un microviscosímetro de Ostwald (*Figura 2.8*) sumergido en un baño de agua termostatzado a la temperatura de trabajo ($T= 298.15\pm 0.15$ K). Las medidas se repitieron al menos 10 veces.



Figura 2.8. Imagen de un microviscosímetro de Ostwald (Sibata Scientific Technology).

2.2.7 Medida de la temperatura *melting* (T_m)

La temperatura *melting* o de desnaturalización de un polinucleótido se define como la temperatura a la cual ocurre la disociación de la doble hélice del polímero y pasa a formar ADN de una sola hebra. A partir del estudio de la desnaturalización térmica se puede obtener información sobre la naturaleza de la interacción que existe entre un ligando y el polinucleótido, así como de los posibles cambios estructurales y la flexión que sufre el ADN como resultado de dicha interacción.²⁰ Se sabe que la intercalación produce un alargamiento y un aumento de la flexión de la doble hélice del ADN, generando una desorganización del apilamiento de las bases y una estabilización de la forma B del ADN. Cuanto mayor es la estabilización, mayor es la temperatura necesaria para separar las hebras del polinucleótido. Sin embargo, una unión de tipo *groove* o electrostática produce una desestabilización en la doble hebra y por tanto, provoca una disminución de la temperatura *melting*.

El estudio de desnaturalización térmica se realizó mediante un espectrofotómetro Biologic equipado con un controlador de temperatura Peltier (*Esquema 2.11*). El aparato tiene un programa de temperatura para controlar la velocidad de cambio de temperatura durante los experimentos. La rampa de temperatura fue de $0.2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. La tabla de registro muestra las diferencias de temperatura y absorbancia entre la referencia y las muestras a 260 nm. Todas estas medidas se realizaron a una concentración fija de ADN de $1.20 \times 10^{-5}\text{ mol dm}^{-3}$.

2.2.8 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) estudia el comportamiento de ciertos núcleos atómicos (aquellos que poseen espín nuclear distinto de cero) en presencia de un campo magnético externo. El campo magnético aplicado produce un desdoblamiento de los niveles degenerados de energía del espín nuclear, de modo que pueden inducirse transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética adecuada. La disposición de los niveles de energía es una propiedad tanto de los núcleos de una molécula, como de su entorno electrónico y de las interacciones entre ambos. Así, la intensidad, forma y posición de las señales en el espectro de un núcleo determinado están íntimamente relacionadas con su estructura molecular, por lo que un análisis detallado del espectro proporciona información valiosa acerca de la estructura del compuesto que lo origina. Por ello, esta técnica resulta ser de las más eficientes y útiles para el estudio de la estructura y dinámica de moléculas en disolución.

Estas experiencias fueron realizadas en el servicio de RMN de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Las muestras fueron preparadas en tubos de RMN Schott® type E de 5 mm a una determinada concentración en el disolvente deuterado correspondiente (CDCl_3 o D_2O) seguido de una breve sonicación. Los espectros fueron obtenidos mediante un espectrómetro Bruker Avance III 500 MHz (500.2 MHz para ^1H) equipado con una criosonda de TCI de 5 mm que funciona a 298.15 ± 0.15 K (*Figura 2.9*). Todos los cambios químicos de ^1H y ^{13}C han sido referenciados a sus señales residuales correspondientes.²¹



Figura 2.9. Espectrómetro Bruker Avance III 500 MHz del servicio de RMN de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

2.2.9 Medidas electroquímicas

La voltametría cíclica (CV) es un tipo de medida electroquímica potenciodinámica. En un experimento de voltametría cíclica, el potencial del electrodo de trabajo aumenta linealmente en función del tiempo. A diferencia de la voltametría de barrido lineal, después de que se alcanza el potencial establecido en un experimento de CV, el potencial del electrodo de trabajo se incrementa en la dirección opuesta para volver al potencial inicial. Estos ciclos de rampas pueden repetirse tantas veces como sea necesario. En un voltagrama cíclico, se representa la corriente en el electrodo de trabajo en función del potencial del electrodo de trabajo. Esta técnica es empleada generalmente en el estudio de mecanismos de reacción debido a que aporta información de procesos redox o de una molécula que se adsorbe en el electrodo.

Las medidas electroquímicas se realizaron utilizando un potenciostato EC Epsilon (BASI). Las medidas de voltametría cíclica se realizaron en una celda de tres electrodos que contiene una lámina de platino como electrodo

auxiliar, un electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) como el electrodo de referencia y un electrodo de carbono vítreo de 3 mm de diámetro (Modelo CHI104, CH Instruments) como electrodo de trabajo (*Figura 2.10*). Todos los datos se registraron a 303.15 ± 0.15 K.



Figura 2.10. Potenciostato EC Epsilon (BASI) con el sistema de tres electrodos de la Universidad de Huelva.

2.2.10 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microscopía de Fuerza Atómica (AFM) es una técnica de medida superficial que se basa en la interacción de una punta de silicio con la superficie de la muestra. La fuerza entre la punta y la superficie de la muestra hace que el soporte de silicio se doble o flexione. La flexión de la punta es provocada por fuerzas de tipo van der Waals. Un detector mide la flexión que ocurre conforme la punta barre la superficie y con ello se consigue obtener un mapa topográfico. Esta técnica permite el análisis superficial de muestras con resolución nanométrica o incluso atómica. Teniendo todo esto presente, se

utilizó AFM para adquirir un conocimiento más preciso sobre la estructura del ADN en presencia de los distintos nanovectores estudiados.

Imágenes de microscopía de fuerza atómica fueron obtenidas con un equipo Molecular PicoPlus Imaging AFM 2500 (Agilent Technologies) del Servicio de Microscopía de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) (*Figura 2.11*). Se usaron para las medidas unos soportes de silicio (Modelo Pointprobe, Nanomundo), con una frecuencia de resonancia en torno a 240 kHz y una fuerza nominal constante de 42 N/m. Todas las imágenes de AFM se realizaron en aire (*tapping mode*), con velocidades de escaneo en torno a 0,5 Hz y una recopilación de datos de 256×256 píxeles. Con el fin de aislar las moléculas de ADN en la imagen era necesario utilizar disoluciones diluidas (3.00×10^{-7} mol dm^{-3}) debido al gran tamaño de estas moléculas.

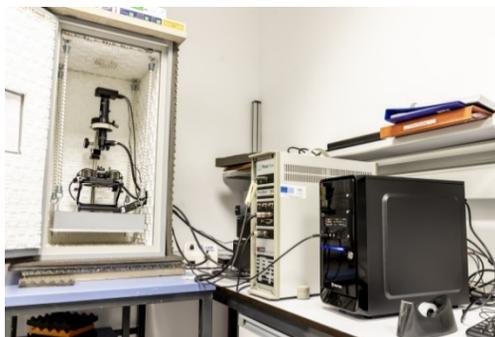


Figura 2.11. Equipo Molecular PicoPlus Imaging AFM 2500 (Agilent Technologies) del Servicio de Microscopía de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

Las distintas imágenes fueron obtenidas mediante el secado de $30 \mu\text{l}$ de muestra depositada sobre la mica. Para la modificación de la superficie de la mica se utilizó una disolución de (3-Aminopropil)triétoxisilano (APTES) de Sigma Aldrich de concentración 0,1% (v/v) y se procedió como se indica: se añadió un volumen de APTES de aproximadamente $60 \mu\text{l}$ sobre una superficie

de mica recién exfoliada, se dejó incubar durante 20 min y se lavó con agua bidestilada (Milli-Q). Se dejó secar la superficie al aire. Una vez seca, se añadieron 30 μl de una disolución de ADN (o calix/ADN) sobre esta superficie modificada, se dejó incubando el sistema durante 30 min, se lavó con agua pura, y se secó al aire para posteriormente obtener las imágenes de AFM.

2.2.11 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre un dispositivo de carga acoplada (CCD) que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes.

La imagen del TEM tal como se ha descrito ofrece información sobre la estructura de la muestra, tanto si ésta es amorfa como si es cristalina. Además, si la muestra es cristalina, es decir, hay una estructura de planos periódica, puede ocurrir que varias familias de esos planos cumplan la condición de Bragg y difracten de forma coherente la onda electrónica incidente. Esto da lugar a un diagrama de difracción, que es una imagen de distintos puntos ordenados respecto a un punto central (electrones transmitidos

no desviados) que nos aportan información sobre la orientación y estructura de los cristales presentes.

Con el objetivo de caracterizar la morfología de los sistemas, imágenes de TEM fueron adquiridas en un equipo Zeiss Libra 120 a 80 kV del Servicio de Microscopía de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) (*Figura 2.12*). Estas experiencias fueron llevadas a cabo en rejillas de Cu de 300 *mesh* soportadas con una fina capa de coloidón (solución de nitrocelulosa en una mezcla éter/alcohol). En un primer paso, las muestras se adhirieron a las rejillas durante 15 min por inversión y posteriormente, se realizó una tinción negativa durante 10 min con acetato de uranilo al 2.0 % (p/v) con el objetivo de dar densidad electrónica a los sistemas estudiados. Las imágenes fueron adquiridas con una resolución de 2048×2048 píxeles.

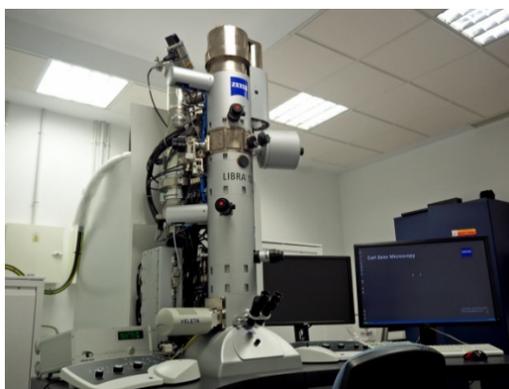


Figura 2.12. Microscopio de transmisión electrónica Zeiss Libra 120 del Servicio de Microscopía de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

2.2.12 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. Consiste en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel. La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel. Las propiedades de una molécula determinan la velocidad con que un campo eléctrico puede desplazarla a través de un medio gelatinoso.

Muchas macromoléculas biológicas importantes (por ejemplo, los aminoácidos, los péptidos, las proteínas, los nucleótidos y los ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y, a un pH determinado, existen en disolución como especies cargadas eléctricamente, sean cationes o aniones. Según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el cátodo o hacia el ánodo. Así, por ejemplo, cuando se aplica un campo eléctrico a un gel con pH neutro, a los grupos fosfato del ADN cargados negativamente los harán migrar hacia el ánodo.

Estos experimentos se llevaron a cabo en cubetas horizontales y el volumen de gel utilizado fue de 180.0 μ L. Los geles se prepararon con tampón TAE (40.0 mM de Tris-acetato, 1.00 mM de EDTA, pH= 7.40), siendo el porcentaje de agarosa utilizado del 1.00 % (p/v). Al tampón se le añadió 10 μ l de Red Safe TM para la visualización de las bandas. A 20 μ l de muestra se le añadieron 5 μ l de 5 \times ADN Loading Buffer y se homogeneizó la mezcla. Las electroforesis se realizaron durante 2 h a 90 V. Posteriormente, se colocó el gel sobre un sistema transiluminador modelo ULTima 16si (Hoefer) con luz UV de 302 nm para la observación y registro de las bandas (*Figura 2.13*).

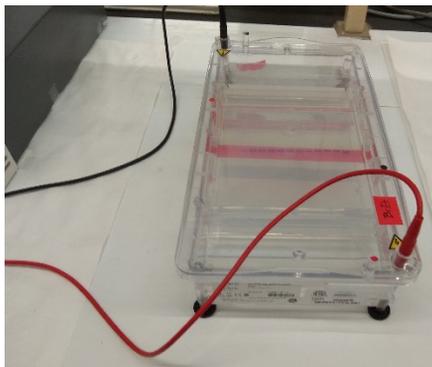
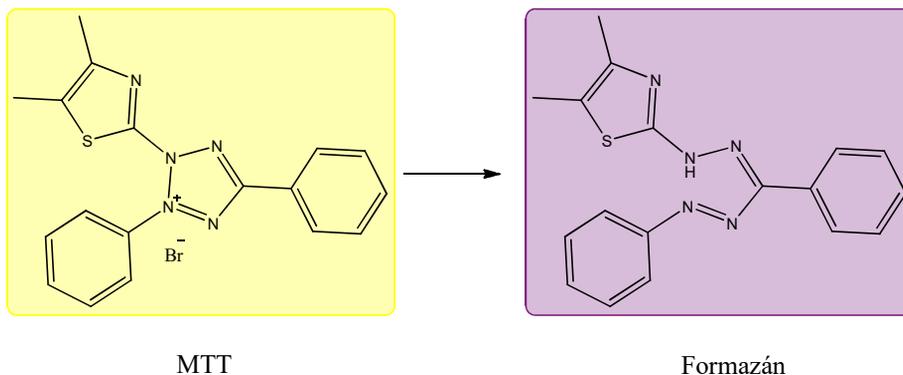


Figura 2.13. Gel de electroforesis en agarosa (1.00% p/v).

2.2.13 Ensayos *in vitro* de citotoxicidad (Ensayo MTT)

Uno de los ensayos más utilizados para la determinación de la viabilidad celular (citotoxicidad) es el ensayo colorimétrico de reducción del bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).²² Esta reducción del MTT soluble mediante la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán. Las células se adhieren a los anillos de tetrazolio y forman cristales morados de formazán que son insolubles en disolución acuosa. El formazán queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de éstas y es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Esto permite cuantificar la cantidad de MTT reducido por medio de un estudio colorimétrico debido al cambio de amarillo a morado en su reducción (*Esquema 2.13*).



Esquema 2.13. Reducción celular de reducción del MTT.

La capacidad de las células para reducir el MTT determina la integridad mitocondrial y su actividad funcional, y es una medida de la viabilidad celular y de la toxicidad. Un aumento del número de células produce un aumento de la cantidad de formazán MTT formado, lo que implica un aumento de la absorbancia detectada.

Existen otras variantes del ensayo MTT, como son el 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólico (MTS), 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólico-5-carboxanilida (XTT) y sales tetrazólicas solubles en agua (WSTs). Todas estas son compuestos tetrazólicos y en particular, se ha utilizado un ensayo MTS.

El % de viabilidad celular fue determinado con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Los resultados son expresados en % de células vivas:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{A_{490} - A_{490} \text{ control (DMSO)}}{A_{490} \text{ control celular} - A_{490} \text{ control (DMSO)}} \times 100 \quad (2.6)$$

Se realizó un control del medio celular no tratado (% vida celular > 1), un control positivo (compuesto con citotoxicidad conocida) y otro negativo (el disolvente). Estas medidas son repetidas por triplicado.

Estos ensayos se realizaron *in vitro* utilizando un ensayo MTT. Estas líneas celulares fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3000 células por placa. Se utilizaron diferentes líneas celulares de cáncer humano: A549 (línea celular adenocarcinómica humana procedente del epitelio basal alveolar), H358 (línea celular de cáncer de pulmón humano), HepG2 (línea celular de cáncer de hígado humano), LS180 (línea celular adenocarcinómica humana procedente del epitelio del colón) y MCF7 (línea de cáncer de mama humano), así como una línea celular normal, RPE-1 (línea celular humana procedente del epitelio de la retina pigmentada). Al día siguiente, se agregaron distintas dosis de los sistemas a estudiar a los pocillos y se incubaron las células durante 4 días. El medio de cultivo utilizado dependía de la línea celular: H358 (RPMI + 10% FSB + 1% penicilina/estreptomicina); A549, MCF7, LS180 y HepG2 (DMEM + 10% FSB + 1% penicilina/estreptomicina); RPE-1 (RPMI/F12 + 10% FSB + 1% penicilina/estreptomicina). Después de esto, fue cuantificada con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólico (MTS, ROCHE). La viabilidad celular fue medida por luminometría según las instrucciones del fabricante y cada punto fue medido por triplicado. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el grupo del Dr. Iván Valle Rosado del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), encargado de la obtención de las líneas celulares.

2.2.14 Método de diálisis

La eficiencia de encapsulación del antineoplásico doxorubicina fue determinada empleando un método de diálisis. Para ello, 900 μL de muestra que contenía el fármaco cargado a una concentración de $[(\text{DOX})]= 2.00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ fue añadido en el interior de una membrana de diálisis Spectra/Por® 3 (MWCO 3.5 kDa) de Spectrum Laboratories, Inc. Esta membrana fue sellada en sus extremos con sus respectivas pinzas y fue sumergida en un vaso de precipitado con un volumen de 40.0 mL de HEPES 10 mM. Este proceso fue realizado a una temperatura de 4.0 ° C con el objetivo de asegurar la estabilidad del fármaco y de las nanoestructuras empleadas. Un volumen de 1.0 mL cada 30 min del sobrenadante fue tomado y reemplazado por el mismo volumen de disolución tampón, ya que así se mantiene el volumen de disolución tampón constante en el vaso de precipitado (ver *Figura 2.14*). La cuantificación del medicamento fue llevada a cabo mediante espectrofotometría de absorción UV-Vis a 490 nm. Estos experimentos fueron realizados por triplicado para asegurar la reproducibilidad del método y fueron seguidos al menos durante 24 h. La eficiencia de encapsulación (EE) fue obtenida mediante la siguiente ecuación:

$$EE \% = \frac{[\text{fármaco}]_{\text{total}} - [\text{fármaco}]_{\text{sobrenadante}}}{[\text{fármaco}]_{\text{total}}} \times 100 \quad (2.7)$$

siendo $[\text{fármaco}]_{\text{total}}$, la concentración inicial de medicamento y $[\text{fármaco}]_{\text{sobrenadante}}$, la concentración de fármaco determinada espectrofotométricamente de la disolución tampón durante este proceso. Todas las concentraciones se encuentran referidas al volumen total.



Figura 2.14. Representación del proceso de diálisis a 4° C.

Una vez determinada la eficiencia de encapsulación, se estudió la liberación del fármaco a 37.0 °C (temperatura corporal) con el uso de un sistema de termostización, siguiendo el mismo protocolo que se utilizó a la temperatura de 4.0 ° C, hasta observar la nula salida de fármaco desde la membrana de diálisis hacia la disolución *bulk*. Este proceso permite obtener información sobre la liberación del medicamento y, en consecuencia, sobre la velocidad de liberación de éste.

2.3 Referencias bibliográficas

1. Lakowicz, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer US, New York, 2006).
2. Liu, H., Li, B., Liu, D. & Xu, Z. Photo-physical properties of the transition metal ions complexes of the calix[4]arene derivatives. *Chem. Phys. Lett.* **350**, 441–446 (2001).
3. Supian, F. L. *et al.* A surface potential study of ion-uptake by 5,11,17,23-tetra-tert-butyl-25,27-diethoxycarbonyl methyleneoxy-26,28-dihydroxycalix[4]arene and 5,17-(3-nitrobenzylideneamino)-11,23-di-tert-butyl-25,27-diethoxycarbonyl methyleneoxy-26,28-dihydroxycalix[4]aren. *Sains Malaysiana* **39**, 423–433 (2010).
4. Supian, F. L. *et al.* Interaction between Langmuir and Langmuir–Blodgett Films of Two Calix[4]arenes with Aqueous Copper and Lithium Ions. *Langmuir* **26**, 10906–10912 (2010).
5. Rodik, R. V., Anthony, A. S., Kalchenko, V. I., Mély, Y. & Klymchenko, A. S. Cationic amphiphilic calixarenes to compact DNA into small nanoparticles for gene delivery. *New J. Chem.* **39**, 1654–1664 (2015).
6. Nomura, E. *et al.* Self-Organized honeycomb-patterned microporous polystyrene thin films fabricated by calix[4]arene derivatives. *Langmuir* **26**, 10266–10270 (2010).
7. Eggers, P. K. *et al.* Composite fluorescent vesicles based on ionic and cationic amphiphilic calix[4]arenes. *RSC Adv.* **2**, 6250–6257 (2012).
8. Gallego-Yerga, L. *et al.* Cyclodextrin- and calixarene-based polycationic amphiphiles as gene delivery systems: A structure-activity relationship study. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 1708–1723 (2015).
9. Reichmann, M. E., Rice, S. A., Thomas, C. A. & Doty, P. A Further Examination of the Molecular Weight and Size of Desoxypentose Nucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3047–3053 (1954).

10. Secco, F. *et al.* Solvent effects on the kinetics of the interaction of 1-pyrenecarboxaldehyde with calf thymus DNA. *J. Phys. Chem. B* **114**, 4686–4691 (2010).
11. Hassan, R. *et al.* Guidelines for nucleic acid detection and analysis in hematological disorders. *Malays. J. Pathol.* **37**, 165–73 (2015).
12. Garoli, D. Development of Sensors for Ultraviolet Radiation Monitoring. (University of Padova, 2008).
13. Šmidlehner, T., Piantanida, I. & Pescitelli, G. Polarization spectroscopy methods in the determination of interactions of small molecules with nucleic acids – tutorial. *Beilstein J. Org. Chem.* **14**, 84–105 (2018).
14. Derjaguin, B. & Landau, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Prog. Surf. Sci.* **43**, 30–59 (1993).
15. Verwey, E. J. W. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *J. Phys. Colloid Chem.* **51**, 631–636 (1947).
16. Matusiak, J. & Grzadka, E. Stability of colloidal systems-a review of the stability measurements methods. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska* **LXXII**, 33–45 (2017).
17. Suh, D. & Chaires, J. B. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. *Bioorganic Med. Chem.* **3**, 723–728 (1995).
18. Gatashah, M. K., Kannan, S., Hemalatha, K. & Imrana, N. Proflavine an acridine DNA intercalating agent and strong antimicrobial possessing potential properties of carcinogen. *Karbala Int. J. Mod. Sci.* **3**, 272–278 (2017).
19. Burger, A. M., Jenkins, T. C., Double, J. A. & Bibby, M. C. Cellular uptake, cytotoxicity and DNA-binding studies of the novel imidazoacridinone antineoplastic agent C1311. *Br. J. Cancer* **81**, 367–375 (1999).
20. Chaires, J. B. A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Arch. Biochem. Biophys.* **453**, 26–31 (2006).

21. Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. & Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **62**, 7512–7515 (1997).
22. van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L. & Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. in *Methods in Molecular Biology* 237–245 (2011).

CAPÍTULO 3. CALIX[4]ARENOS-
SCHIFF NEUTROS. INTERACCIÓN
CON ADN

Desde que J. Watson y F. Crick dilucidaron la estructura molecular del B-ADN, ha habido un gran progreso en la comprensión de los procesos bioquímicos en los que participan los ácidos nucleicos.¹ Replicación de las cadenas del polinucleótido, transcripción (la información del ADN es copiada en el ARN) y traducción (biosíntesis de proteínas) son procesos controlados por varias enzimas, que a su vez, son activadas por un gran número de proteínas diferentes. Hoy en día, no solo es posible interferir en la expresión de los genes, sino también introducir nuevo material genético en el interior del núcleo celular.

La terapia génica fue diseñada para sustituir genes defectuosos o interrumpir su expresión. Con su rápido desarrollo, surge una mayor necesidad de vectores altamente eficientes, con baja citotoxicidad, que sean capaces de liberar el material genético en el núcleo celular, atravesando la membrana celular y el citoplasma. Sin embargo, los vectores virales suelen generar a menudo una respuesta inmunitaria *in vivo*, por lo que los investigadores en los

últimos años han centrado más su atención en vectores no virales. Éstos deben unirse al polinucleótido, induciendo un cambio conformacional hacia un estado más compacto. Este fenómeno es denominado compactación o condensación.

El diseño de nanosistemas de origen sintético capaces de transportar ácidos nucleicos hacia las células diana es crucial. Sistemas tales como tensioactivos catiónicos, liposomas, nanopartículas o nanotubos de carbono, todos ellos funcionalizados, han sido empleados como vectores no virales en la liberación de material genético.²⁻⁴ Recientemente, se ha demostrado que los calixarenos son plataformas preorganizadas adecuadas para actuar como vectores, los cuales pueden ser funcionalizados con grupos catiónicos en su borde superior y cadenas alquílicas en su borde inferior, convirtiéndolos así en prometedores vectores para la entrega de nuevo material genético.

Plataformas multivalentes con grupos guanidinio basadas en calixarenos han sido utilizadas con gran éxito en la transferencia de genes. Teniendo esto en cuenta, F. Sansone y colaboradores⁵ estudiaron la capacidad de estos macrociclos en la unión, condensación y transporte de ADN a través de las membranas celulares. En un estudio sistemático, se determinó que los calix[4]arenos en conformación de cono conducen a un estado más compacto del ADN plasmídico, debido a la disposición de sus cadenas lipofílicas. Por el contrario, un aumento del número de unidades fenólicas en estos receptores provoca una compactación parcial del polinucleótido, como se muestra mediante medidas de AFM (ver la *Figura 3.1*). Se ha encontrado que solo los calix[4]arenos en conformación de cono facilitan la transfección celular de forma efectiva, lo que es indicativo de un balance entre las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas.

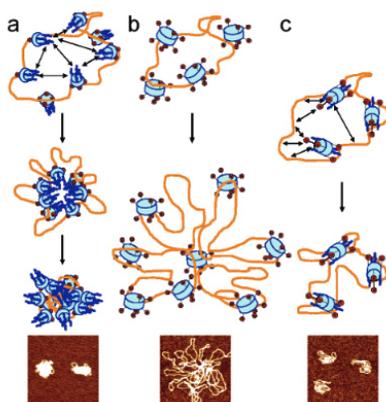


Figura 3.1. Representación esquemática de los posibles procesos de condensación inducidos por: **a)** calix[4]arenos con grupos guanidinio en forma de cono, **b)** calix[6]- y calix[8]arenos, y **c)** calix[4]arenos en forma 1,3-alternada. En la parte inferior, se muestran las imágenes de AFM de la formación de estos agregados.⁵

R. Rodik y colaboradores⁶ diseñaron un protocolo que permite optimizar el proceso de compactación de ADN en presencia de micelas de calixarenos anfifílicos catiónicos, que generan agregados de unos 50 nm con propiedades adecuadas para la transfección. Estos calix[4]arenos presentan en su cabeza polar grupos colina y largas cadenas hidrocarbonadas. La *Figura 3.2* presenta una imagen de microscopía de fluorescencia que demuestra una captación eficaz de estos vectores por células adenocarcinómicas procedente de las zonas cervical y uterina (HeLa).

En un estudio posterior, mejoraron aún más el proceso de condensación del polinucleótido.⁷ Se encontró que cadenas alquílicas más largas conducen a agregados de menor tamaño con baja polidispersidad, promoviendo más eficientemente la transfección de genes y disminuyendo la citotoxicidad. Por otro lado, se encontró que los cambios en la naturaleza de los grupos en su cabeza polar no juegan un papel fundamental en este proceso.

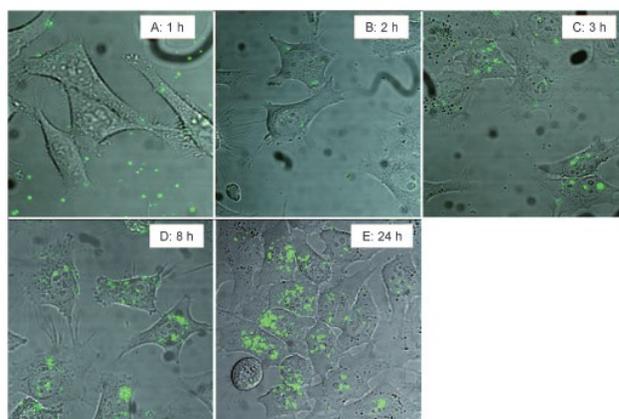


Figura 3.2. Imágenes de fluorescencia de células HeLa incubadas a diferentes tiempos momentos a N/P=5 para los complejos de calix[4]areno/DOPE/pDNA marcados con YOYO-1.⁶

Con el objetivo de aumentar el fenómeno de cooperatividad, R. Lalor y colaboradores⁸ prepararon multicalixarenos catiónicos funcionalizados. En este caso, un calix[4]areno actúa como unidad central de la supraestructura, que contiene otras cuatro moléculas de calix[4]areno, unidas mediante espaciadores polares cortos. Cada macrociclo terminal posee un residuo de glicina con una amina alifática libre en su borde superior. Se observó que la unión entre calixarenos multiméricos y ADN ocurre a concentraciones más bajas de macrociclo que cuando se une a una única molécula de calixareno, lo que apunta a un efecto de cooperatividad. Además, la citotoxicidad para diferentes líneas celulares era despreciable y la transfección génica se confirmó en células derivadas de ovario de hámster chino (CHO).

V. Rallaud y colaboradores⁹ demostraron que no sólo tienen lugar interacciones de tipo electrostático entre los calixarenos catiónicos y el ADN, sino que también pueden existir interacciones con el surco (*groove*) mayor o menor del polinucleótido. Para ello utilizaron calix[4]arenos anfifílicos

funcionalizados con grupos guanidinio. Se observó que dímeros de estos calixarenos interactúan con el polinucleótido, induciendo cambios conformacionales mediante interacciones con el surco mayor del ADN. Estos cambios dependen de la estructura del macrociclo.^{10,11}

En los últimos años, han aparecido diferentes revisiones acerca del empleo de macrociclos como vectores no virales para la transfección de genes. J. Jiménez Blanco y colaboradores¹² resumieron las propiedades de sistemas macromoleculares preorganizados como ciclodextrinas, calixarenos, pilarenos, fulerenos, ciclopéptidos y ciclotrehalanas, que son capaces de autoensamblarse en partículas de escala nanométrica para permitir una liberación segura de los ácidos nucleicos. T. Zhou y colaboradores¹³ revisaron el progreso realizado en la condensación de moléculas de ADN mediante vectores basados en nanoestructuras y destacaron la elucidación de la estructura de los complejos formados con el ADN con AFM y otras técnicas basadas en la microscopía. R. Rodik y colaboradores¹⁴ proporcionaron una visión general de los calixarenos, y macrociclos relacionados, como vehículos en el suministro de genes, con énfasis en un andamiaje preorganizado que incorpora cadenas alquílicas. En esta revisión, los autores indican a la comunidad científica el interés de realizar pruebas *in vivo* en animales como paso definitivo para la evaluación del potencial de estos nuevos materiales en terapia génica.

En este capítulo se ha estudiado la interacción de calix[4]arenos-Schiff neutros con ADN de timo de ternera (ct-DNA). Este tipo de receptores han mostrado un gran potencial en el reconocimiento de cationes, particularmente con metales de transición, como ya se comentó en el capítulo 2. Los dos calixarenos investigados poseen un grupo éster terminal en el borde inferior y un grupo aromático en el borde superior, con capacidad de unión con ácidos nucleicos. Ambas estructuras se encuentran representadas en el *Esquema 2.4.* del capítulo 2.

3.1. Parte experimental

Estos macrociclos presentan una baja solubilidad en agua, por lo que fue necesario prepararlos en una mezcla metanol/agua al 20 % (v/v). Todos los experimentos en este capítulo fueron hechos a este mismo porcentaje de metanol/agua.

Algunas medidas fueron realizadas con ADN monocatenario, de una sola cadena (ssDNA), para comprobar algunos de los resultados obtenidos. Con este objetivo, disoluciones madres de ssDNA fueron preparadas mediante desnaturalización térmica de una disolución madre de ADN de doble cadena (dsDNA). Para ello, la disolución del polinucleótido se mantuvo a 75 °C durante 15 min y, luego, fue inmediatamente sumergido en un baño con hielo para impedir la renaturalización.¹⁵

Todas las medidas experimentales fueron realizadas a una temperatura constante de 298.0±0.1 K y a pH fijo, mediante una disolución tampón ([cacodilato]= 0.01 mol dm⁻³, pH= 7.0).

3.1.1. Espectrofotometría de absorción UV-vis

Los espectros de absorción fueron obtenidos a diferentes relaciones molares de X (X= [calixareno]/[ADN]), para comprobar la estabilidad del sistema. Los espectros fueron registrados en un rango de longitudes de onda desde 200 a 800 nm. La concentración de ADN utilizada fue de 2.00 × 10⁻⁵ mol dm⁻³.

3.1.2. Espectrofluorimetría

Las titulaciones de fluorescencia fueron realizadas a una concentración de bromuro de etidio (EtBr) de 2.00×10^{-6} mol dm⁻³. La concentración de ADN utilizada fue de 2.00×10^{-5} mol dm⁻³. La concentración de macrociclo añadida dependerá de la concentración de polinucleótido y del valor de X estudiado. Estas experiencias fueron realizadas con una potencia de lámpara de 400 V y rejillas de excitación y emisión de 2.5 y 5.0, respectivamente. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 480 nm y 593 nm, correspondientes a los máximos de absorción y emisión del EtBr.

Las titulaciones de fluorescencia en el caso del macrociclo con grupos fluoreno fueron realizadas en ausencia de EtBr, aprovechando el hecho de que este macrociclo presenta un espectro de emisión de fluorescencia. La concentración de calixareno fue de 2.00×10^{-6} mol dm⁻³ y se varió la concentración de polinucleótido. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 318 nm y 410 nm, respectivamente. Estas medidas fueron realizadas en las mismas condiciones de trabajo que el otro calix[4]areno.

Además, se ha estudiado el fenómeno de autoagregación de ambos macrociclos, manteniendo las mismas condiciones experimentales de equipo anteriormente mencionadas y las correspondientes longitudes de onda de excitación y emisión ($\lambda_{exc} = 367$ nm, $\lambda_{em} = 420$ nm para el dinitro-diéster calixareno y $\lambda_{exc} = 318$ nm, $\lambda_{em} = 410$ y 638 nm para el difluoreno-diéster calixareno).

3.1.3. Dicroísmo circular (DC)

Los espectros fueron registrados desde 220 a 320 nm, dentro de la región de absorción del ADN.

Los espectros fueron obtenidos a una concentración fija de calixareno y a diferentes concentraciones de ADN. Este procedimiento fue llevado a cabo a distintas concentraciones de macrociclo, con el objetivo de obtener la relación molar de X apropiada para el dinitro-diéster calixareno. Sin embargo, para el difluoreno-diéster calixareno se realizaron las experiencias a concentración constante de polinucleótido de $2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ y a diferentes concentraciones de macrociclo. Todas las medidas fueron expresadas en términos de elipticidad molar, término definido en la ecuación 2.1. mostrada en el capítulo 2.

3.1.4. Viscosimetría

El viscosímetro fue calibrado con una disolución tampón de cacodilato en metanol/agua (20 % (v/v)) a pH= 7.0. Los resultados de viscosidad se obtuvieron haciendo uso de la ecuación 2.5. del capítulo 2, donde η es la viscosidad de la suspensión y η_0 es la viscosidad del polinucleótido en ausencia de macrociclo. La concentración de ADN utilizada fue de $2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

3.1.5. Medida de la temperatura *melting*

Se realizaron medidas de temperatura *melting* siguiendo las pautas indicadas en la sección 2.2.7. del capítulo 2. Todas estas medidas se realizaron a una concentración fija de ADN de 1.20×10^{-5} mol dm⁻³.

3.1.6. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Con el propósito de obtener imágenes de los sistemas en disolución y teniendo en cuenta el gran tamaño del polinucleótido empleado, fue necesario utilizar disoluciones diluidas de ADN (3.00×10^{-7} mol dm⁻³). Imágenes de AFM de los complejos calixareno/ADN fueron obtenidas mediante el protocolo que se encuentra detallado en la sección 2.2.10 del capítulo 2.

3.1.7. Ensayos *in vitro* de citotoxicidad (Ensayo MTT)

La evaluación de la citotoxicidad de estos macrociclos ha sido realizada en un período de 24 h en diferentes líneas celulares (A549, MCF7, LS180, HepG2 y RPE-1), mediante el protocolo especificado en la sección 2.2.13. del capítulo 2.

3.2. Resultados y discusión

En la *Figura 3.3* se muestra la estabilidad de las disoluciones de calix[4]areno/ADN con un valor de $X= 0.01$ para el macrociclo que contiene grupos nitro y de $X= 0.008$ para el receptor con grupos fluoreno. Como puede verse, estas disoluciones presentan una estabilidad de más de dos horas en el rango de concentraciones empleado en este capítulo.

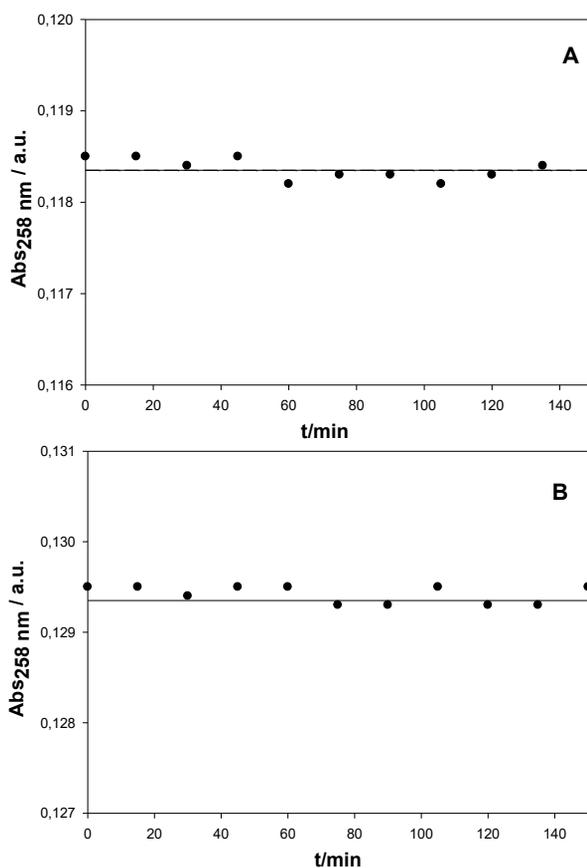


Figura 3.3. Estabilidad de una disolución de dsDNA para una disolución de calixareno/dsDNA (A: $X= 0.01$ para el dinitro-diéster calixareno y B: $X= 0.008$ para el difluoreno-diéster calixareno ($[ADN]= 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$)).

La espectroscopía de emisión de fluorescencia es una técnica empleada para obtener información acerca del modo de unión de diferentes especies con ADN. Normalmente, la interacción de un compuesto fluorescente con ADN conduce a cambios en su espectro de emisión.¹⁶ En este sentido, es bien conocido que la interacción del EtBr con el ADN es principalmente de tipo intercalativo, aunque Bresloff y Crothers demostraron que sobre un 20% de las moléculas del colorante orgánico interaccionan con el polinucleótido mediante un modo *groove*.¹⁷ Su intensidad de emisión aumenta cuando los anillos planares aromáticos de su estructura se encuentran intercalados entre los pares de bases de la doble hélice de ADN.¹⁷ Por otro lado, una disminución de la intensidad de emisión del EtBr en presencia de ADN es interpretado como un desplazamiento de esta sonda desde una posición intercalativa entre los pares de bases de las moléculas de ADN hacia la disolución acuosa.¹⁸ Estos hechos son la base del uso del EtBr para obtener información sobre las interacciones de otras moléculas con el ADN.

Solo en el caso del macrociclo que contiene grupos nitro, el dinitro-diéster calixareno, se ha estudiado la fluorescencia de emisión del EtBr en presencia de ADN y distintas concentraciones de calixareno, debido a que la fluorescencia del macrociclo utilizada en el estudio es lo suficientemente baja para no interferir en los estudios con EtBr. El difluoreno-diéster calixareno presenta una intensidad de emisión de fluorescencia lo suficientemente elevada como para interferir en los resultados de emisión del EtBr. La *Figura 3.4* muestra la dependencia de la intensidad de emisión de fluorescencia relativa, I/I_0 , con respecto a X , donde I e I_0 son intensidades de emisión en presencia y ausencia de calixareno, respectivamente. Inicialmente se observa una disminución de la intensidad de emisión del EtBr cuando la concentración de dinitro-éster calixareno aumenta desde $X=0$ hasta $X=0.075$, y, posteriormente, un aumento de dicha magnitud para concentraciones mayores de macrociclo ($X>0.075$). No se ha observado un desplazamiento en la banda del EtBr.

Inicialmente, la disminución de la intensidad de emisión, I , podría ser debida a una posible intercalación del calixareno entre los pares de bases del ADN. Esto causaría que la sonda fuera desplazada, al menos parcialmente, desde un ambiente no polar a un entorno más polar, la disolución acuosa, resultando en una disminución de I . Posteriormente, un aumento de la intensidad de emisión para valores de X mayores podría estar relacionado con un posible cambio conformacional que sufra el ADN que conllevaría una disminución de la polaridad de la región donde se encuentran localizadas las moléculas de EtBr que aún están intercaladas y, en consecuencia, su intensidad de emisión aumentaría.

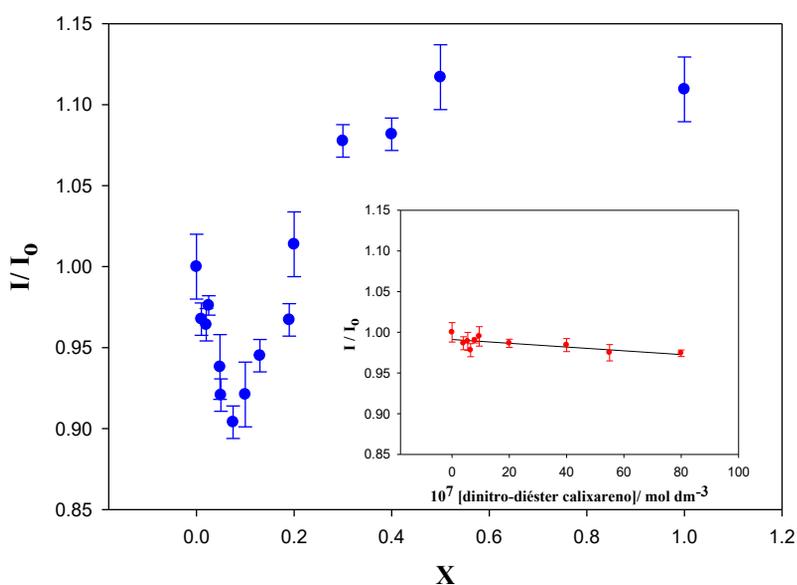


Figura 3.4. Representación gráfica de I/I_0 del bromuro de etidio en disoluciones de dinitro-diéster calixareno/ADN frente a la relación molar de X ($[ADN]= 2.00 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³). La figura insertada muestra la intensidad de emisión relativa del bromuro de etidio en presencia de diferentes concentraciones del calixareno *en* ausencia de ADN. Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor de X ($n= 5$).

En la figura insertada dentro de la *Figura 3.4* se puede observar la influencia de la concentración de calixareno sobre la intensidad de emisión de fluorescencia relativa del EtBr, en ausencia de polinucleótido. La intensidad del EtBr muestra un cambio prácticamente despreciable en ausencia de ADN. Por lo que, el dinitro-diéster calixareno no interacciona con el EtBr, o al menos, el espectro de emisión del colorante orgánico no cambia en presencia de este macrociclo. Las concentraciones de calixareno utilizadas en ausencia de ADN son las mismas que las utilizadas en su presencia.

El calixareno funcionalizado con grupos fluoreno muestra por sí mismo un espectro de emisión de fluorescencia con un máximo a una longitud de onda de 318 nm. Esta característica nos permite extraer información acerca del complejo difluoreno-diéster calixareno/ADN, sin necesidad de adicionar ninguna otra especie. En la *Figura 3.5* se muestra la variación que experimenta I/I_0 , a 318 nm, para distintas relaciones molares X. Los resultados obtenidos muestran que a valores pequeños de X tiene lugar una disminución de la intensidad de emisión. Sin embargo, a partir de un valor de $X=0.005$, la intensidad de emisión comienza a aumentar hasta alcanzar un valor aproximadamente constante. No ha sido observado ningún desplazamiento en la banda de emisión del macrociclo. En este caso, el fenómeno de fluorescencia estudiado se debe a la excitación de dos grupos aromáticos policíclicos (fluorenos) que dicho calixareno posee. Estos grupos presentan una simetría planar, por lo que es posible que se intercalen entre los pares de bases del polinucleótido. De hecho, esta posible intercalación podría explicar la disminución observada en I/I_0 a bajos valores de X, puesto que un cambio en la polaridad del entorno de los fluorenos podría causar una disminución de la relación I/I_0 . Al aumentar el valor de X, la intensidad de emisión relativa vuelve a aumentar. Esto podría estar relacionado con la formación de dímeros de difluoreno-diéster calixareno, al aumentar su concentración en el medio. La formación de dímeros en este macrociclo ha sido previamente mencionada en la literatura y es debida a interacciones de tipo π - π entre los anillos aromáticos

de los grupos funcionales del calixareno (ver *Figura 3.6*).¹⁹ La aparición de dichos dímeros supondría cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia, no sólo porque el entorno de las moléculas emisoras puede cambiar, sino también porque podría revertir el equilibrio de formación del complejo calixareno/ADN, favoreciendo la interacción entre moléculas de calixareno y, con ello, debilitando sus interacciones con el ADN.

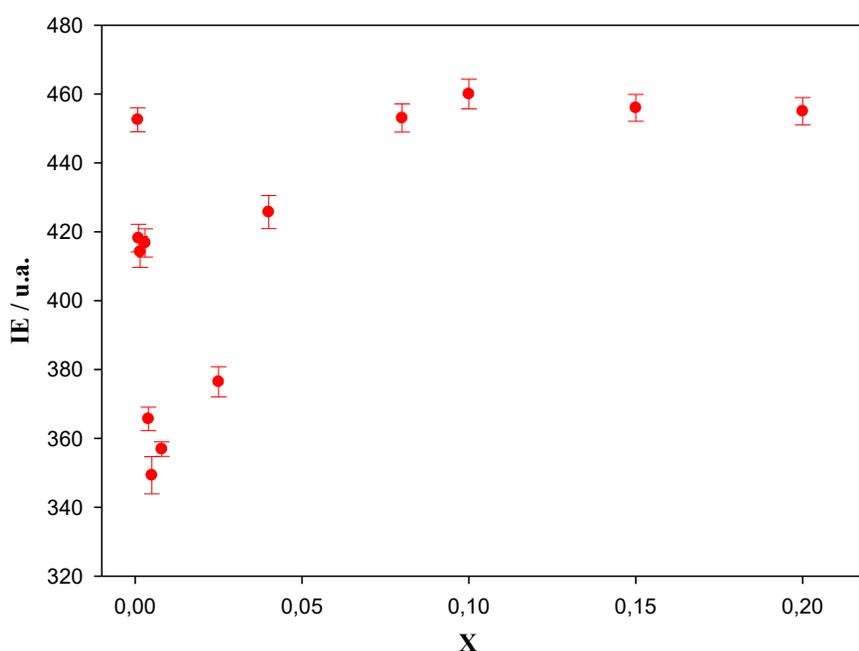


Figura 3.5. Representación de la intensidad de emisión de una disolución del difluoreno-diéster calixareno/ADN a distintos valores de X, a concentración fija de macrociclo ($[\text{calixareno}] = 2.00 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$). La figura insertada muestra la intensidad de emisión relativa del calixareno frente a la concentración de ADN ($[\text{calixareno}] = 2.00 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$). Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor de X o concentración de polinucleótido ($n = 5$).

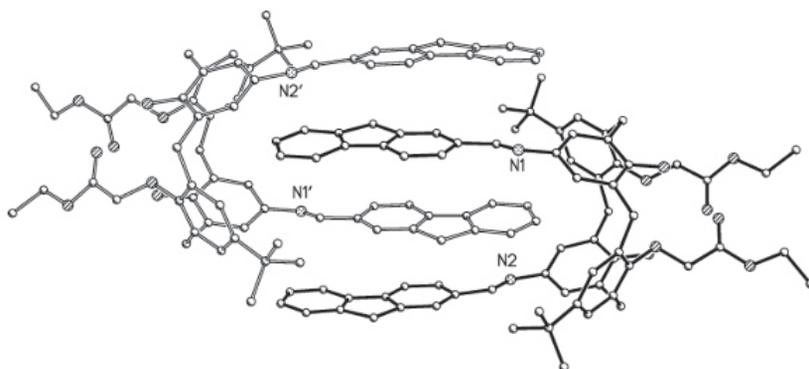
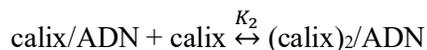


Figura 3.6. Representación esquemática de posibles estructuras supramoleculares con moléculas de difluoreno-diéster calixareno.¹⁹

Experimentos realizados a una relación molar de X mayor que 0.2 no se han llevado a cabo debido a problemas de solubilidad con el calixareno.

El estudio de la interacción del difluoreno-diéster calixareno con el ADN puede ser tratado mediante el uso del modelo de dos estados o de pseudofase,²⁰ donde se consideran dos posibles estados para el macrociclo, un estado libre y otro ligado al polinucleótido:



En base a este mecanismo, se ha deducido la ec. 3.2, en la que se incluye la variación que experimenta la intensidad de emisión total del sistema, en función de la concentración de polinucleótido (ver *Figura 3.7*):

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\left(\frac{I}{I_0}\right)_W + K_1 \left(\frac{I}{I_0}\right)_1 [\text{ADN}] + K_1 K_2 \left(\frac{I}{I_0}\right)_2 [\text{ADN}]^2}{1 + K_1 [\text{ADN}] + K_1 K_2 [\text{ADN}]^2} \quad (3.2)$$

donde $\left(\frac{I}{I_0}\right)_W$, $\left(\frac{I}{I_0}\right)_1$ y $\left(\frac{I}{I_0}\right)_2$ son las intensidades de emisión de fluorescencia relativas libre y totalmente ligada, para los procesos 1 y 2, respectivamente. K_1 y K_2 son las constantes de equilibrio de estos. Con este ajuste multiparamétrico, se obtuvieron las constantes de equilibrio $K_1 = 2.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y $K_2 = 219 \text{ M}^{-1}$. Estos resultados están de acuerdo con los valores de K_1 obtenidos por R. Zadnád y colaboradores en procesos de asociación de dímeros de calixarenos con diferentes ácidos nucleicos de doble cadena.¹⁰

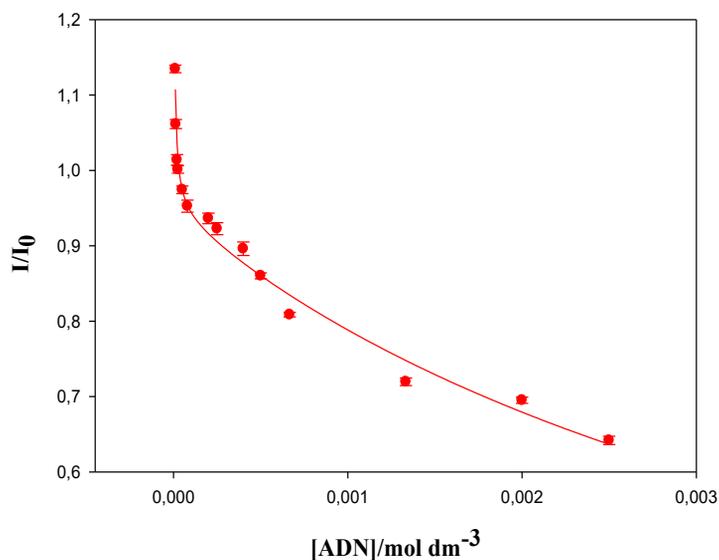


Figura 3.7. Dependencia de la relación de I/I_0 del sistema difluoreno-diéster calixareno/ADN frente a la concentración de polinucleótido ($[\text{calixareno}] = 2.00 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$). La línea sólida corresponde al ajuste multiparamétrico obtenido. Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor de concentración de polinucleótido ($n = 5$).

Para obtener información adicional sobre las interacciones entre el dinitro-diéster calixareno y el difluoreno-diéster calixareno con el polinucleótido, se realizaron medidas de dicroísmo circular (DC) a distintas relaciones molares X.

Se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular de disoluciones de ADN en presencia de una determinada concentración constante de calixareno, variando la concentración de ADN. Este procedimiento se llevó a cabo a distintas concentraciones de calixareno para el dinitro-diéster calix[4]areno, debido a problemas de solubilidad con el macrociclo. Sin embargo, para el difluoreno-diéster calixareno se realizaron las experiencias a concentración constante de polinucleótido y a diferentes concentraciones de macrociclo. Con estos estudios se pretenden determinar posibles cambios conformacionales sufridos por el ADN debido a las interacciones de éste con los calixarenos. El ADN en disolución acuosa adopta una conformación en forma B dextrógira, que muestra un espectro de DC característico en la región ultravioleta cercana (220–320 nm). El espectro muestra una banda positiva a aproximadamente 278 nm y una banda negativa a 247 nm. Estas bandas son causadas, respectivamente, por las interacciones de apilamiento entre los pares de bases y por la supraestructura helicoidal del polinucleótido que genera un entorno asimétrico para las bases.²¹ Las alteraciones conformacionales del ADN causadas por su interacción con diferentes ligandos, producen cambios en su espectro de DC.^{22,23}

Teniendo en cuenta que, debido a la baja solubilidad en agua de los calixarenos neutros estudiados en este capítulo, nuestras disoluciones han sido preparadas en una mezcla de MeOH/H₂O, se llevó a cabo un estudio previo para comprobar si el espectro de DC del ADN se ve afectado o no por el porcentaje de metanol utilizado. Los resultados mostraron que las bandas características del espectro de DC del ADN no sufren ninguna modificación en relación a la forma del espectro con el contenido de alcohol utilizado en la

mezcla. Sólo se observó una pequeña disminución de la intensidad de emisión con el porcentaje de alcohol (*Figura 3.8*).

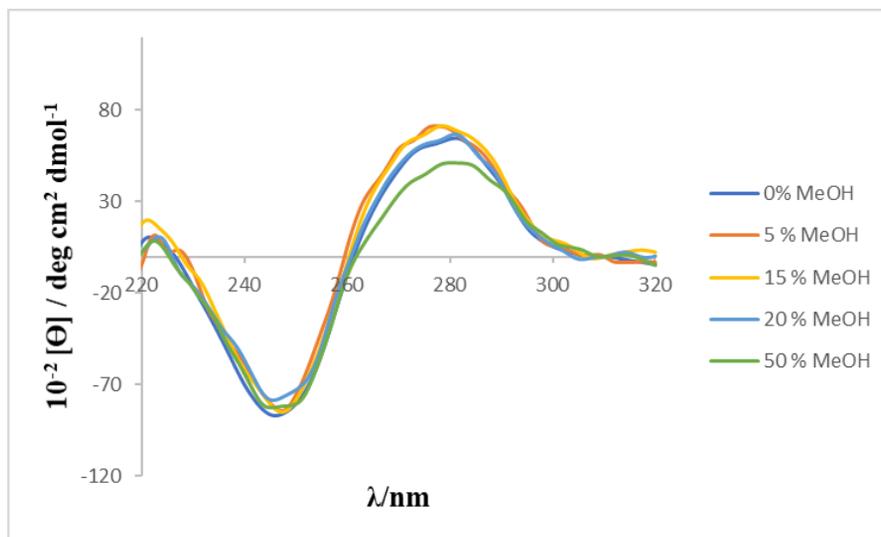


Figura 3.8. Espectro de dicroísmo circular del ADN a diferentes relaciones volumétricas MeOH/agua ($[\text{ADN}] = 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$).

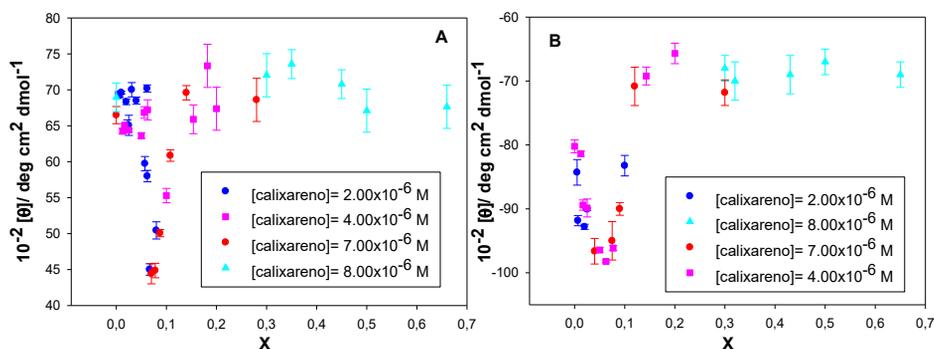


Figura 3.9. Dependencia de la elipticidad molar de la banda positiva (A) y negativa (B) con respecto a la relación molar de X a diferentes concentraciones del dinitro-diéster calixareno. Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor de X (n= 10).

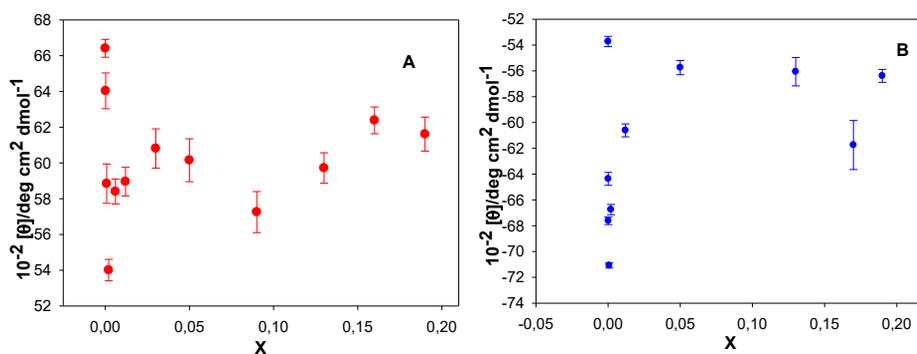


Figura 3.10. Dependencia de la elipticidad molar de la banda positiva (A) y negativa (B) con respecto a la relación molar de X a diferentes concentraciones del dinitro-diéster calixareno ($[\text{ADN}] = 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor de X o concentración de polinucleótido ($n = 10$).

La Figura 3.9 y Figura 3.10 muestran la dependencia de la elipticidad molar de las bandas positivas y negativa del espectro de DC del ADN de la fracción molar X para los dos calixarenos. Se observa que la elipticidad molar de ambas bandas disminuye en el rango de X entre 0 y 0.07 para el dinitro-diéster calixareno y en el intervalo de X entre 0 y 0.002 para el difluoreno-diéster calixareno. Además, si bien el perfil o forma del espectro se mantuvo constante en todo el intervalo de valores de X estudiados, las bandas mostraron un desplazamiento batocrómico de aproximadamente 4 nm para el dinitro-diéster calixareno y de 3 nm para el difluoreno-diéster calixareno (ver Figura 3.11). El desplazamiento observado de la longitud de onda del punto de inflexión del espectro hacia la región del rojo podría estar relacionado con la desnaturalización del polinucleótido; es decir, con una separación de la doble hélice del ADN, dando como resultado dos moléculas de ADN de una sola hebra.¹⁵ Teniendo en cuenta que las cadenas de ADN se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarios, la posible

intercalación de los macrociclos entre ellas podría provocar la rotura del enlace de hidrógeno entre los pares de bases, afectando al espectro. Otra posibilidad, mencionada anteriormente, es que la formación de agregados de moléculas de calixarenos pueda afectar a la conformación del ADN. Para obtener información adicional sobre esto se realizaron medidas de viscosidad y de temperatura *melting*.

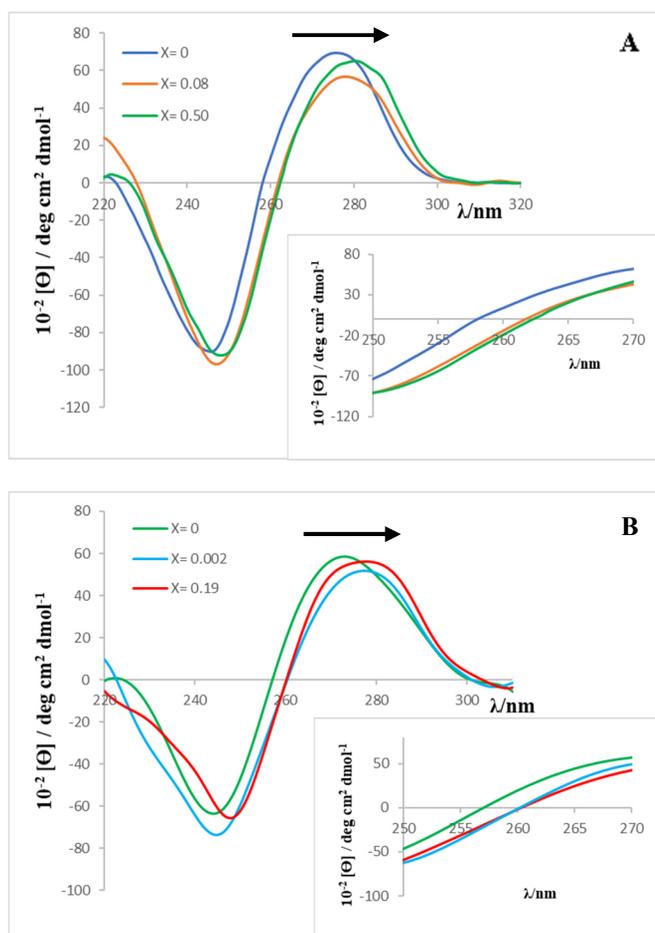


Figura 3.11. Espectro de dicroísmo circular del ADN a diferentes valores de X. La figura insertada muestra el punto de inflexión para cada relación molar de X. (A: dinitro-diéster calixareno y B: difluoreno- diéster calixareno) ($[\text{ADN}] = 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$).

Se puede obtener información sobre las propiedades macroscópicas de los sistemas microheterogéneos a partir de medidas de viscosidad.²⁴ De hecho, con respecto a las disoluciones de ADN, se pueden distinguir los distintos modos de unión de un ligando con el polinucleótido. Si el ligando interacciona de tal forma que causa la separación de las hebras de ADN, esto resultaría en un aumento de la viscosidad de la disolución.²⁴ Por el contrario, si es una unión de tipo *groove* o electrostática no se esperan cambios en la viscosidad.²⁶ Además, hay que tener en cuenta que si las interacciones causan cambios morfológicos en el polinucleótido se observarán también variaciones en la viscosidad. Por ejemplo, si el ADN se compacta, se espera una disminución de esta. Las *Figura 3.12A* y *Figura 3.13A* muestran la dependencia de la viscosidad relativa η_r , con respecto a la relación molar X para cada uno de los macrociclos estudiados. Como puede verse, η_r aumenta a valores bajos de X y, posteriormente, disminuye al aumentar la concentración de los macrociclos, a concentración fija de ADN. El máximo se observó a un valor de X de ~ 0.07 para el dinitro-diéster calixareno y de ~ 0.003 para el difluoreno-diéster calixareno.

El aumento inicial de la viscosidad podría deberse a una desnaturalización del ADN de doble cadena, debido a la interacción calixareno/ADN. Para investigar esta posibilidad, la viscosidad de disoluciones de ADN monocatenario fue medida en presencia de distintas concentraciones del dinitro-diéster calixareno y del difluoreno-diéster calixareno (*Figura 3.12B* y *Figura 3.13B*, respectivamente), manteniendo constante la concentración de polinucleótido. En este caso, se observó una constancia de la viscosidad en el rango de X de 0 a 0.07 para el dinitro-diéster calixareno y de 0 a 0.003 para el difluoreno-diéster calixareno. Posteriormente, la viscosidad relativa de la disolución de ADN disminuye al aumentar la concentración de ambos macrociclos, como ocurría en el ADN de

doble hebra. Por lo tanto, estos resultados sugieren que se produce una desnaturalización del polinucleótido.

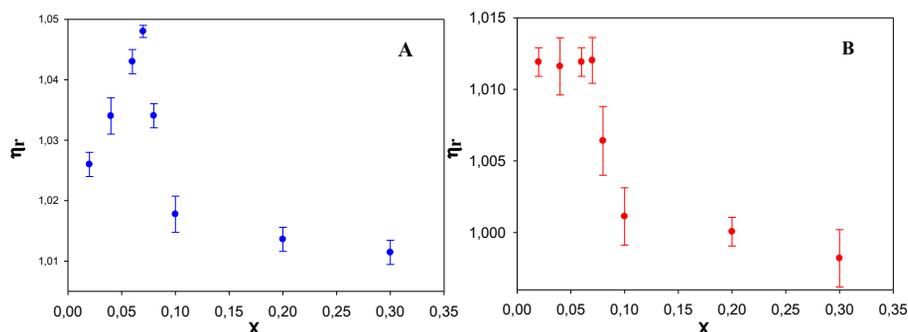


Figura 3.12. Viscosidad relativa de disoluciones calixareno/dsDNA (A) y calixareno/ssDNA (B) a diferentes valores de X para el dinitro-diéster calixareno ($[ADN] = 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor de X (n= 10).

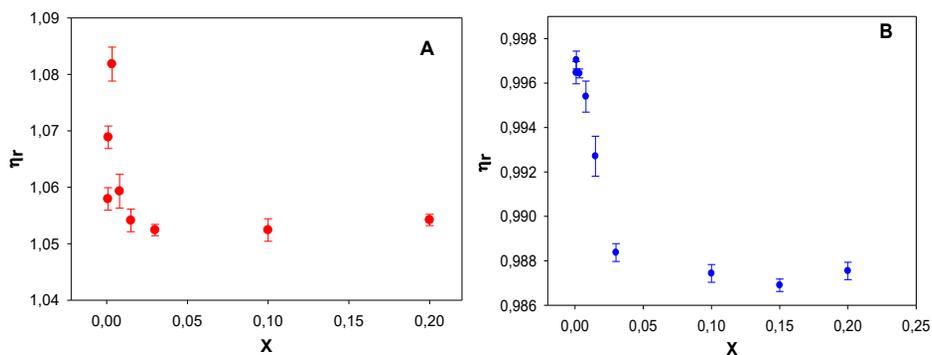


Figura 3.13. Viscosidad relativa de las disoluciones calixareno/dsDNA (A) y calixareno/ssDNA (B) a diferentes valores de X para el difluoreno-diéster calixareno ($[ADN] = 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor de X (n= 10).

Conviene indicar que, previamente a los estudios de viscosidad, se comprobó la estabilidad de la disolución de ssDNA en la mezcla metanol/agua utilizada como medio (ver la *Figura 3.14*).

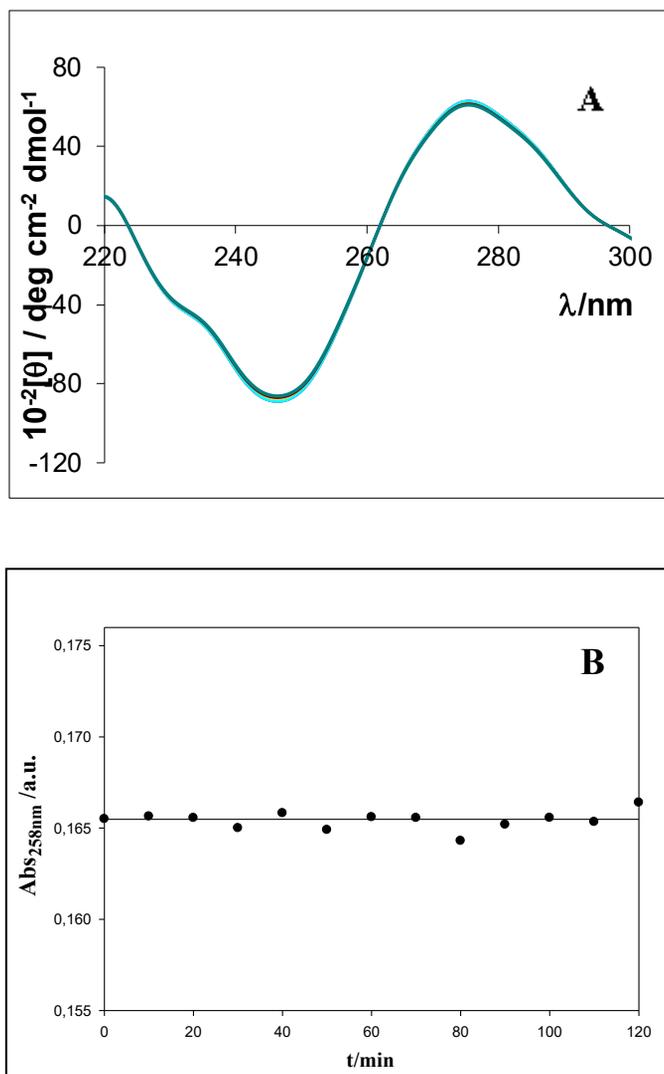


Figura 3.14. Estabilidad de una disolución de ssDNA en MeOH/agua al 20% (v/v) durante 120 min, obtenida mediante medidas de dicroísmo circular (A) y absorbancia (B).

Para profundizar más en el modo de interacción de los calixarenos con el ADN, se realizaron medidas de la temperatura *melting*, T_m . Esta temperatura fue determinada como la media de las temperaturas inicial y final correspondientes al proceso de *melting*. Los perfiles fueron casi lineales en la región estudiada. La *Figura 3.15* muestra la dependencia de T_m con la relación molar X . Se observó una disminución inicial de la temperatura *melting* en el rango de X desde 0 a 0.07 para el dinitro-diéster calixareno y desde 0 a 0.003 para el difluoreno-diéster calixareno. Un aumento posterior del valor de X resultó en un aumento de T_m para ambos macrociclos. Se ve que los valores de X donde se observa un valor mínimo de T_m coinciden con los observados a partir de las medidas de viscosidad.

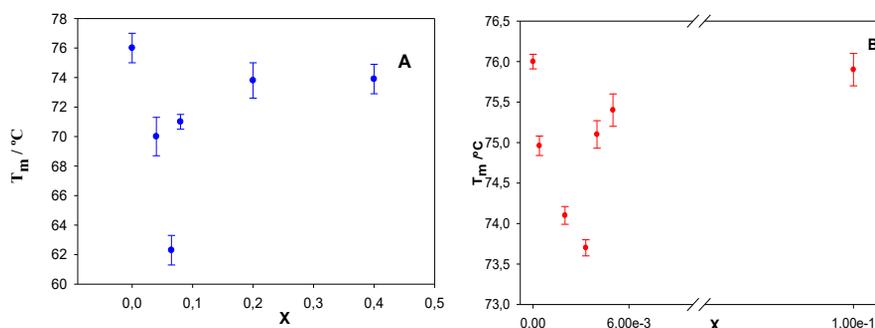


Figura 3.15. Valores de temperatura de *melting* obtenidos a diferentes valores de X para el dinitro-diéster calixareno (A) y para el difluoreno-diéster calixareno (B) ($[ADN]= 1.20 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor de X ($n = 3$).

Quando un ligando se intercala entre los pares de bases del polinucleótido, sin afectar a la separación de la doble hélice, se produce un aumento de la rigidez de la doble hélice del ADN y una estabilización de la forma B.²⁵ Esto supondría un aumento de T_m y podría ir acompañado de cambios conformacionales en el polinucleótido. Hay que tener en cuenta que

el nitrobenzoceno (y sus derivados) y el fluoreno (y sus derivados) interaccionan con el ADN mediante intercalación entre los pares de bases del polinucleótido.²⁶⁻²⁹ Así que, uno podría pensar que los calixarenos se intercalen con el ADN a través de los grupos nitrobenzoceno y del fluoreno, respectivamente. Dado que se observa una disminución inicial de la temperatura *melting* a bajas relaciones molares X, la interacción de los calixarenos con el polinucleótido tiene lugar a través de una unión de tipo *groove*, causando la rotura de los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases y desestabilizando la doble hélice debido a una separación parcial de la doble hebra. Este tipo de comportamiento ha sido previamente observado para otras especies. Por ejemplo, los iones Cu^{2+} inducen una rotura de los enlaces de hidrógeno entre la guanina y citosina, dando lugar a una desestabilización de la doble hélice.³⁰ Otros iones como Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , y Co^{2+} , también producen la desestabilización de la doble hélice del ADN a altas concentraciones.³¹ El aumento en la temperatura *melting* observado para relaciones molares X más altos, $X > 0.07$ para el dinitro-diéster calixareno y $X > 0.003$ para el difluoreno-diéster calixareno, podría indicar cambios en la conformación del ADN.

F. Supian y colaboradores observaron que se formaban agregados de calixarenos en estado sólido para calix[4]arenos-Schiff neutros, en los que las moléculas estaban apiladas unas dentro de las otras.^{19,32} Teniendo esto en cuenta, para los calixarenos estudiados en este capítulo se podrían haber formado agregados supramoleculares en disolución (ver la *Figura 3.6* y la *Figura 3.16*). Si esto ocurriera, la formación de estos agregados estaría favorecida a altas concentraciones de macrociclo.

Así pues, el comportamiento observado mediante diferentes técnicas a valores más altos de $X = 0.07$ y de $X = 0.003$, podría ser debido a la formación de agregados supramoleculares, que se vería favorecida al aumentar la concentración del macrociclo. Si estas estructuras estabilizan las moléculas de calixareno en la disolución acuosa, la adición de más calixareno al medio

debilitaría las interacciones calixareno/ADN, dado que el equilibrio de formación del complejo calixareno/ADN revertiría, quedando libres las moléculas de polinucleótido, que adoptarían de nuevo su conformación inicial.

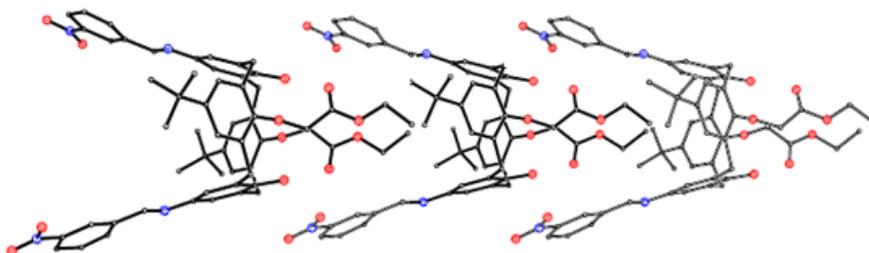


Figura 3.16. Representación esquemática de estructuras supramoleculares con moléculas de dinitro-diéster calixareno.

Los cambios conformacionales debidos a las interacciones calixareno/ADN, a valores bajos de X, podrían explicar el aumento de viscosidad relativa inicial que se observa. Si, posteriormente, un aumento de X resulta en la formación de agregados de calixareno, con la correspondiente disminución de las interacciones calixareno/ADN, una disminución de la viscosidad relativa sería de esperar.

Se puede obtener información adicional a partir de las medidas de *melting*. La transición de *melting* del ADN es altamente cooperativa ($\Delta T \approx 10\text{--}15\text{ }^\circ\text{C}$, ver *Figura 3.17A,D-F*, *Figura 3.18A-B* y *Figura 3.18D-F*). Sin embargo, se obtiene una tendencia menos cooperativa para $X= 0.04$ y 0.065 para el dinitro-diéster calixareno y para $X= 0.003$ para el difluoreno-diéster calixareno ($\Delta T \approx 30^\circ\text{C}$, ver las *Figura 3.17B-C* y *Figura 3.18C*). Una transición menos cooperativa puede deberse a una apertura parcial de la doble hélice, que iría

acompañada de una disminución de T_m , que es lo que se observa experimentalmente.

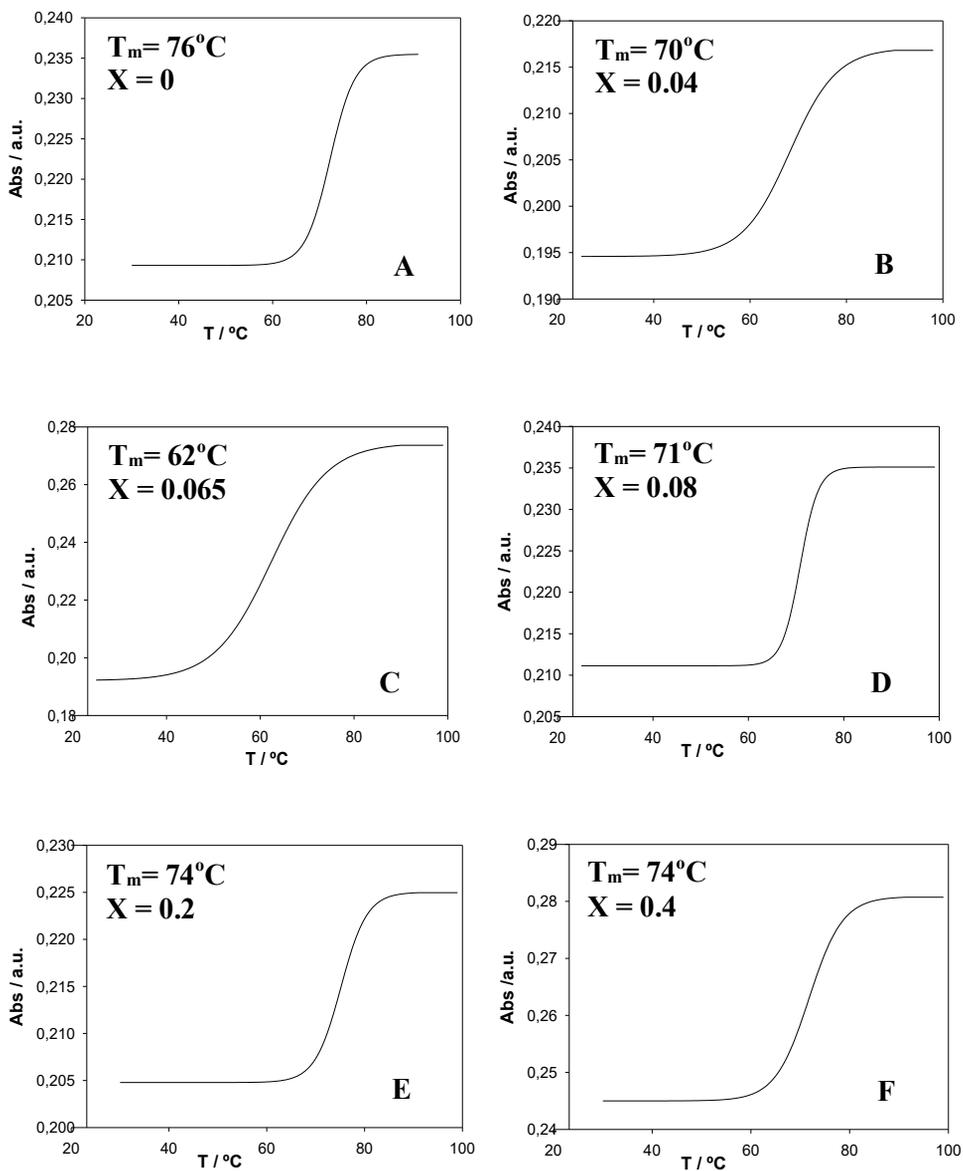


Figura 3.17. (A-F) Perfiles de *melting* obtenidos a diferentes relaciones molares de X para el dinitro-diéster calixareno ($[ADN] = 1.20 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}).

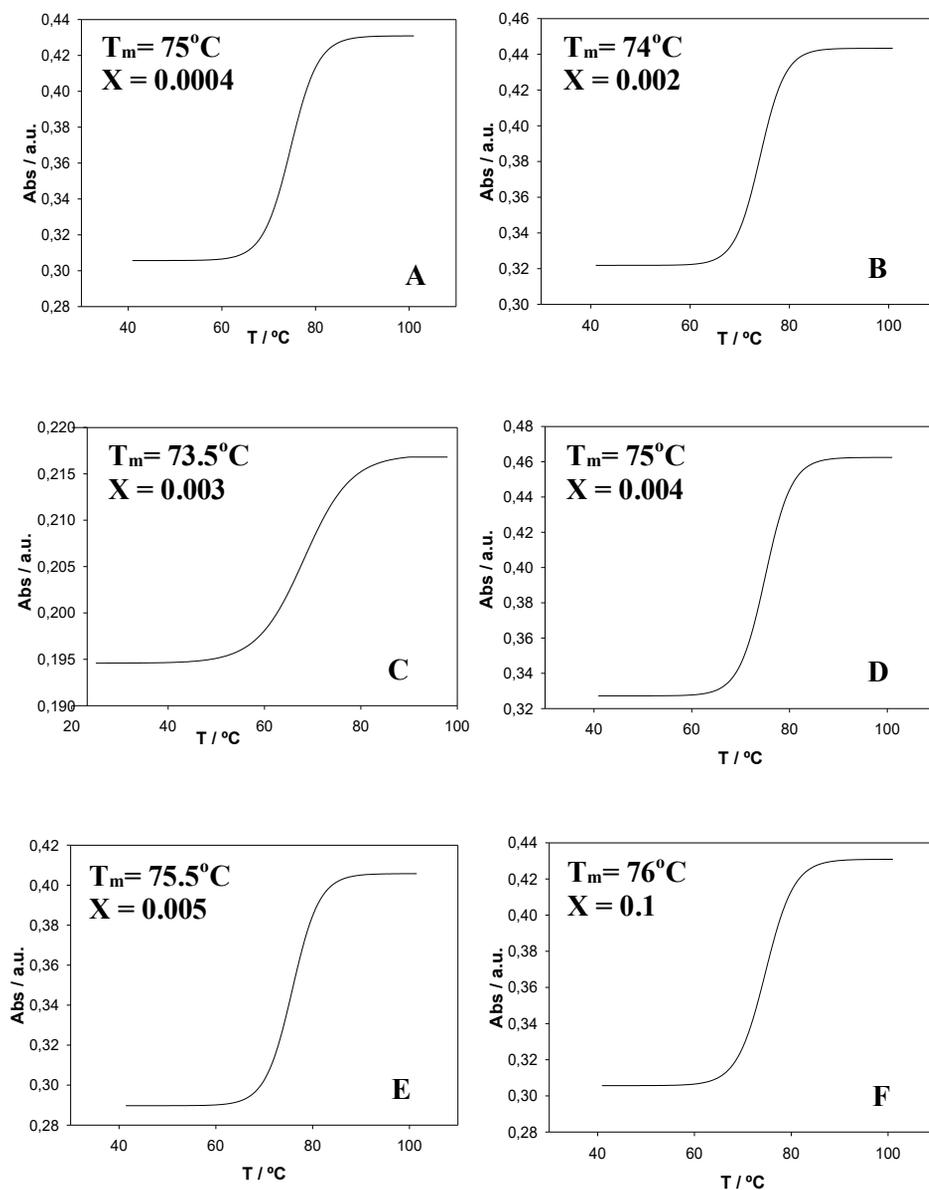


Figura 3.18. (A-F) Perfiles de *melting* obtenidos a diferentes relaciones molares de X para el difluoreno-diéster calixareno ($[ADN] = 1.20 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$).

Con la idea de visualizar la estructura de los complejos calixarenos/ADN, se realizaron medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM). La *Figura 3.19* y *Figura 3.20* muestran los resultados obtenidos. A baja concentración de calixareno, el macrociclo interactúa con el polinucleótido induciendo un aumento en la flexión de la molécula de ADN. Este aumento resulta en una disminución de la persistencia de la longitud, el cual conduce a la formación y estabilización de los bucles intramoleculares (ver la *Figura 3.19B-D* y la *Figura 3.20A-B*). Aquí, la estabilización ocurre por la formación de estructuras como flores y discos, la cual es considerada por Y. Fang y J. Hoh³³ como un tipo de estabilización de hebra con hebra.³⁴ A valores más altos de 0.07 para el dinitro-diéster calixareno y de 0.003 para el difluoreno-diéster calixareno, un cambio estructural del polinucleótido desde un estado más compacto (parcial) a una estructura más extendida es observado. Es decir, se produce un proceso de decompactación que se muestra en la *Figura 3.19E* y la *Figura 3.20C-D*. Las estructuras compactas parecen estar más separadas, quizás debido a la pérdida de bucles. Estructuras perla-anillo aparecen. Esta nueva disposición del polinucleótido podría deberse al apilamiento de las moléculas de calixareno en la disolución, para formar agregados (como se puede ver en la *Figura 3.6* y la *Figura 3.16*), lo que produciría un debilitamiento de las interacciones entre los calixarenos y el ADN, que volvería a presentar una estructura menos compacta, en concordancia con lo observado con las demás técnicas.

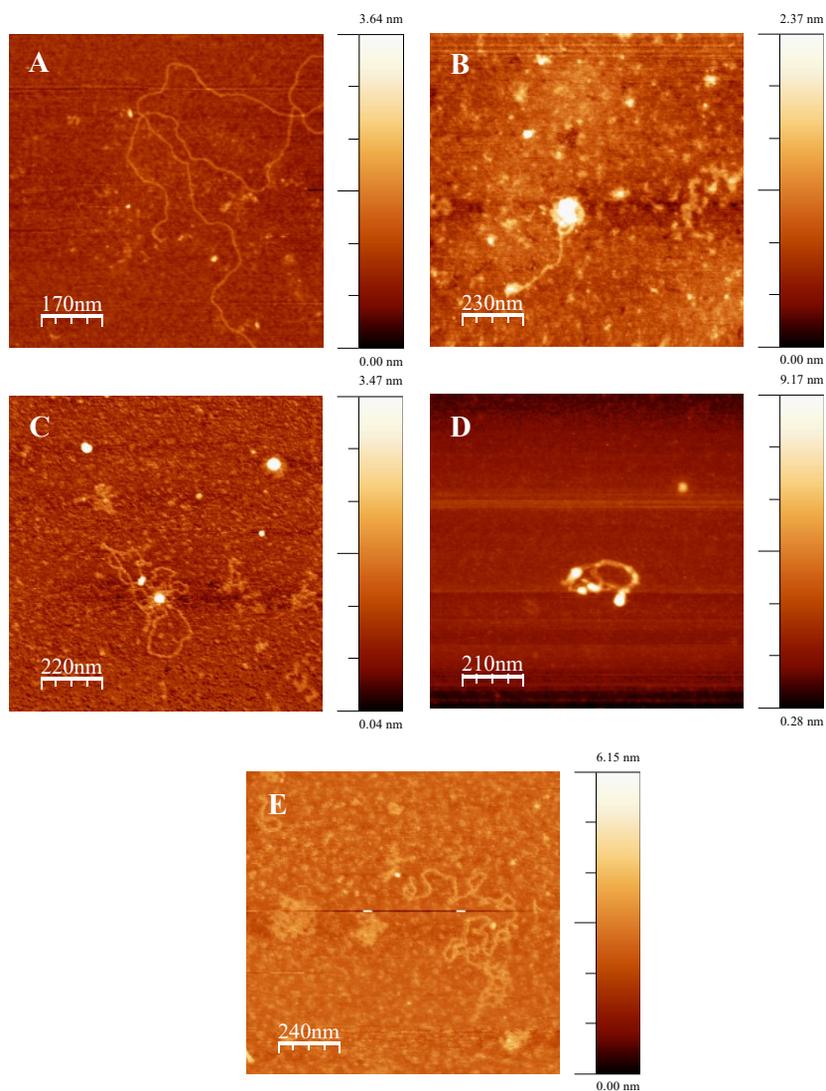


Figura 3.19. Imagen topográfica de AFM de ADN de timo de ternera adsorbido sobre una superficie de mica modificada con APTES en la ausencia (A) y presencia de dinitro-diéster calixareno (B-C $X=0.06$, D $X=0.07$, y E $X=0.35$).

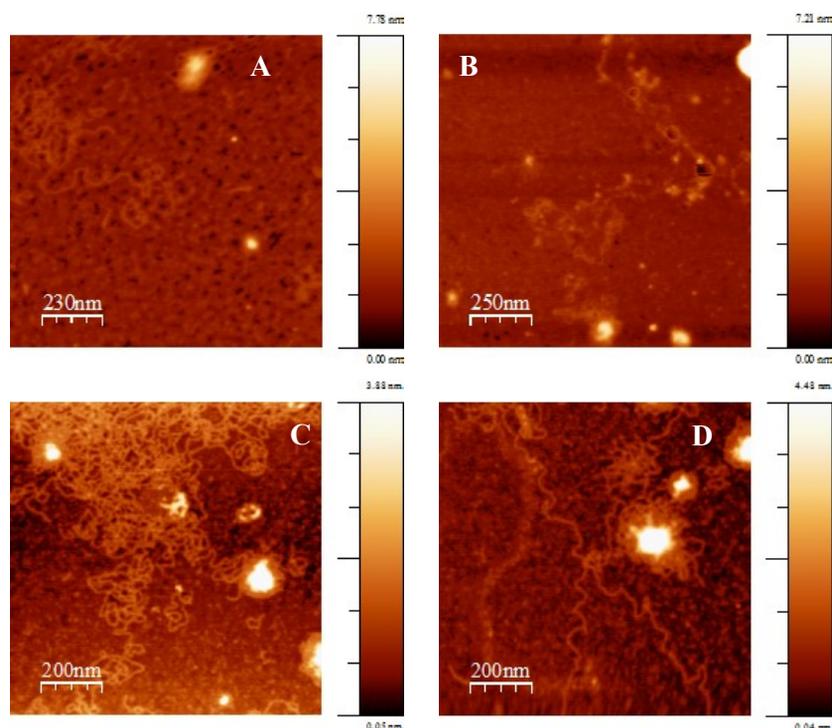


Figura 3.20. Imagen topográfica de AFM de ADN de timo de ternera adsorbido sobre una superficie de mica modificada con APTES en presencia del difluoreno-diéster calixareno (A X=0.0008, B X=0.003, y C-D X=0.1).

La formación de estructuras supramoleculares ha sido demostrada mediante medidas de fluorescencia. El dinitro-diéster calixareno muestra una pequeña banda de emisión a 420 nm cuando es excitado a 367 nm. El difluoreno-diéster calixareno muestra dos bandas de emisión a 410 y 638 nm cuando es excitado a 318 nm. El espectro de emisión para ambos calixarenos fue registrado en una disolución MeOH/agua (20% agua/MeOH (v/v), pH = 7.0 con cacodilato 0.01 M) a diferentes concentraciones de macrociclo. Los resultados se muestran en la *Figura 3.21*, donde se observa un aumento lineal

de la intensidad de emisión cuando aumenta la concentración de calixareno y, a partir de una determinada concentración, se produce un cambio en la pendiente. Este abrupto cambio de tendencia en la intensidad de emisión de fluorescencia se puede relacionar con la formación de agregados supramoleculares. Además, un aumento en la hidrofobicidad del macrociclo resulta en una formación más temprana de estos agregados supramoleculares.

Los resultados obtenidos en este trabajo han sido comparados con resultados previos de nuestro grupo de investigación en el estudio de tensioactivos catiónicos como vectores para la condensación de ADN.^{35,36} Por ejemplo, el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o tensioactivos diméricos (12-2-12,2Br⁻ y 12-10-12,2Br⁻) provocan la compactación del polinucleótido. La interacción electrostática entre la cabeza catiónica de los surfactantes y los grupos fosfatos del ADN, así como las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de tensioactivo que se encuentran localizadas en la superficie del polinucleótido, son responsables de la compactación. No obstante, aumentando la concentración del tensioactivo, se observó una decompactación del ADN. Este comportamiento fue explicado en base a la formación de micelas en la disolución. Los calixarenos estudiados también inducen la compactación del polinucleótido. Sin embargo, su modo de unión al ADN es diferente. Antes de originar un cambio conformacional en el ADN, estos calixarenos interactúan con el polinucleótido mediante un modo de unión de tipo *groove*, que induce la rotura del enlace de hidrógeno entre los pares de bases y, por lo tanto, da lugar a la desnaturalización parcial de la doble hélice, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente. Este hecho favorece el proceso de condensación. Como ocurría con los tensioactivos, después de una determinada concentración de calixareno, tiene lugar una decompactación del polinucleótido. La formación de estructuras supramoleculares entre las moléculas del macrociclo en disolución favorece la rotura de los glóbulos compactos de ADN.

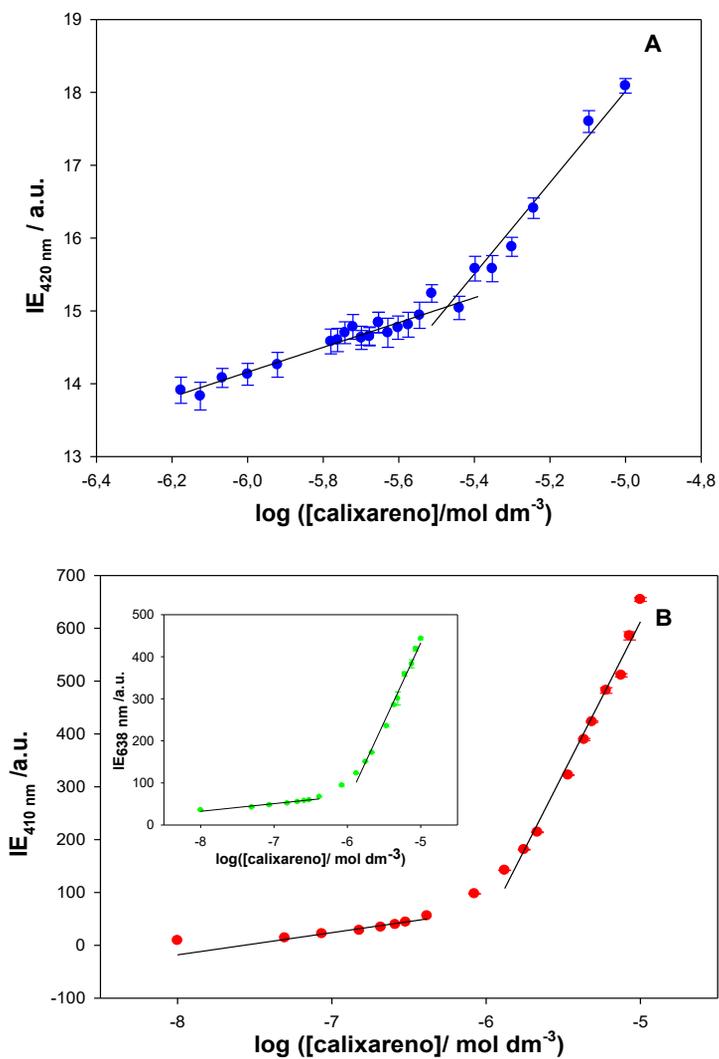


Figura 3.21. Intensidad de emisión del dinitro-diéster calixareno ($\lambda_{\text{exc}} = 367 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$) (A) y del difluoreno-diéster calixareno ($\lambda_{\text{exc}} = 318 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ y } 638 \text{ nm}$) (B) en disolución acuosa a diferentes concentraciones de macrociclo. Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor de concentración de calixareno ($n = 5$).

Una vez investigada la interacción entre los calixarenos y el ADN, y dado que el objetivo del trabajo consiste en utilizar el dinitro-diéster calixareno y el difluoreno-diéster calixareno como vectores, es imprescindible investigar la viabilidad de diferentes líneas celulares en presencia de distintas concentraciones de estos. Para ello se midió el efecto citotóxico que estos macrociclos ejercen sobre diferentes líneas celulares. Estos estudios se realizaron durante 24 h. Los resultados se muestran en la *Figura 3.22*.

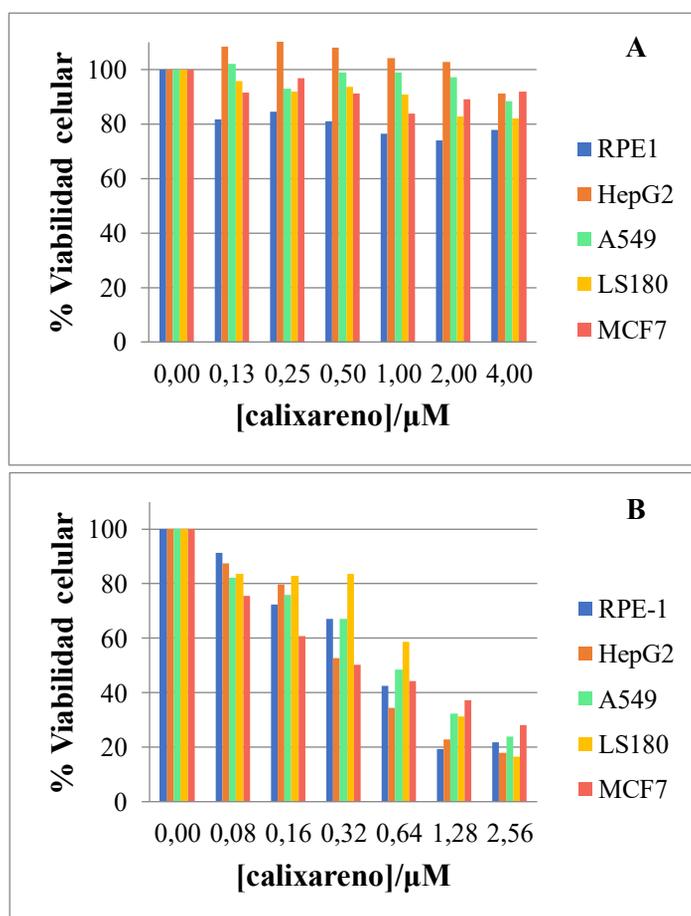


Figura 3.22. % de viabilidad celular en presencia de diferentes cantidades del dinitro-diéster calixareno (A) y del difluoreno-diéster calixareno (B) para diferentes líneas celulares durante un período de 24 h.

Los datos muestran una baja citotoxicidad del dinitro-diéster calixareno para las líneas cancerosas. Una mayor citotoxicidad en las líneas cancerosas es observada para el difluoreno-diéster calixareno, sobre todo a altas concentraciones de calixareno. Este macrociclo presenta una selectividad específica sobre las líneas HepG2 y MCF7, que parece desaparecer a altas concentraciones de macrociclo.

Ensayos de citotoxicidad fueron también realizados con una línea celular normal RPE-1. Los mismos resultados que para las líneas cancerosas fueron obtenidos para ambos casos. Estos resultados demuestran que los calix[4]arenos-Schiff neutros estudiados pueden ser utilizados como nanovectores o nanotransportadores en Nanomedicina a las concentraciones que presenten alta viabilidad celular.

3.3. Conclusiones

En conclusión, los calix[4]arenos-Schiff neutros dinitro-diéster y difluoreno-diéster calixarenos interactúan con el ADN de timo de ternera, generando diferentes cambios conformacionales. A bajas concentraciones de calixareno, el macrociclo se une al surco del polinucleótido, lo cual induce una desnaturalización parcial de la doble cadena. Esta interacción resulta en una compactación del ADN: la macromolécula va desde un estado elongado (bobina) a uno más compacto (glóbulo). Cuando la concentración de calixareno aumenta ($X > 0.07$ para el dinitro-diéster calixareno y $X > 0.003$ para el difluoreno-diéster calixareno), se observa la decompactación de la macromolécula, debido a la formación de agregados de calixareno, que favorecen las interacciones de estos entre sí, respecto de las interacciones calixareno/ADN.

Los datos de citotoxicidad indican que el dinitro-diéster calixareno es un candidato potencial para su empleo en tranfección génica o como nanotransportador de fármacos. El difluoreno-diéster calixareno presenta una citotoxicidad mayor, por lo que parece menos idóneo para ser utilizado como nanovector. Pero, quizás sí podría actuar como nanotransportador de sustancias anticancerígenas como doxorubicina, citarabina, paclitaxel, etc.

3.4. Referencias bibliográficas

1. WATSON, J. D. & CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
2. Singh, R. *et al.* Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: Toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4388–4396 (2005).
3. Bombelli, C., Faggioli, F., Luciani, P., Mancini, G. & Sacco, M. G. Efficient transfection of DNA by liposomes formulated with cationic gemini amphiphiles. *J. Med. Chem.* **48**, 5378–5382 (2005).
4. Farjo, R., Skaggs, J., Quiambao, A. B., Cooper, M. J. & Naash, M. I. Efficient Non-Viral Ocular Gene Transfer with Compacted DNA Nanoparticles. *PLoS One* **1**, e38 (2006).
5. Sansone, F. *et al.* DNA condensation and cell transfection properties of guanidinium calixarenes: Dependence on macrocycle lipophilicity, size, and conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14528–14536 (2006).
6. Rodik, R. V. *et al.* Virus-sized DNA nanoparticles for gene delivery based on micelles of cationic calixarenes. *Chem. - A Eur. J.* **17**, 5526–5538 (2011).
7. Rodik, R. V., Anthony, A. S., Kalchenko, V. I., Mély, Y. & Klymchenko, A. S. Cationic amphiphilic calixarenes to compact DNA into small nanoparticles for gene delivery. *New J. Chem.* **39**, 1654–1664 (2015).
8. Lalor, R., DiGesso, J. L., Mueller, A. & Matthews, S. E. Efficient gene transfection with functionalised multicalixarenes. *Chem. Commun.* 4907–4909 (2007). doi:10.1039/b712100h
9. Rullaund, V., Siragusa, M., Cumbo, A., Gygax, D. & Shahgaldian, P. DNA surface coating of calixarene-based nanoparticles: A sequence-dependent binding mechanism. *Chem. Commun.* **48**, 12186–12188 (2012).
10. Zadnard, R. & Schrader, T. DNA recognition with large calixarene dimers.

- Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 2703–2706 (2006).
11. Blecking, C. J., Hu, W., Zadnurd, R., Dasgupta, A. & Schrader, T. A modular synthetic route to dimeric calixarenes: A new family of DNA major groove binders. *Synthesis (Stuttg)*. 1193–1204 (2011). doi:10.1055/s-0030-1259980
 12. Jiménez Blanco, J. L., Benito, J. M., Ortiz Mellet, C. & García Fernández, J. M. Molecular nanoparticle-based gene delivery systems. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **42**, 18–37 (2017).
 13. Zhou, T., Llizo, A., Wang, C., Xu, G. & Yang, Y. Nanostructure-induced DNA condensation. *Nanoscale* **5**, 8288–8306 (2013).
 14. Rodik, R. V., Klymchenko, A. S., Mely, Y. & Kalchenko, V. I. Calixarenes and related macrocycles as gene delivery vehicles. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **80**, 189–200 (2014).
 15. Rosa, M., Dias, R., da Graça Miguel, M. & Lindman, B. DNA–Cationic Surfactant Interactions Are Different for Double- and Single-Stranded DNA. *Biomacromolecules* **6**, 2164–2171 (2005).
 16. Rahban, M., Divsalar, A., Saboury, A. A. & Golestani, A. Nanotoxicity and spectroscopy studies of silver nanoparticle: Calf thymus DNA and K562 as targets. *J. Phys. Chem. C* **114**, 5798–5803 (2010).
 17. Bresloff, J. L. & Crothers, D. M. DNA-ethidium reaction kinetics: Demonstration of direct ligand transfer between DNA binding sites. *J. Mol. Biol.* **95**, 103–123 (1975).
 18. Dasgupta, A. *et al.* Effect of headgroup on DNA-cationic surfactant interactions. *J. Phys. Chem. B* **111**, 8502–8508 (2007).
 19. Supian, F. L. *et al.* Interaction between Langmuir and Langmuir–Blodgett Films of Two Calix[4]arenes with Aqueous Copper and Lithium Ions. *Langmuir* **26**, 10906–10912 (2010).
 20. Menger, F. M. & Portnoy, C. E. Chemistry of reactions proceeding inside molecular aggregates. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 4698–4703 (1967).

21. Berova, N., Nakanishi, K. & Woody, R. *Circular Dichroism. Principles and Applications (2nd Edition)*. (John Wiley & Sons, New York, 2000).
22. Garbett, N. C., Ragazzon, P. A. & Chaires, J. O. B. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-dna interactions. *Nat. Protoc.* **2**, 3166–3172 (2007).
23. Lincoln, P., Broo, A. & Nordén, B. Diastereomeric DNA-Binding Geometries of Intercalated Ruthenium(II) Trischelates Probed by Linear Dichroism: [Ru(phen)₂DPPZ]²⁺ and [Ru(phen)₂BDPPZ]²⁺. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2644–2653 (1996).
24. Gatashah, M. K., Kannan, S., Hemalatha, K. & Imrana, N. Proflavine an acridine DNA intercalating agent and strong antimicrobial possessing potential properties of carcinogen. *Karbala Int. J. Mod. Sci.* **3**, 272–278 (2017).
25. Chaires, J. B. A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Arch. Biochem. Biophys.* **453**, 26–31 (2006).
26. Passero, F., Gabbay, E. J., Gaffney, B. & Kurucsev, T. Topography of Nucleic Acid Helices in Solutions. Stoichiometry and Specificity of the Interaction of Reporter Molecules with Nucleic Acid Helices. *Macromolecules* **3**, 158–162 (1970).
27. Hong, S. J. & Piette, L. H. Electron spin resonance spin label studies of intercalation of nitrobenzene in DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **185**, 307–315 (1978).
28. Nishimura, T. *et al.* DNA binding of tilorone: ¹H NMR and calorimetric studies of the intercalation. *Biochemistry* **46**, 8156–8163 (2007).
29. Hranjec, M. *et al.* Novel imidazo[4,5-b]pyridine and triaza-benzo[c]fluorene derivatives: Synthesis, antiproliferative activity and DNA binding studies. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 2748–2758 (2011).
30. Richard, H., Schreiber, J. P. & Daune, M. Interactions of metallic ions with DNA. V. DNA Renaturation Mechanism in the Presence of Cu²⁺.

- Biopolymers* **12**, 1–10 (1973).
31. Eichhorn, G. L. & Shin, Y. A. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 7323–7328 (1968).
32. Supian, F. L. *et al.* A surface potential study of ion-uptake by 5,11,17,23-tetra-tert-butyl-25,27-diethoxycarbonyl methyleneoxy-26,28-dihydroxycalix[4]arene and 5,17-(3-nitrobenzylideneamino)-11,23-di-tert-butyl-25,27-diethoxycarbonyl methyleneoxy-26,28-dihydroxycalix[4]aren. *Sains Malaysiana* **39**, 423–433 (2010).
33. Fang, Y. & Hoh, J. H. Early intermediates in spermidine-induced DNA condensation on the surface of mica. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 8903–8909 (1998).
34. Rau, D. C. & Parsegian, V. A. Direct measurement of the intermolecular forces between counterion-condensed DNA double helices. *Biophys. J.* **61**, 246–259 (1992).
35. Grueso, E., Cerrillos, C., Hidalgo, J. & Lopez-Cornejo, P. Compaction and decompaction of DNA induced by the cationic surfactant CTAB. *Langmuir* **28**, 10968–10979 (2012).
36. García, J. P., Marrón, E., Martín, V. I., Moyá, M. L. & Lopez-Cornejo, P. Conformational changes of DNA in the presence of 12-s-12 gemini surfactants (s=2 and 10). Role of the spacer's length in the interaction surfactant-polynucleotide. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **118**, 90–100 (2014).

CAPÍTULO 4.
P-SULFONATOCALIX[6]ARENO.
INTERACCIÓN CON ADN Y USO
COMO NANOTRANSPORTADOR DE
DOXORRUBICINA

El cáncer interviene en un grupo numeroso de enfermedades basadas en la división celular descontrolada de células anormales y que puede afectar a todos los tipos de células en el cuerpo. En 2018 se diagnosticaron alrededor de 18.1 millones de nuevos casos en el mundo y se produjeron 9.6 millones de muertes por cáncer, según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC).¹ Los tratamientos más comunes empleados en el tratamiento del cáncer incluyen: cirugía, radiación, quimioterapia e inmunoterapia, esta última sola o en combinación con otras terapias. Entre los diversos tratamientos para el cáncer, la quimioterapia sigue siendo la primera opción para muchos pacientes con cáncer en etapas medias o avanzadas.

La doxorubicina, DOX, también conocida como adriamicina, es un antibiótico que se obtiene a partir del aislamiento de cepas del género *Streptomyces* y pertenece a la familia de las antraciclinas. Descubierta a principios de los años 60, es uno de los fármacos anticancerígenos más

eficaces, utilizados solo o en combinación con otros fármacos para el tratamiento quimioterapéutico de tumores sólidos como el cáncer de mama, de ovario o de pulmón. También se utiliza en el tratamiento de distintas leucemias y linfomas.²⁻⁵ La DOX es una molécula anfifílica que posee un aglicón insoluble en agua formado por un quinoide tetracíclico (14-hidroxi-daunomicina) y un aminoazúcar soluble en agua (daunosamina), como puede verse en el *Esquema 2.3* del capítulo 2. Su mecanismo de acción es bastante complejo y no se encuentra bien definido. Sin embargo, es bien conocido que la doxorubicina se intercala entre los pares de bases del ADN, resultando en la inhibición de la síntesis de este. La intercalación de la DOX en el polinucleótido causa la rotura de las cadenas simples y dobles. Este paso se cree que está mediado por la inhibición de la topoisomerasa II, debido a la formación de complejos covalentes topoisomerasa/ADN, resultando en la inhibición de su función fundamental de corte y ligadura durante la replicación del polinucleótido. Además, la intercalación de este fármaco en el ADN provoca cambios en la estructura de las cromatinas, dando lugar a una agregación de las mismas, lo que origina un proceso de apoptosis en las células.^{6,7}

El empleo prolongado de un fármaco causa la aparición de resistencia al mismo (MDR), limitando sus potenciales aplicaciones. El estudio continuo de los mecanismos de resistencia y la exploración de biomarcadores apoptóticos y/o autofágicos, ayudan a superar la resistencia y así obtener una mejor formulación y eficacia del fármaco. Además, en el caso de la doxorubicina, su efecto clínico es limitado debido a los efectos secundarios que provoca, entre los que destaca su marcada cardiotoxicidad, que puede originar un fallo cardíaco e incluso la muerte.⁸ Otros efectos secundarios de la DOX son la toxicidad que produce en diferentes órganos como el cerebro, el hígado y el riñón. Además, también puede producir lesiones cutáneas.⁹ Por todo lo anterior, es de gran interés el desarrollo de nuevas formulaciones que disminuyan sus efectos secundarios, sin reducir su efectividad.

Con este propósito, en la última década se han empleado multitud de nanoestructuras que pueden actuar como portadores de fármacos. Los liposomas han centrado gran parte de la atención de los investigadores en biomedicina, especialmente como sistemas de liberación controlada de fármacos con propiedades antitumorales.¹⁰ Se caracterizan por mostrar una serie de ventajas sobre los sistemas convencionales que son, entre otras, la administración mejorada del medicamento, la protección del principio activo contra factores ambientales, un mejor rendimiento del producto final, la prevención de la degradación temprana del medicamento encapsulado, la producción de formulaciones más rentables y el desarrollo de un tratamiento eficiente con toxicidad reducida. Doxil® fue la primera formulación liposomal pegilada aprobada por la FDA para el tratamiento del sarcoma de Kaposi, relacionado con el VIH y el cáncer de ovarios recurrente. Esta formulación muestra un mayor tiempo de circulación en el torrente sanguíneo, aumentando la persistencia tumoral y mejorando el tiempo de vida media de la doxorubicina libre. Sin embargo, sigue originando efectos secundarios en los pacientes. Myocet® es una formulación liposomal no pegilada que ha sido aprobada en Europa y Canadá para el tratamiento del cáncer de mama en combinación con ciclofosfamida. Sin embargo, esta formulación sigue causando cardiotoxicidad. En 2008, Nudoxa® fue lanzado al mercado en India y está siendo usado como fármaco para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Se ha encontrado que Nudoxa®, a una concentración de 70 mg/m², presenta la misma eficacia que las formulaciones liposomiales convencionales, pero con menores efectos secundarios. Hace unos años, S. Rivankar publicó una revisión exhaustiva acerca de las ventajas e inconvenientes de estas formulaciones liposomiales para el transporte de doxorubicina aplicadas en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.¹¹

X. Guo y colaboradores¹² prepararon nanopartículas basadas en dendrímeros de cuarta generación de polidoamina (PAMAM) modificados con ácido hialurónico (HA) para el transporte de fármacos. A estas

nanopartículas se pueden anclar covalentemente medicamentos anticancerígenos como la doxorubicina y el cisplatino, para formar el sistema de liberación controlada denominado HA@PAMAM-Pt-DOX. Los resultados mostraron que el sistema HA@PAMAM-Pt-DOX puede erradicar eficazmente células mamarias cancerosas, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que demuestra un efecto sinérgico favorable.

Además de estos sistemas, han sido empleados otro tipo de nanotransportadores para el transporte y liberación de la doxorubicina. R. Yang y colaboradores¹³ sintetizaron nanopartículas de seroalbúmina bovina que contenían magnetita (Fe_3O_4) y ácido fólico. La doxorubicina se situaba en el interior del núcleo. Los resultados demostraron que la presencia del ácido fólico, esencial en el mecanismo celular, permite alcanzar y penetrar en las células tumorales, sobreexpresando los receptores de folato en la superficie, y luego liberar el agente terapéutico encapsulado de una manera más controlada y sostenida. Este mismo comportamiento ha sido observado en multitud de sistemas funcionalizados con ácido fólico con el mismo objetivo.^{14–16} Nanopartículas de oro,^{17,18} micelas,^{19–21} ciclodextrinas^{22,23} y nanotubos de carbono^{24,25} han sido también utilizados como nanotransportadores de la DOX.

Como alternativa a estas nanoestructuras destacan los calixarenos, que pueden utilizarse como plataformas de transporte de fármacos. La encapsulación y liberación de la DOX en agregados basados en estructuras supramoleculares de calixareno para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer han sido estudiados recientemente por diferentes investigadores.^{30,31} Los resultados obtenidos en diferentes líneas de cáncer muestran que se consigue un mayor efecto terapéutico del fármaco y una disminución de los efectos secundarios.

Como se señaló anteriormente, el diseño de nanotransportadores que sean capaces de liberar de una forma eficaz el medicamento, manteniendo o

potenciando su efecto terapéutico y disminuyendo sus efectos secundarios es crucial. Teniendo en cuenta esto, los calixarenos poseen características estructurales que les permiten variar la conformación y formar complejos de inclusión con otras moléculas. Dada la presencia de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas en la misma molécula, así como también la baja citotoxicidad e inocuidad, los calixarenos presentan potencial en el desarrollo de nuevos nanotransportadores de medicamentos.

En este capítulo se ha realizado un estudio exhaustivo sobre la interacción de la DOX con las moléculas de p-sulfonatocalix[6]areno (ver los *Esquemas 2.3 y 2.5* en el capítulo 2). Se eligió un calixareno con carga negativa para favorecer las interacciones electrostáticas entre las moléculas de doxorubicina y el mismo ya que, a pH fisiológico, las moléculas de DOX se encuentran cargadas positivamente. También, se estudió la interacción entre la DOX y el ADN de timo de ternera, así como los efectos que la adición del calixareno ejerce sobre la unión de la DOX con el ADN. Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular para conocer el efecto terapéutico del complejo DOX/calixareno en diferentes líneas celulares sanas y cancerígenas.

Los resultados obtenidos contribuirán al entendimiento de las interacciones fármaco/nanotransportador, así como de la actividad terapéutica del conjunto, que es fundamental para el desarrollo de nuevos y más eficientes nanotransportadores.

4.1. Parte experimental

Todas las medidas experimentales fueron realizadas a una temperatura fija de 303.1 ± 0.1 K y a pH fijo, mediante el uso de una disolución tampón ([HEPES]= 40 mM, pH= 7.4).

4.1.1. Espectrofotometría de absorción UV-vis

Los espectros de absorbancia fueron adquiridos en un rango de longitudes de onda desde 200 a 700 nm.

4.1.2. Espectrofluorometría

Las titulaciones de fluorescencia fueron realizadas a una concentración fija de DOX de 7.80×10^{-5} mol dm^{-3} y diferentes concentraciones de ADN y/o calixareno: [ADN]= $0-1.00 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} y [calixareno]= $0-5.50 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} . Estas experiencias fueron realizadas con una potencia de lámpara de 400 V y anchuras de 2.5 y 5.0 nm para las rendijas de excitación y emisión, respectivamente. La longitud de onda de excitación y de emisión fueron 490 nm y 550 nm, que corresponden a los máximos de absorción y emisión de la DOX.

4.1.3. Viscosimetría

El viscosímetro fue calibrado con una disolución tampón de HEPES 40 mM a pH= 7.40. El comportamiento en la viscosidad de las disoluciones de DOX/ADN, calix/ADN y DOX/calix/ADN fue caracterizado mediante la ec.

2.5. del capítulo 2, donde η es la viscosidad de la suspensión y η_0 es la viscosidad de la disolución tampón de HEPES 40 mM a pH= 7.4.

Las medidas de viscosidad fueron realizadas a concentración fija de ADN y calixareno ($[\text{ADN}] = 1.00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ y $[\text{calixareno}] = 5.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). La concentración de DOX fue variada para obtener diferentes relaciones molares ($X = [\text{DOX}]/[\text{ADN}]$).

4.1.4. Dicroísmo circular (DC)

Los espectros fueron registrados desde 220 a 450 nm. Estas experiencias fueron realizadas a una concentración fija de ADN y de calixareno, en presencia de diferentes cantidades de doxorrubicina, para obtener la relación molar X deseada. La concentración de ADN y calixareno utilizada fue de $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ y $5.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, respectivamente. Todas las medidas fueron expresadas en términos de elipticidad molar según la ec. 2.1. del capítulo 2.

4.1.5. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Las muestras fueron preparadas disolviendo la correspondiente cantidad de DOX y/o calixareno en D₂O, seguido de una breve sonicación. Los espectros de ¹H RMN fueron realizados de acuerdo con lo detallado en la sección 2.2.8 del capítulo 2.

4.1.6. Medidas electroquímicas

Estas experiencias fueron llevadas a cabo como se ha descrito en la sección 2.2.9 del capítulo 2. Se realizaron a una concentración fija de DOX de $4.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ y diferentes concentraciones de calixareno que iban desde 0 hasta $8.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

4.1.7. Ensayos *in vitro* de citotoxicidad (Ensayo MTT)

La evaluación de la citotoxicidad de la DOX, el calixareno y el complejo DOX/calixareno fue realizada a diferentes períodos de tiempo, 24, 48, 72 y 96 h, en las diferentes líneas celulares (H358, A549, MCF7, LS180, HepG2 y RPE-1) mediante el protocolo especificado en la sección 2.2.13. del capítulo 2.

4.2. Resultados y discusión

Dada la complejidad del sistema estudiado, un ligando (huésped) y dos receptores (hospedadores), las interacciones entre las diferentes especies se considerarán por separado. En lo que sigue se utilizará la abreviatura calix en vez de calixareno.

Interacción DOX-calix

DOX es un antibiótico perteneciente a la familia de las antraciclinas que presenta un máximo de absorción a 490 nm y de emisión a 554 nm. Se ha comprobado que los espectros no sufren modificación alguna durante un período de tiempo superior a 2 h, bajo nuestras condiciones de trabajo. Esto indica que la DOX es estable en una disolución tampón de HEPES 40 mM a pH= 7.4 el tiempo necesario para realizar las distintas medidas experimentales.

Se observó que los espectros de absorción y emisión de la DOX cambian cuando se añade calixareno al medio. La absorbancia del fármaco aumenta con la concentración de macrociclo, mientras que la intensidad de emisión disminuye considerablemente en presencia de este receptor. Además, aparece una nueva banda centrada alrededor de 610 nm en el espectro de absorción a altas concentraciones de calix (*Figura 4.1*). Estos resultados indican la existencia de una interacción entre las moléculas de calix y de DOX, con la formación de un nuevo complejo DOX/calix (complejo de inclusión) en el cual, dado sus estructuras, se espera que el medicamento se ubique en la cavidad interna del receptor que presenta cierto carácter hidrofóbico.

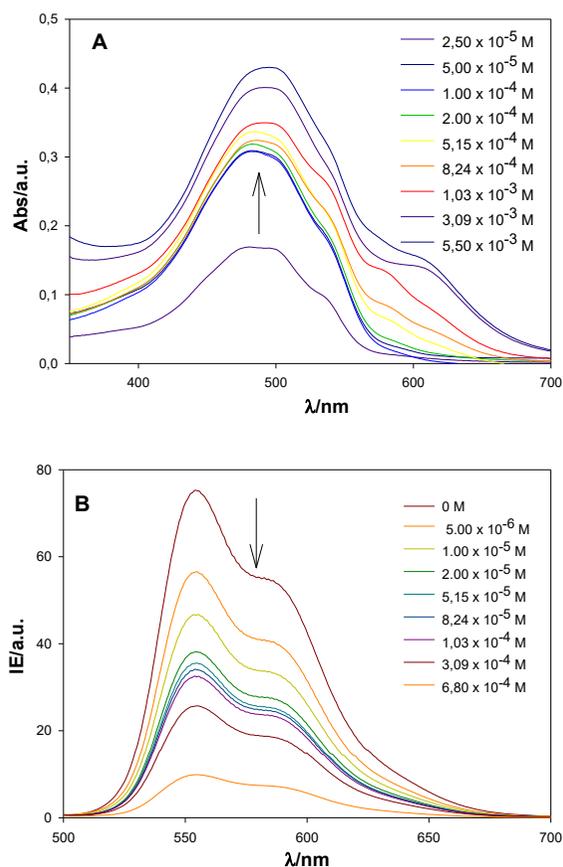


Figura 4.1. Espectro de absorbancia (A) y emisión (B) de DOX a diferentes concentraciones de calixareno.

Con el propósito de obtener más información acerca de este complejo de inclusión, se llevaron a cabo medidas de ^1H RMN. La Figura 4.2A muestra los espectros ^1H RMN de disoluciones de calix, DOX y DOX/calix (1: 1) en D_2O a 298.15 K. Estos espectros muestran que las interacciones entre las moléculas de calix y de DOX conducen a un ensanchamiento considerable de las señales.

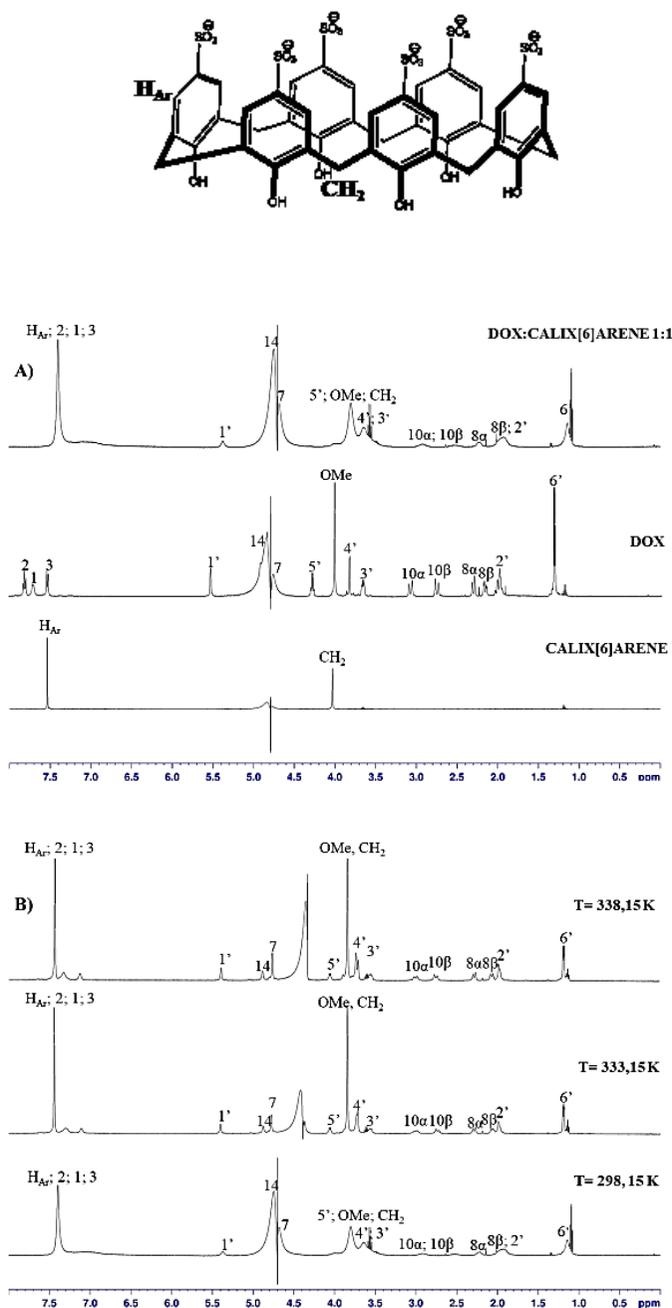


Figura 4.2. (A) Espectros de ¹H RMN en D₂O de disoluciones de DOX, calix y el complejo DOX/calix (1: 1) a 298.1±0.1 K. (B) Espectros de ¹H RMN en D₂O de la disolución del complejo DOX/calix (1:1) a diferentes temperaturas.

Además, se observa una disminución sustancial en los desplazamientos químicos de la mayoría de los protones, ya sea del macrociclo o del antibiótico. En concreto, los mayores desplazamientos químicos se corresponden con las señales de los protones aromáticos H1, H2 y H3 de la DOX (véase la *Figura 4.2A* para la numeración de los átomos de carbono). Estas variaciones en el espectro de ^1H RMN se pueden deber a un proceso de apantallamiento dada la proximidad de los anillos aromáticos del calix cuando la molécula de antibiótico se mueve hacia la cavidad del macrociclo. Las interacciones favorables π - π entre los anillos aromáticos del calix y las moléculas de DOX explicarían los mayores desplazamientos químicos encontrados para los protones aromáticos de la DOX, mientras que los protones como los del sustituyente del azúcar se ven menos afectados. El ensanchamiento de las señales en medidas de espectroscopía bidimensional rotatoria de efecto nuclear Overhauser (ROESY) impidió obtener información adicional sobre el complejo de inclusión DOX/calix. El ensanchamiento observado parece indicar que existe un equilibrio entre las diferentes conformaciones del complejo de inclusión. Con el objetivo de investigar esta posibilidad, se llevaron a cabo espectros de ^1H RMN a temperaturas más altas, 333.15 y 338.15 K (se comprobó la estabilidad de las disoluciones deuteradas preparadas durante el tiempo de medida). Como se puede ver en la *Figura 4.2B*, se produce un afinamiento en las señales cuando aumenta la temperatura. Con el fin de confirmar la presencia de procesos de intercambio químico, espectros de ^1H RMN se registraron a diferentes campos magnéticos. Los resultados muestran un ensanchamiento cuando aumenta la intensidad del campo magnético aplicado, de acuerdo con procesos dinámicos como son los intercambios químicos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que se produce un proceso de equilibrio en nuestras condiciones de trabajo. Las moléculas de calix pueden adoptar diferentes conformaciones debido a su alta flexibilidad estructural, con grupos -OH en el borde inferior y grupos $-\text{SO}_3^-$ cargados negativamente en el borde superior del macrociclo. Teniendo esto en cuenta, las moléculas de DOX pueden entrar en la cavidad del calixareno a través de

cualquier borde. Una vez dentro, el grupo -NH_3^+ cargado positivamente de las moléculas de DOX puede interactuar electrostáticamente con los grupos -SO_3^- cargados negativamente del calix. Además, se pueden producir interacciones π - π entre los anillos aromáticos del antibiótico y los del calixareno. La contribución de una u otra interacción dependerá de la posición de las moléculas de DOX dentro de la cavidad de este receptor. La existencia de varias conformaciones posibles para los complejos de inclusión de DOX/calix podría explicar el ensanchamiento observado anteriormente.

El proceso de formación del complejo de inclusión puede ser descrito como se muestra a continuación:



donde DOX y calix representan las especies libres en disolución. Con el objetivo de obtener información sobre la estequiometría del complejo de inclusión formado, se empleó el método de Job.³²

Se prepararon una serie de disoluciones con diferentes fracciones molares de DOX y calix, manteniendo siempre constante la concentración total de DOX + calix. La absorbancia y las intensidades de emisión de estas disoluciones se midieron a 490 nm y 554 nm, respectivamente, que se corresponden con las longitudes de onda del máximo de absorbancia y de intensidad de emisión del complejo en nuestras condiciones de trabajo. Los valores de $[\text{DOX}] \times \Delta \text{Abs}$ (o ΔIE), donde ΔAbs (o ΔIE) son los incrementos observados en la absorbancia (o en la intensidad de emisión), cuando la fracción molar de calixareno aumenta de 0 a 1, se representaron frente a la fracción molar del fármaco (*Figura 4.3*). El máximo de los gráficos proporciona información sobre la estequiometría del complejo de inclusión formado. Los resultados indican la formación de complejos de inclusión de tipo 1:1 (DOX:calix) para $[\text{DOX}] < 1.00 \times 10^{-4} \text{ M}$. Para $[\text{DOX}] > 1.00 \times 10^{-4} \text{ M}$, el número promedio de moléculas de DOX por complejo de inclusión es mayor que 1, lo que indica que se forman algunos complejos de tipo 2:1. Una

posible explicación para este hallazgo es la formación de dímeros a una alta concentración de fármaco, como fue observado por M. Airoidi y colaboradores.²⁶ Estos dímeros son el resultado de un proceso de apilamiento, donde las interacciones π - π juegan un papel fundamental entre los anillos aromáticos planos de la DOX. Los dímeros podrían entrar en la cavidad del calix o el apilamiento podría ocurrir entre las moléculas de DOX parcialmente insertadas dentro de la cavidad del macrociclo. No obstante, teniendo en cuenta que el objetivo de este capítulo es utilizar un nanotransportador bien caracterizado para transportar la DOX, los experimentos restantes se realizaron a una concentración de DOX inferior a 1.00×10^{-4} M. El estudio de la interacción de los dímeros con este receptor se realizará en una futura investigación.

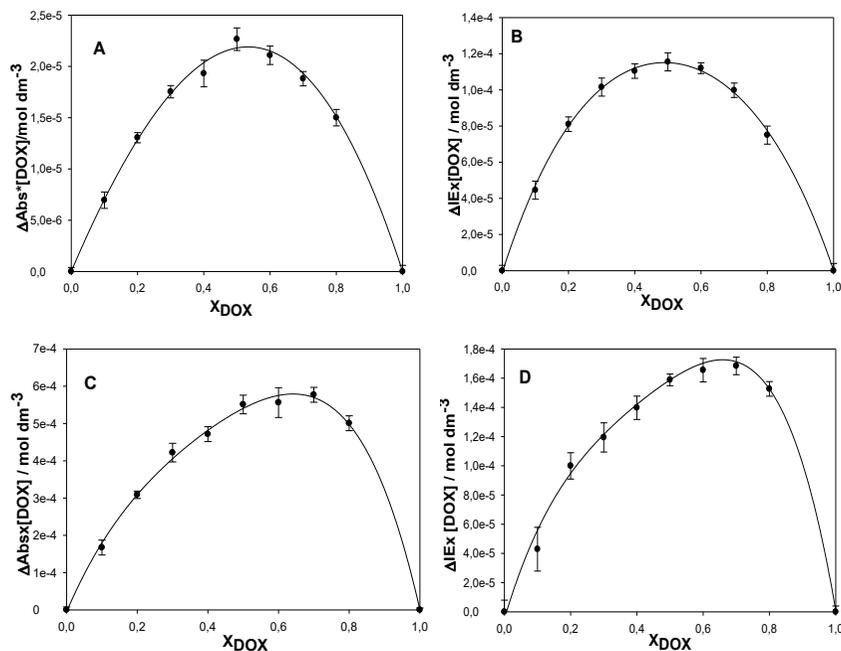


Figura 4.3. Gráficos de Job construidos a partir de datos de absorbancia e intensidad de emisión a concentraciones de DOX inferiores (A-B) y superiores (C-D) a 1.00×10^{-4} M. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de X (n = 5).

La constante de equilibrio K_{calix} correspondiente a la formación del complejo DOX/calix (véase ec. 4.1) se puede obtener a partir de las variaciones en la absorbancia e intensidades de emisión a diferentes concentraciones de calix, utilizando el conocido Modelo de Pseudofase propuesto por F. Menger y C. Portnoy.²⁷ Por tanto, considerando la distribución del fármaco entre el *bulk* acuoso y la cavidad interna del calix, se puede escribir la siguiente ecuación:

$$\frac{P}{P_0} = \frac{\left(\frac{P_w}{P_0}\right) + \left(\frac{P_{\text{calix}}}{P_0}\right)K_{\text{calix}}[\text{calix}]}{1 + K_{\text{calix}}[\text{calix}]} \quad (4.2)$$

donde $\frac{P}{P_0}$ es la propiedad relativa medida, la absorción (Abs) o la intensidad de emisión (IE), a diferentes concentraciones de calix (P_0 es la absorción o la intensidad de emisión de las moléculas de DOX en ausencia de calix); P_w y P_{calix} son la absorción e intensidad de emisión del fármaco ubicado en la disolución acuosa (HEPES) y en el calix, respectivamente; $[\text{calix}]$ es la concentración total de calix añadida a la disolución; K_{calix} es la constante de equilibrio que se muestra en la ec. 4.1 expresada como:

$$K_{\text{calix}} = \frac{[\text{DOX/calix}]}{[\text{DOX}_w][\text{calix}_w]} \quad (4.3)$$

siendo $[\text{DOX}_w]$ y $[\text{calix}_w]$ las concentraciones libres de DOX y calix, respectivamente, en la disolución.

Los datos de absorción y emisión se ajustaron bien mediante el uso de la ec. 4.2, como se puede ver en la *Figura 4.4*. El valor promedio de K_{calix} obtenido a partir de estos ajustes es $(1.1 \pm 0.6) \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, lo que demuestra una fuerte interacción entre la DOX y el calix.

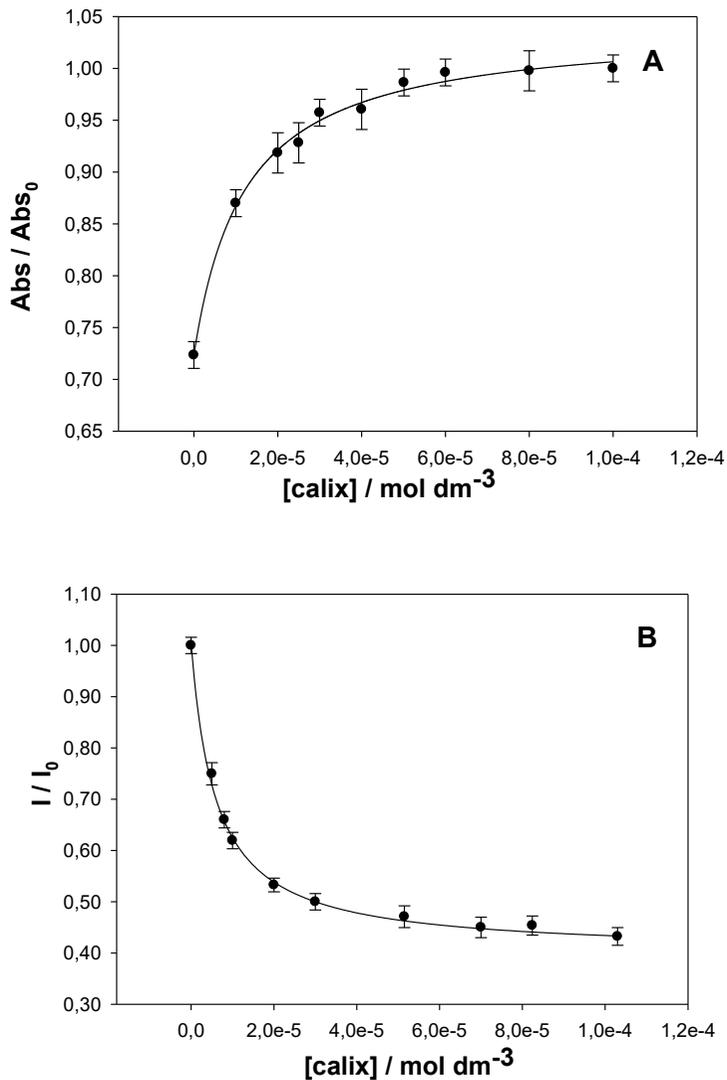


Figura 4.4. Gráficos relativos de absorbancia (A) e intensidades de emisión (B) de la DOX frente a la concentración total de calix a 490 nm y 550 nm, respectivamente. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Las líneas muestran los mejores ajustes obtenidos utilizando la ec. 4.2. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de X (n = 5).

K_{calix} también fue obtenida a partir de medidas de dicroísmo circular. Como se puede ver en la *Figura 4.5*, DOX es un antibiótico que presenta un espectro de dicroísmo circular. Este espectro se modifica en presencia de calixareno debido al proceso de inclusión del antibiótico en el receptor. La constante de unión de este proceso se calculó a partir de las variaciones que sufre la banda negativa a 290 nm de la DOX en presencia del calix. Los valores de elipticidad observados (θ_{obs}) se ajustaron de acuerdo con el modelo de pseudofase:

$$\Theta_{\text{obs}} = \frac{\Theta_{\text{DOX}} + \Theta_{\text{DOX/calix}} K_{\text{calix}} [\text{calix}]}{1 + K_{\text{calix}} [\text{calix}]} \quad (4.4)$$

donde Θ_{DOX} e $\Theta_{\text{DOX/calix}}$ representan la elipticidad del fármaco en la disolución acuosa (HEPES) y en el calix, respectivamente; $[\text{calix}]$ es la concentración total de calix añadida a la disolución; K_{calix} es la constante de equilibrio correspondiente a la formación del complejo DOX/calix.

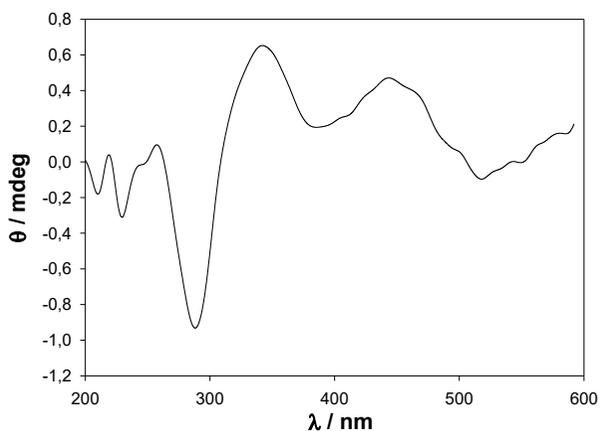


Figura 4.5. Espectro de dicroísmo circular del antibiótico DOX ($[\text{DOX}] = 8.00 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$).

El valor de la constante de unión obtenido fue $(8.3 \pm 0.3) \times 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ (ver *Figura 4.6*), que está de acuerdo con los valores de la constante de equilibrio obtenidos a partir de las medidas de absorbancia e intensidad de emisión.

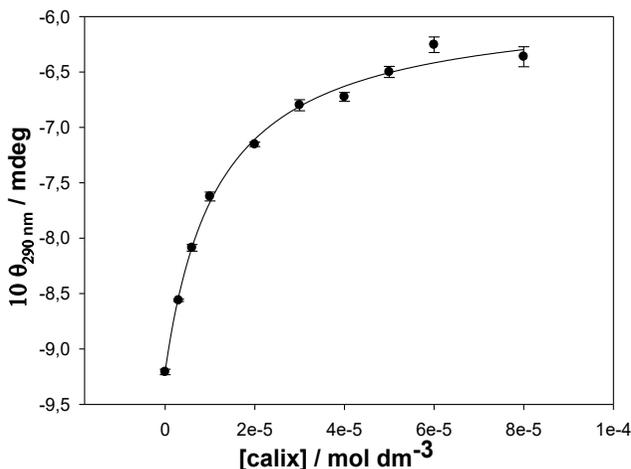


Figura 4.6. Valor de la elipticidad de la DOX ($\lambda = 290 \text{ nm}$) a diferentes concentraciones de calix. La línea representa el mejor ajuste usando la ec. 4.4. ($[\text{DOX}] = 8.00 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$). Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor de concentración de calixareno ($n = 5$).

Además, esta constante de equilibrio también se determinó a partir de medidas electroquímicas. La inclusión de cualquier ligando en un receptor puede producir cambios en las propiedades electroquímicas del ligando.^{28,29} Esta idea se ha utilizado para obtener la constante de unión de la DOX con el calixareno. Los datos de voltametría cíclica se obtuvieron a diferentes concentraciones de receptor. Los resultados mostraron una disminución de los valores de intensidad de corriente en los picos voltamétricos en presencia del receptor. Esto se debe a una disminución del coeficiente de difusión del complejo DOX/calix en comparación con el de las moléculas de DOX libres. K_{calix} se obtuvo mediante el uso de la ecuación de T. Osa³⁰ (véase la ecuación 4.5), a partir de las variaciones en la corriente del pico de reducción del grupo quinona de la DOX y su valor promedio fue $(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$.

$$I_{\text{obs}}^2 = \frac{(I_{\text{DOX}}^2 - I_{\text{obs}}^2)}{K_{\text{calix}}[\text{calix}]} + I_{\text{DOX/calix}}^2 \quad (4.5)$$

I_{obs} representa el pico de Red₂ en la *Figura 4.7* para diferentes concentraciones de calixareno.

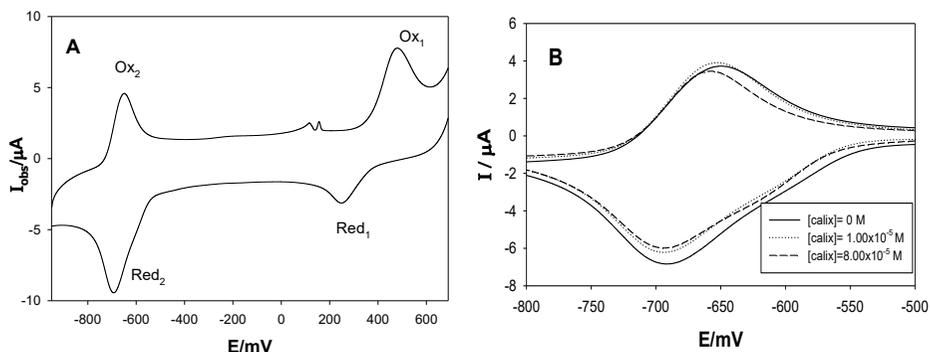


Figura 4.7. (A) Voltamograma cíclico de DOX (4.00×10^{-5} M) en HEPES 40 Mm (Velocidad de escaneo 0.1V/s), (B) Variaciones observadas en la corriente del pico de reducción del grupo quinona de DOX (Red₂) para diferentes concentraciones de calix.

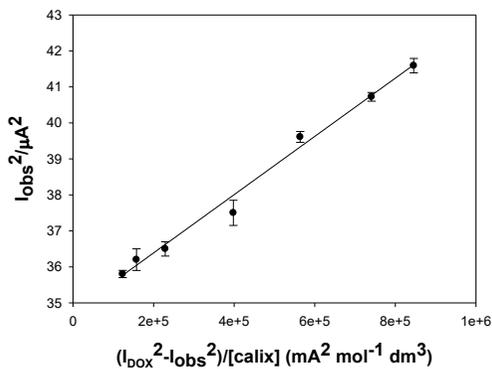


Figura 4.8. Representación del ajuste a la ec. de T. Osa. Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor de X (n= 5).

La *Figura 4.8* muestra la buena tendencia lineal obtenida cuando se representa I_{obs}^2 frente a $(I_{\text{DOX}}^2 - I_{\text{obs}}^2)/[\text{calix}]$. I_{DOX} es la corriente del pico de reducción (Red_2) de la molécula de DOX libre y $[\text{calix}]$ es la concentración de calixareno.

Interacción DOX-ADN

Diferentes grupos han investigado sobre la interacción entre la DOX y el ADN. Recientemente, C. Pérez-Arnaiz y colaboradores³¹ han estudiado el mecanismo de interacción DOX-ADN. Según sus resultados, se forman dos tipos de complejo diferentes, dependiendo de la relación molar $[\text{DOX}]/[\text{ADN}]$ presente en la disolución. Los autores han asumido que la formación del complejo DOX/ADN tiene lugar en dos pasos: un primer paso (rápido) mediante interacciones en el surco (de tipo *groove*) que forma el ADN en la conformación tipo hélice, en la región donde se encuentran los pares de bases adenina-timina (A-T); y un segundo paso (lento) de intercalación entre los pares de bases de guanina-citosina (G-C). Sin embargo, estas conclusiones se contradicen con los resultados de M. Airoidi y colaboradores,²⁶ que no encontraron ninguna afinidad de la DOX por las regiones que contienen los pares de bases A-T y G-C. Con el objetivo de profundizar en el estudio de las interacciones DOX-ADN en las condiciones empleadas en este trabajo, se llevaron a cabo medidas de dicroísmo circular.

El ADN en forma B muestra un espectro típico en el rango de longitud de onda de 200-320 nm, con una banda negativa a 248 nm, debido a la supraestructura helicoidal del polinucleótido, y una banda positiva a 280 nm, debido al apilamiento de las bases nitrogenadas. La adición de la DOX a una disolución de ADN causó cambios en el espectro de DC del polinucleótido. Los resultados muestran que inicialmente la adición de DOX provoca un aumento de la banda positiva a 280 nm, hasta una determinada concentración de DOX (una relación molar de $X = [\text{DOX}]/[\text{ADN}] \approx 0.25$). Sin embargo,

adiciones posteriores de DOX condujeron a efectos hipocrómicos e hipsocrómicos de esta banda positiva (*Figura 4.99*). Por el contrario, la banda negativa del espectro siempre aumenta al aumentar la concentración de DOX (véase la *Figura 4.99B-C*).

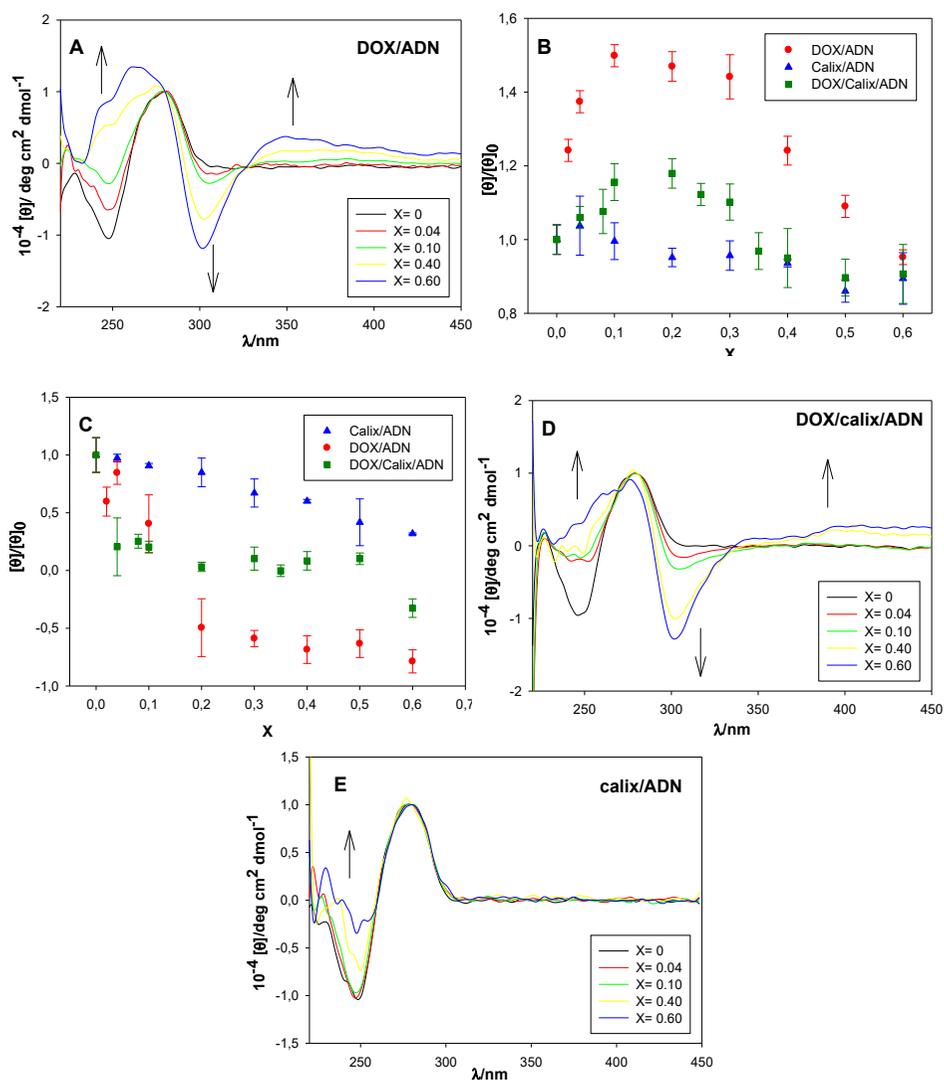


Figura 4.9. Espectros de dicroísmo circular de DOX/ADN (A), DOX/calix/ADN (D) y calix/ADN (E). Datos de elipticidad molar relativa obtenidos a $\lambda=280$ nm (B) y $\lambda=248$ nm (C) para diferentes valores de X ($X=[\text{DOX}]/[\text{ADN}]$ en los gráficos A–D y $X=[\text{calix}]/[\text{ADN}]$ en el gráfico E). Las

barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de X (n=10).

También se observó una banda centrada a 300 nm en el espectro de dicroísmo y una banda ancha en la región del visible, debidas ambas a la formación del complejo DOX/ADN (todos los espectros de DC se realizaron utilizando una disolución tampón de HEPES 40 mM que contiene la concentración de DOX requerida para cada valor de X, como disolución de referencia). El punto isobéptico registrado a 330 nm confirma la formación de un complejo DOX/ADN, lo que está de acuerdo con los resultados anteriores.^{26,31}

Las medidas de viscosidad también pueden proporcionar información sobre la formación de los complejos DOX/ADN. La *Figura 4.10* muestra un aumento en el valor de viscosidad relativa cuando aumenta [DOX], hasta una relación molar de aproximadamente 0.25. A partir de ese valor de X, la viscosidad relativa de la disolución disminuye. Se sabe que la intercalación de este fármaco entre los pares de bases del ADN conduce a un aumento de la longitud del polinucleótido y, por lo tanto, un aumento en la viscosidad de la disolución.³¹ Los resultados mostrados en la *Figura 4.10* pueden explicarse considerando que, a valores bajos de X, las moléculas de DOX se intercalan entre los pares de bases del ADN, formando complejos DOX/ADN y aumentando la viscosidad. Cuando aumenta la concentración de DOX, las moléculas de este antibiótico forman dímeros, lo que puede provocar un desplazamiento parcial de las moléculas de DOX del ADN a la disolución. Por consiguiente, la longitud del polinucleótido disminuye y esto da como resultado una disminución en la viscosidad de la disolución. Esto también explica los efectos hipsocrómicos e hipocrómicos obtenidos en los espectros de DC.

La unión de la DOX al ADN también puede ser estudiada a partir de medidas de fluorescencia, utilizando el modelo de Scatchard.³² Este método

gráfico permite analizar el tipo de unión de un ligando con un receptor, como el ADN, que contiene diferentes sitios de unión. De esta manera, el número promedio de moléculas de DOX unidas por moléculas de ADN puede ser estimado a partir de los datos de fluorescencia, representando la relación de concentraciones de DOX enlazada y no enlazada frente a la concentración de fármaco ligado (n).

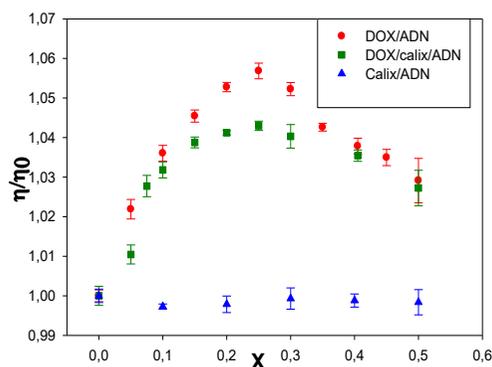


Figura 4.10. Viscosidad relativa de las disoluciones de DOX/ADN, calix/ADN y DOX/calix /ADN a diferentes valores de X. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de X ($n = 10$).

La Figura 4.11 muestra el gráfico de Scatchard obtenido. En este caso, no se observa una tendencia lineal. Por el contrario, se ha encontrado una curva cóncava descendente. Este comportamiento indica un carácter cooperativo positivo de la interacción de la DOX con el ADN, lo que está de acuerdo con el hecho de que diferentes modos de unión tienen lugar en la interacción DOX/ADN.³³

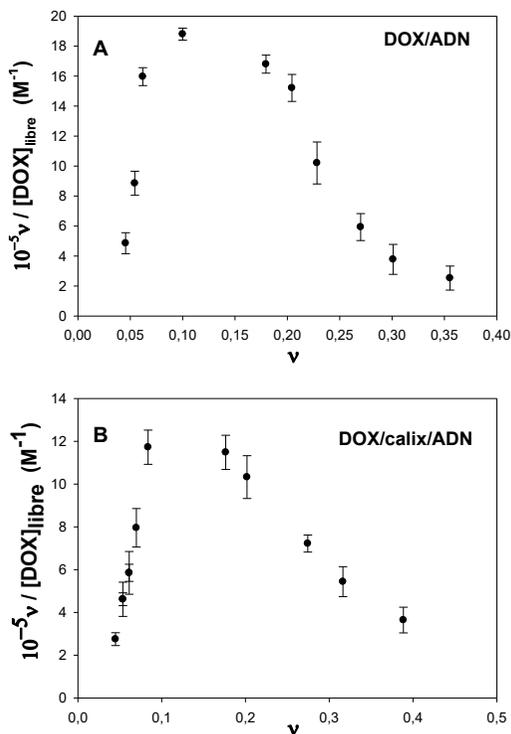


Figura 4.11. Gráfico de Scatchard de DOX/ADN (A) y DOX/calix/ADN (B). Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de X (n = 5). $[\text{DOX}] = 6.00 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{calix}] = 5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$.

La constante de unión promedio correspondiente a esta interacción puede estimarse, utilizando una modificación del modelo de pseudofase, considerando una dependencia sigmoideal de la constante de equilibrio con respecto a la concentración de ADN. Este procedimiento se ha utilizado anteriormente para otros procesos de unión.³⁴ Teniendo esto en cuenta, se puede escribir la siguiente ecuación, ec. 4.6, para la intensidad de emisión relativa de DOX:

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\left(\frac{I_w}{I_0}\right) + \left(\frac{I_{\text{ADN}}}{I_0}\right)K_{\text{ADN}}[\text{ADN}]}{1 + K_{\text{ADN}}[\text{ADN}]} \quad (4.6)$$

donde:

$$K_{ADN} = \frac{K_{max}^{ADN} e^t}{1 + e^t} \quad (4.7)$$

$$t = \frac{t - [ADN]}{j} \quad (4.8)$$

siendo K_{max}^{ADN} el valor máximo (límite) de K_{ADN} , h es el valor de $[ADN]$ para el cual $K_{ADN} = \frac{1}{2} K_{max}^{ADN}$ y j es un parámetro ajustable. I_w es la intensidad de emisión de las moléculas de DOX libres en la disolución acuosa (HEPES 40 mM) e I_{ADN} es la intensidad de emisión de las moléculas de DOX unidas al polinucleótido. I_0 es la intensidad de emisión de las moléculas de DOX en ausencia de ADN.

La *Figura 4.12* muestra que existe una buena concordancia entre los datos teóricos y los experimentales obtenidos, al utilizar las ecuaciones 4.6-4.8 para los ajustes. En este caso, se obtiene un valor de $K_{max}^{ADN} = (6.6 \pm 1.1) \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, que está de acuerdo con los valores de las constantes de unión obtenidas por otros autores.³¹

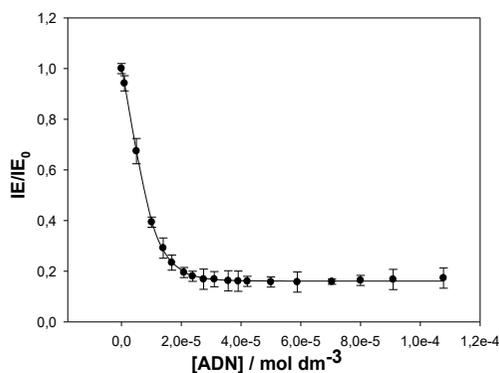


Figura 4.12. Titulación de DOX con ADN. Los puntos representan los datos experimentales. La línea muestra el mejor ajuste de acuerdo con las ecuaciones 4.4-4.6. $[DOX] = 5.00 \times 10^{-6} \text{ M}$. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada concentración de ADN ($n = 6$).

El hecho de que K_{\max}^{ADN} sea tres órdenes de magnitud superior a K_{calix} es un buen punto de partida para el objetivo principal de este capítulo, que es la idoneidad del calix como nanotransportador de la doxorubicina. Una vez alcance la diana, al ser mayor la afinidad de la DOX por el ácido nucleico que por el calix, y teniendo en cuenta que $K_{\max}^{\text{ADN}} \gg K_{\text{calix}}$, se puede esperar que las moléculas de DOX encapsuladas en el macrociclo abandonen la cavidad hidrófoba interaccionando preferentemente con el polinucleótido y, por lo tanto, cumpliendo su actividad terapéutica.

Interacción DOX-calix-ADN

Los espectros de dicroísmo circular del ADN en presencia del complejo DOX/calix se obtuvieron a diferentes relaciones molares de X ($X = [\text{DOX}]/[\text{ADN}]$, siendo $[\text{DOX}]$ la concentración total de fármaco añadido a la disolución). Las concentraciones de calix y ADN se mantuvieron constantes en todas las medidas y la concentración de DOX fue siempre inferior a 1.00×10^{-4} M para evitar la formación de dímeros. La *Figura 4.9D* muestra los espectros de DC obtenidos para diferentes valores de X. Comparando la *Figura 4.9A* y *Figura 4.9D*, se observa un cambio similar del espectro del ADN en presencia de la DOX y en presencia del complejo DOX/calix. Con las *Figura 4.9B-C* se pueden comparar las diferencias obtenidas en las bandas centradas a 280 nm y a 248 nm, respectivamente, en presencia y ausencia de calix. Aunque el comportamiento es similar, y la dependencia de la elipticidad con el parámetro X presenta el mismo comportamiento, los valores de elipticidad se reducen en presencia del calix. Esto parece indicar que algunas moléculas de DOX libres que no se encuentran intercaladas en el ADN, entran en la cavidad del receptor. La encapsulación de DOX libre en el interior del calix podría reducir los efectos secundarios negativos del antibiótico ya que disminuye el exceso de antibiótico libre en el organismo humano. La banda

negativa centrada a 248 nm también desaparece en presencia del calix, pero las variaciones no son tan acusadas como en ausencia del nanotransportador.

El efecto que ejerce el calix por sí mismo en el polinucleótido también se ha estudiado mediante medidas de DC. No se ha observado ninguna banda nueva, o banda inducida, debido a la presencia de este receptor. Sin embargo, su presencia modifica ligeramente el espectro del ADN. Como se observa en la *Figura 4.9E*, la banda positiva de ADN permanece prácticamente sin cambios, pero la banda negativa sufre una disminución en el valor de elipticidad. Por lo tanto, la estructura helicoidal del polinucleótido está ligeramente modificada. Esto indica que a pesar de las interacciones electrostáticas repulsivas entre el calix y el ADN (ambas especies presentan cargas negativas), existe cierta interacción entre ellos, probablemente mediante una interacción de tipo *groove*. Teniendo en cuenta la estructura del calix utilizado (ver *Esquema 2.5* del capítulo 2), la interacción de tipo *groove* se produciría en el borde inferior del calix, es decir, a través de los grupos -OH. En cualquier caso, también debe considerarse que la estructura del calix presenta cierta flexibilidad. De hecho, esta característica le permite adoptar diferentes conformaciones en disolución. Esto podría ayudar al acercamiento del calix a la doble hélice del ADN.

La interacción entre el receptor (calix) y el polinucleótido es beneficiosa para el objetivo de este capítulo. La tendencia del calix a localizarse por sí mismo cerca de la doble hélice del ADN, hace que la aproximación de las moléculas de la DOX al polinucleótido sea más favorable.

Los datos de viscosidad obtenidos de las disoluciones de DOX/calix/ADN están de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los espectros de DC (ver *Figura 4.10*). La viscosidad aumenta a valores bajos de X y disminuye para relaciones molares de X mayores. De nuevo, se observa un máximo a un valor de X de aproximadamente 0.2, como se encuentra en

ausencia del calix. Sin embargo, la variación obtenida en las medidas de viscosidad a distintos valores de X es menor. Esto indica que las moléculas de DOX libres, que no se encuentran intercaladas entre los pares de bases nitrogenados del ADN, no estarían presentes en la disolución, sino localizadas en la cavidad del calix, que actuaría como un nanotransportador.

Los datos de viscosidad para las disoluciones de calix/ADN también se midieron para comprobar la interacción del calix con el polinucleótido. La *Figura 4.10* muestra una pequeña disminución de la viscosidad a concentraciones crecientes de calix en el medio (en este caso, X se define como $[\text{calix}]/[\text{ADN}]$). Este resultado apoya la idea de que el calix se une ligeramente con el ADN mediante un modo *groove*.

La presencia del calix en el medio no modifica el carácter cooperativo positivo de la interacción DOX/ADN. De hecho, se observa nuevamente una curva cóncava descendente en el gráfico de Scatchard cuando el calix se encuentra presente en la disolución (*Figura 4.11B*).

A continuación, se estudiaron los efectos tóxicos que la DOX, el calix y el complejo DOX/calix pudieran ejercer sobre diferentes líneas celulares cancerígenas. Los resultados correspondientes a la viabilidad del crecimiento celular se muestran en la *Figura 4.13A*. Los datos muestran una baja toxicidad del calix a bajas concentraciones para las cinco líneas celulares utilizadas (*Figura 4.13A*). Sólo se observó una toxicidad más elevada a las concentraciones más altas. No se observan diferencias sustanciales en la citotoxicidad del calix para las diferentes líneas celulares estudiadas. La línea celular de cáncer de pulmón humano H358 se ve ligeramente menos afectada por la presencia del macrociclo, mientras que la línea celular de cáncer de hígado HepG2 es la más afectada. En cualquier caso, la toxicidad mostrada por el nanotransportador es muy pequeña para las concentraciones más bajas de macrociclo. Este resultado demuestra que los calixarenos podrían usarse como nanotransportadores de material genético y de fármacos.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, se realizaron medidas de viabilidad celular para la DOX y el complejo DOX/calix para las diferentes líneas celulares de cáncer LS180, MCF7, A549, H358 y HepG2 a diferentes períodos de tiempo (24 h, 48 h, 72 h y 96 h). Las *Figura 4.13B-F, Figura 4.14-Figura 4.18* resumen los resultados obtenidos. Se observa que la presencia del calix disminuye la toxicidad de la DOX para la mayoría de las líneas celulares. Solo en la línea celular de cáncer de hígado humano HepG2, se observa un aumento en la toxicidad de la DOX para las concentraciones del calix más bajas (hasta 1.00 μM). También se obtiene un aumento en la toxicidad para concentraciones de macrociclo mayores de 25.0 μM en la línea celular HepG2. Hay que tener en cuenta que la toxicidad del calix es mayor para la línea HepG2 que para el resto de las líneas celulares. Por lo tanto, en este caso, la toxicidad del calix se suma a la de la DOX, lo que resulta en incremento de la toxicidad en la acción del antibiótico.

Con respecto a los diferentes tiempos de medida, los datos de viabilidad no cambiaron después de 72 h. (24 h y 48 h no parecen ser suficientes para observar la división celular y, por lo tanto, el efecto del agente antineoplásico, véase *Figura 4.14-Figura 4.18*).

También se realizaron ensayos de citotoxicidad con una línea celular sana REP-1 (células epiteliales de la retina, consulte *Figura 4.19*). Se observaron los mismos resultados que los obtenidos para las células cancerosas: el calixareno no ejerce ningún efecto tóxico sobre las células y la presencia de calixareno disminuye la toxicidad del antibiótico DOX.

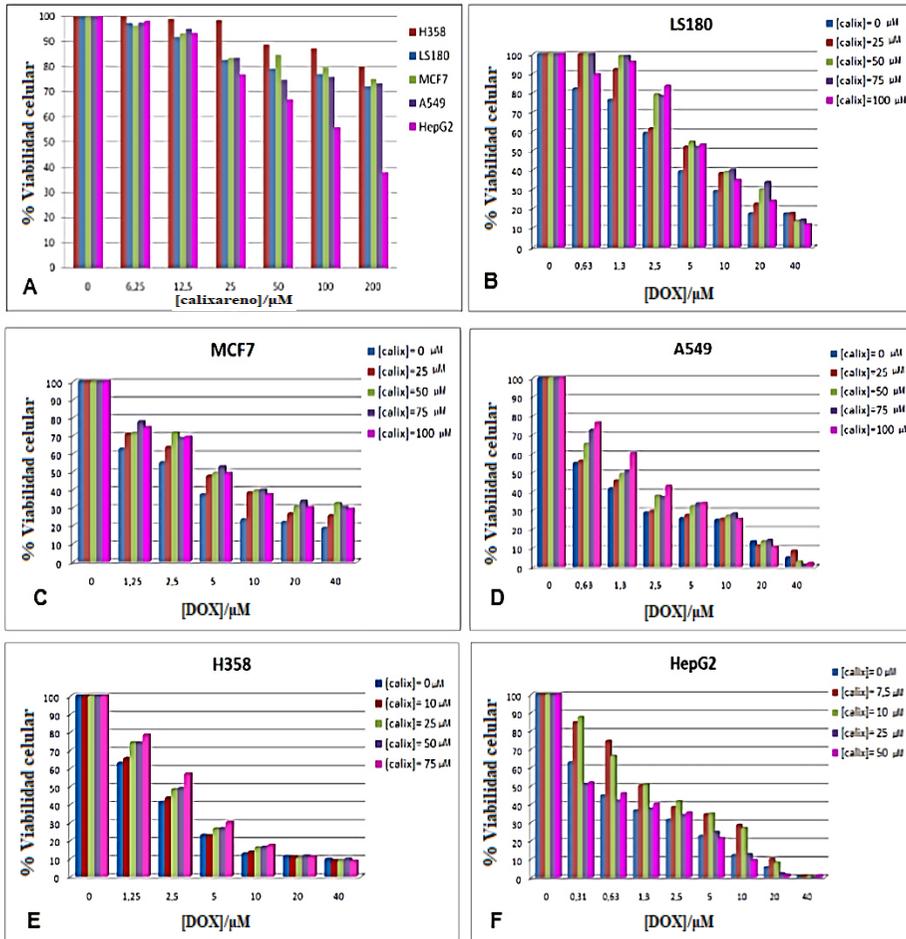


Figura 4.13. % de viabilidad celular del calix en ausencia de la DOX (A); y % de viabilidad celular de la DOX, para distintas concentraciones de la DOX y del calix (B – F), para diferentes líneas celulares cancerígenas a las 96 h.

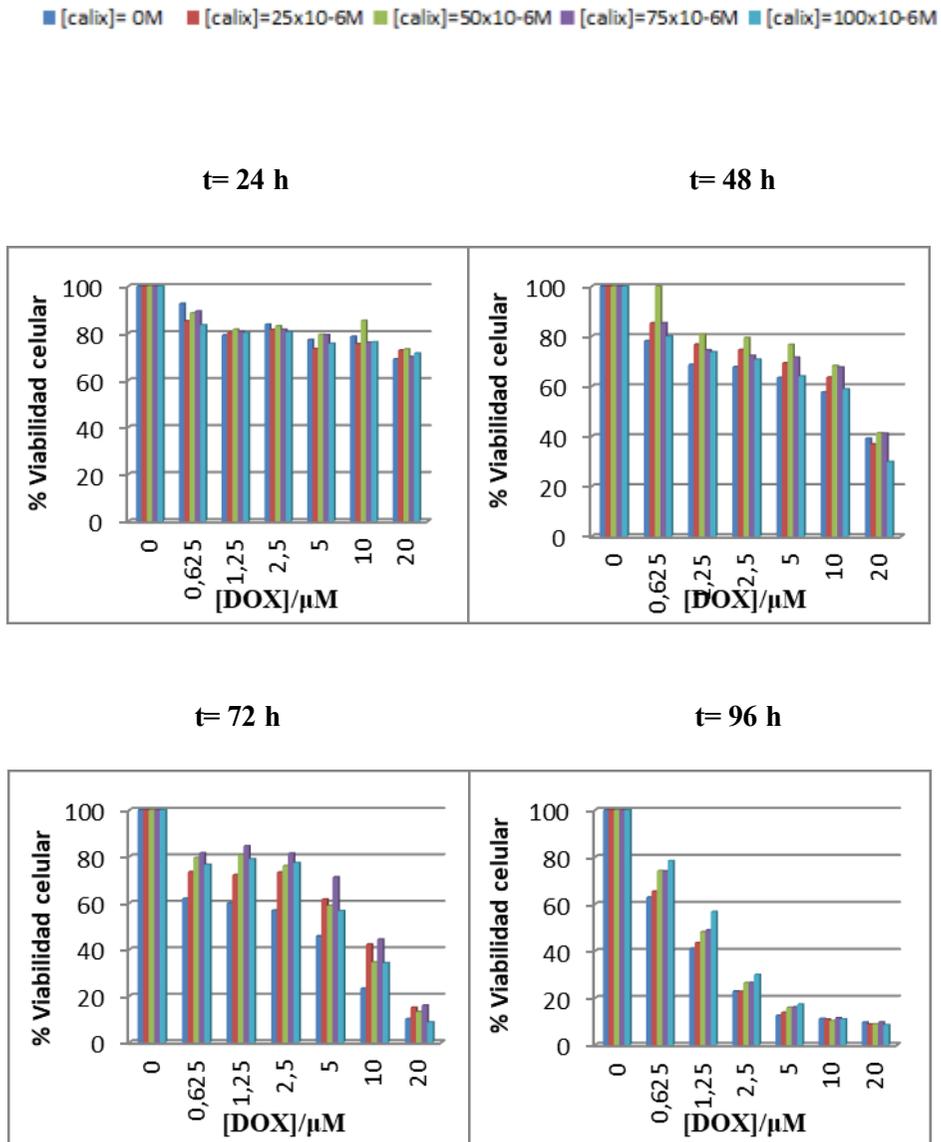


Figura 4.14. Citotoxicidad de DOX en presencia y ausencia de calix para la línea celular LS180 en diferentes momentos.

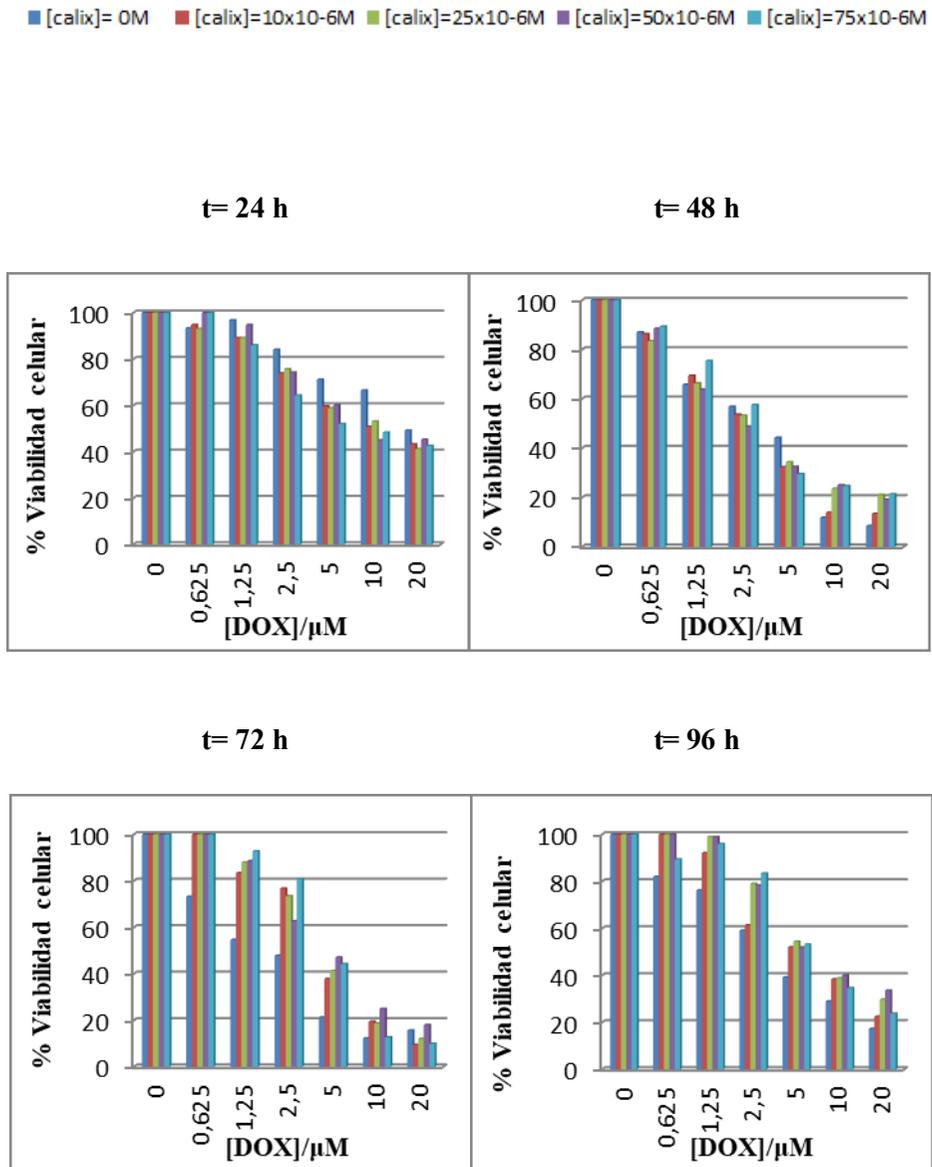


Figura 4.15. Citotoxicidad de DOX en presencia y ausencia de calix para la línea celular H358 en diferentes momentos.

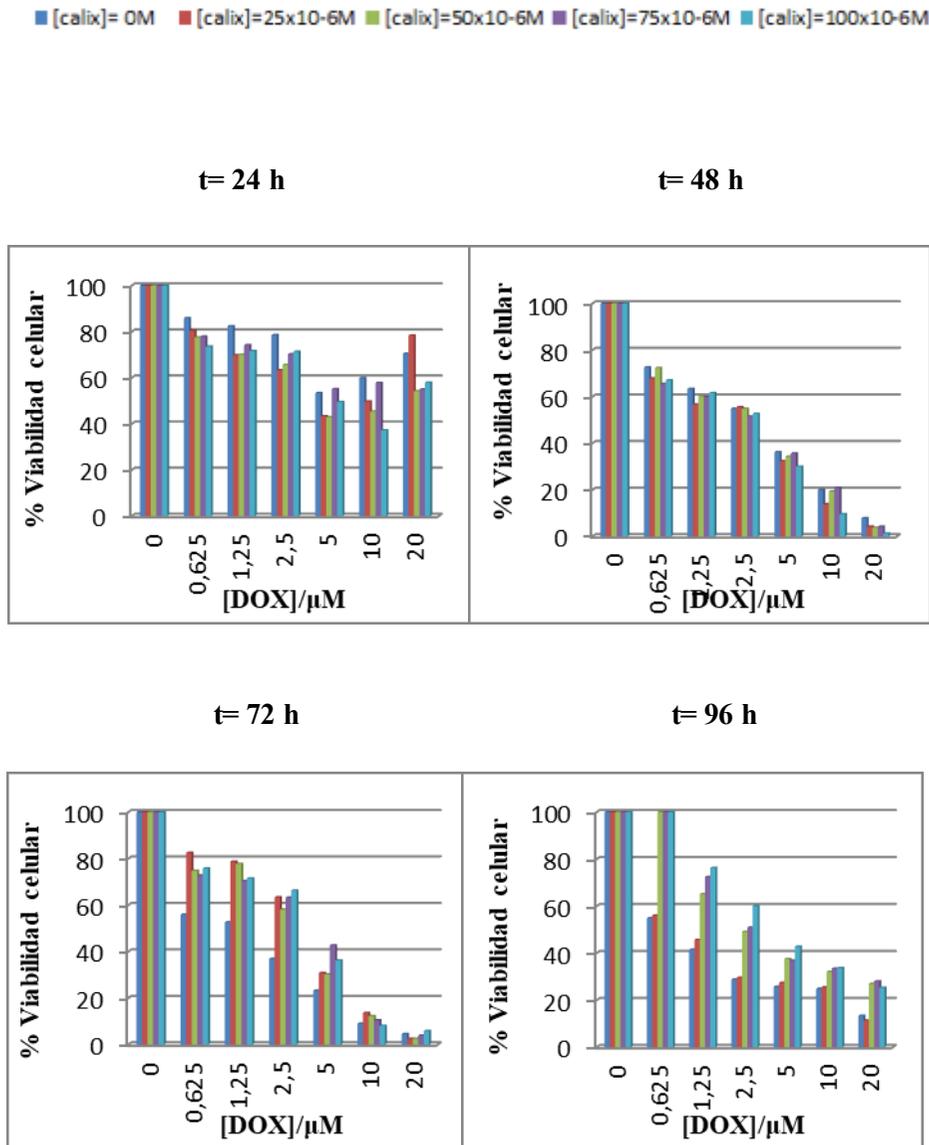


Figura 4.16. Citotoxicidad de DOX en presencia y ausencia de calix para la línea celular A549 en diferentes momentos.

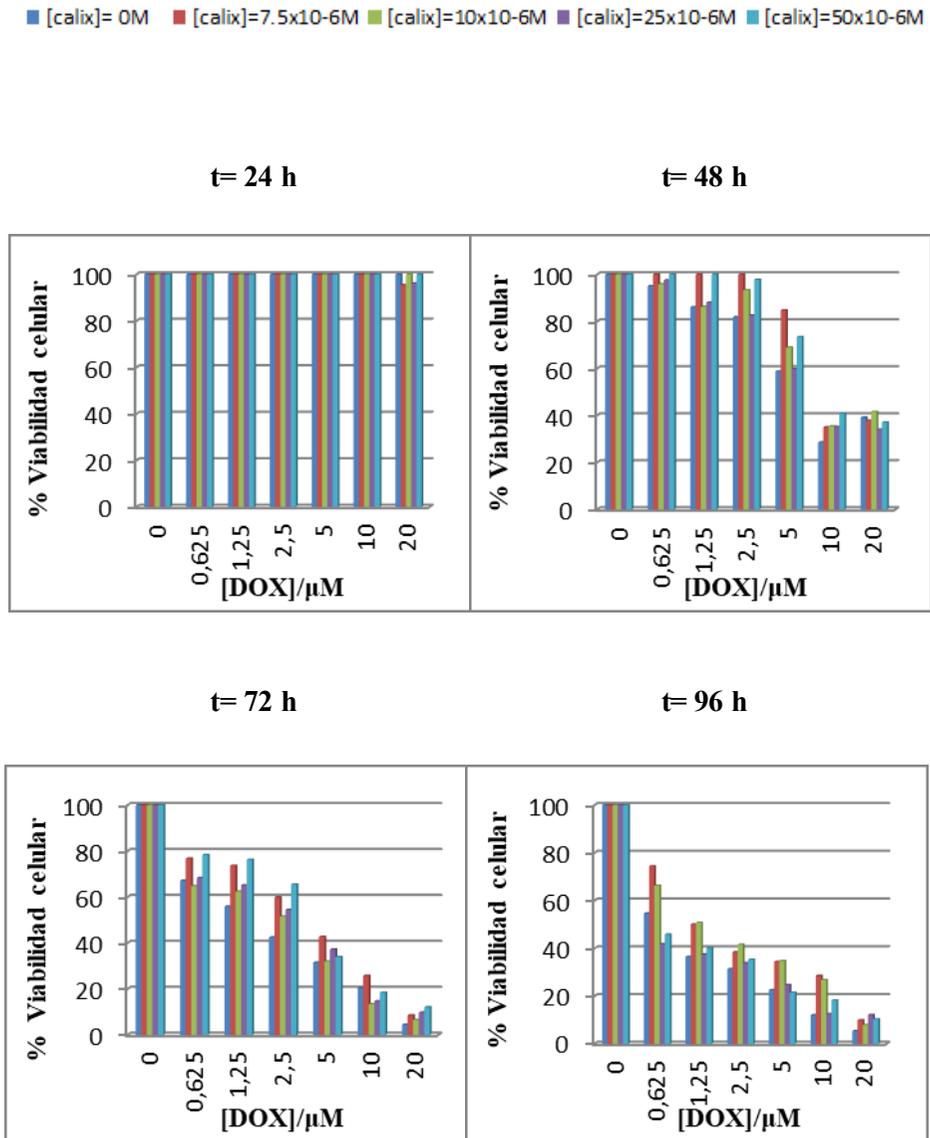


Figura 4.17. Citotoxicidad de DOX en presencia y ausencia de calix para la línea celular HepG2 en diferentes momentos.

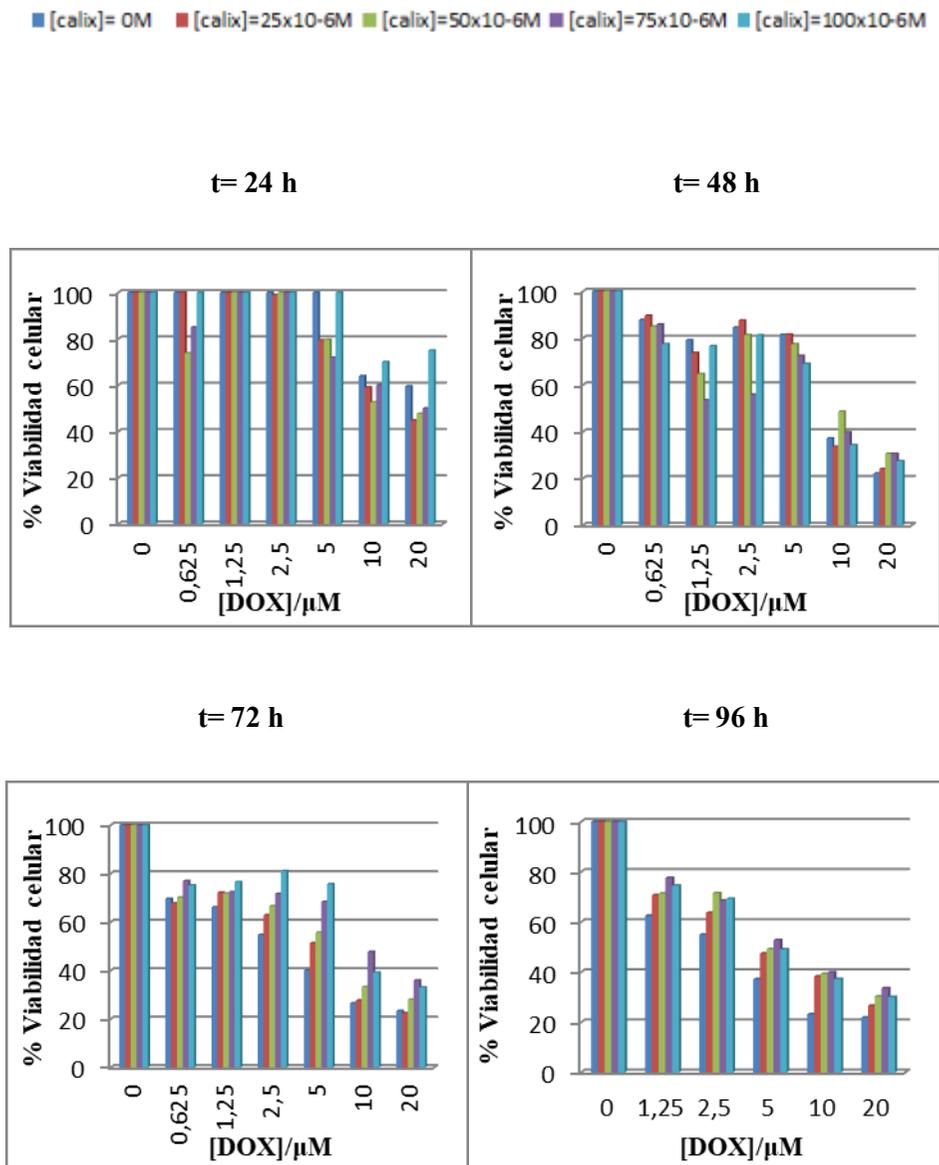


Figura 4.18. Citotoxicidad de DOX en presencia y ausencia de calix para la línea celular MCF7 en diferentes momentos.

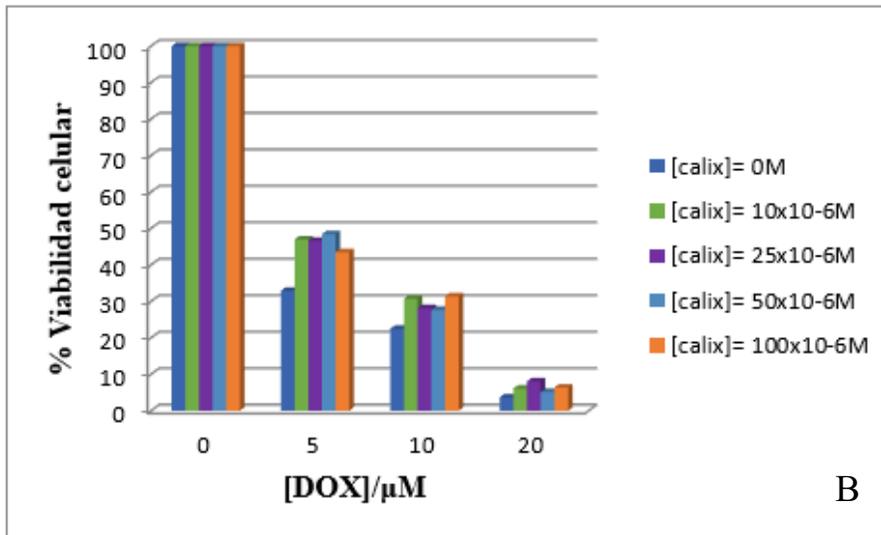
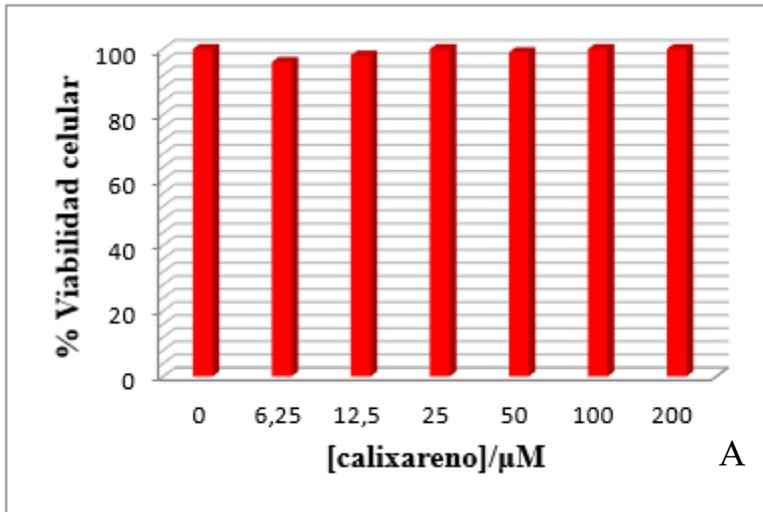


Figura 4.19. % de viabilidad celular con la línea celular normal RPE-1. (A) Dependencia de la concentración de calixareno, (B) Citotoxicidad de DOX en presencia y ausencia de calix a $t=96$ h.

4.3. Conclusiones

Se ha demostrado que los calixarenos pueden actuar como nanotransportadores para encapsular doxorrubicina. El hecho de que el p-sulfonatocalix[6]areno muestre una preferencia por ubicarse cerca de la doble hélice del ADN, mediante una interacción de tipo *groove* según los espectros de DC obtenidos, facilita el transporte del antibiótico hacia el polinucleótido (Figura 4.20). Además, los resultados de viabilidad celular demuestran que la presencia del calix en la disolución reduce parcialmente los efectos secundarios de la DOX. Solo en el caso de la línea celular de cáncer de hígado HepG2, la concentración del nanotransportador utilizado debe ser baja para disminuir dichos efectos secundarios.

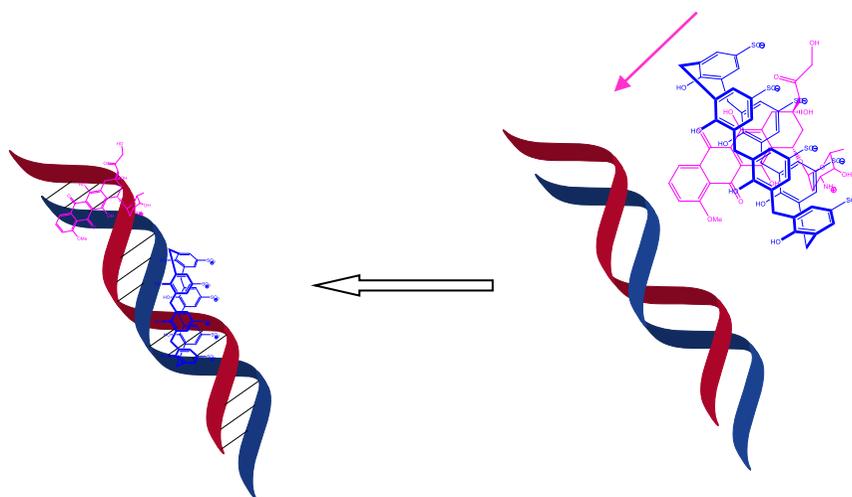


Figura 4.20. Esquema representativo de la interacción DOX/calix/ADN.

Dada la baja toxicidad mostrada por los calixarenos, así como los buenos resultados obtenidos en este trabajo cuando se utilizan como nanotransportadores del antibiótico doxorrubicina, estos macrociclos podrían ser utilizados en un futuro con fines farmacológicos.

4.4. Referencias bibliográficas

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
2. Edmonson, J. H. *et al.* Randomized comparison of doxorubicin alone versus ifosfamide plus doxorubicin or mitomycin, doxorubicin, and cisplatin against advanced soft tissue sarcomas. *J. Clin. Oncol.* **11**, 1269–1275 (1993).
3. Laginha, K. M., Verwoert, S., Charrois, G. J. R. & Allen, T. M. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6944–6949 (2005).
4. Harada, M. *et al.* Improved anti-tumor activity of stabilized anthracycline polymeric micelle formulation, NC-6300. *Cancer Sci.* **102**, 192–199 (2011).
5. Weber, P., Wagner, M. & Schneckenburger, H. Cholesterol dependent uptake and Interaction of Doxorubicin in MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 8358–8366 (2013).
6. Dunkern, T. R., Wedemeyer, I., Baumgärtner, M., Fritz, G. & Kaina, B. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA Repair (Amst)*. **2**, 49–60 (2003).
7. Walsby, E. J., Coles, S. J., Knapper, S. & Burnett, A. K. The topoisomerase II inhibitor voreloxin causes cell cycle arrest and apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with cytarabine. *Haematologica* **96**, 393–399 (2011).
8. Takemura, G. & Fujiwara, H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **49**, 330–352 (2007).
9. Tacar, O., Srimornsak, P. & Dass, C. R. Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* **65**, 157–170 (2013).
10. Lee, W.-H., Loo, C.-Y., Traini, D. & Young, P. M. Nano- and micro-based

- inhaled drug delivery systems for targeting alveolar macrophages. *Expert Opin. Drug Deliv.* **12**, 1009–1026 (2015).
11. Rivankar, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.* **10**, 853–8 (2014).
 12. Guo, X. L. *et al.* Co-delivery of cisplatin and doxorubicin by covalently conjugating with polyamidoamine dendrimer for enhanced synergistic cancer therapy. *Acta Biomater.* **84**, 367–377 (2019).
 13. Yang, R. *et al.* Preparation of folic acid-conjugated, doxorubicin-loaded, magnetic bovine serum albumin nanospheres and their antitumor effects in vitro and in vivo. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 4231–4243 (2014).
 14. Mirza, A. Z. A novel drug delivery system of gold nanorods with doxorubicin and study of drug release by single molecule spectroscopy. *J. Drug Target.* **23**, 52–58 (2015).
 15. Xia, Y. *et al.* Delivery of Doxorubicin for Human Cervical Carcinoma Targeting Therapy by Folic Acid-Modified Selenium Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3582 (2018).
 16. Wang, Y. *et al.* Preparation and evaluation of folic acid modified succinylated gelatin micelles for targeted delivery of doxorubicin. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **46**, 400–407 (2018).
 17. Prabakaran, M., Grailer, J. J., Pilla, S., Steeber, D. A. & Gong, S. Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials* **30**, 6065–6075 (2009).
 18. Emami, F. *et al.* Doxorubicin and Anti-PD-L1 Antibody Conjugated Gold Nanoparticles for Colorectal Cancer Photochemotherapy. *Mol. Pharm.* **16**, 1184–1199 (2019).
 19. Xu, X., Li, L., Zhou, Z., Sun, W. & Huang, Y. Dual-pH responsive micelle platform for co-delivery of axitinib and doxorubicin. *Int. J. Pharm.* **507**, 50–60 (2016).

20. Lv, L. *et al.* Amphiphilic copolymeric micelles for doxorubicin and curcumin co-delivery to reverse multidrug resistance in breast cancer. *J. Biomed. Nanotechnol.* **12**, 973–985 (2016).
21. Sun, J., Ren, K., Zhu, L. & Ji, J. Multilayers based on cationic nanocomplexes for co-delivery of doxorubicin and DNA. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **112**, 67–73 (2013).
22. Al-Omar, A., Abdou, S., Robertis, L. De, Marsura, A. & Finance, C. Complexation study and anticellular activity enhancement by doxorubicin-cyclodextrin complexes on a multidrug-resistant adenocarcinoma cell line. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1115–1120 (1999).
23. Bekers, O. *et al.* Effect of cyclodextrin complexation on the chemical stability of doxorubicin and daunorubicin in aqueous solutions. *Int. J. Pharm.* **72**, 123–130 (1991).
24. Meng, L., Zhang, X., Lu, Q., Fei, Z. & Dyson, P. J. Single walled carbon nanotubes as drug delivery vehicles: Targeting doxorubicin to tumors. *Biomaterials* **33**, 1689–1698 (2012).
25. Biagiotti, G. *et al.* Multiwalled carbon nanotubes for combination therapy: a biodistribution and efficacy pilot study. *J. Mater. Chem. B* **7**, 2678–2687 (2019).
26. Airoidi, M., Barone, G., Gennaro, G., Giuliani, A. M. & Giustini, M. Interaction of Doxorubicin with Polynucleotides. A Spectroscopic Study. *Biochemistry* **53**, 2197–2207 (2014).
27. Menger, F. M. & Portnoy, C. E. Chemistry of reactions proceeding inside molecular aggregates. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 4698–4703 (1967).
28. Vilar, M. & Navarro, M. Determination of cyclodextrin inclusion constant for aromatic carbonyl compounds through spectrophotometric and electrochemical methods. *Electrochim. Acta* **56**, 305–313 (2010).
29. Swiech, O. *et al.* Competition between self-inclusion and drug binding explains the pH dependence of the cyclodextrin drug carrier-molecular modelling and electrochemistry studies. *Nanoscale* **8**, 16733–16742 (2016).

30. Osa, T., Matsue, T. & Fujihara, M. Cyclodextrin-Nitrophenol Systems Studied by Polarography. *Heterocycles* **6**, 1833–1839 (1977).
31. Pérez-Arnaiz, C., Busto, N., Leal, J. M. & García, B. New insights into the mechanism of the DNA/doxorubicin interaction. *J. Phys. Chem. B* **118**, 1288–1295 (2014).
32. Ercolani, G. Assessment of Cooperativity in Self-Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 16097–16103 (2003).
33. Sabouri, A. A. & Moosavimovahedi, A. A. Evaluation of the hill coefficient from scatchard and klotz plots. *Biochem. Educ.* **22**, 48–49 (1994).
34. López-Cornejo, P., Pérez, P., García, F., de la Vega, R. & Sánchez, F. Use of the Pseudophase Model in the Interpretation of Reactivity under Restricted Geometry Conditions. An Application to the Study of the $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{pz}]^{2+} + \text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ Electron-Transfer Reaction in Different Microheterogeneous Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5154–5164 (2002).

CAPÍTULO 5. CALIX[4]ARENOS
CATIÓNICOS ANFIFÍLICOS. SÍNTESIS,
AGREGACIÓN Y USO COMO
NANOTRANSPORTADORES DE
MATERIAL GENÉTICO Y
DOXORRUBICINA

En los últimos años, los macrociclos de origen sintético han generado un especial interés, debido a sus características conformacionales preorganizadas y a sus múltiples actividades biológicas.¹⁻³ Hoy en día, los esfuerzos se centran en la funcionalización de estos receptores con grupos farmacóforos establecidos, con el propósito de obtener fármacos innovadores que satisfagan las necesidades clínicas. Uno de los macrociclos sintéticos más versátil conocido hasta la fecha son los calixarenos,⁴ aunque conviene mencionar a las ciclodextrinas,⁵ los éteres corona,⁶ las ftalocianinas⁷ y los cucurbiturilos.⁸ Todos ellos tienen diversas aplicaciones en Química Supramolecular.

Los calixarenos son oligómeros macrocíclicos formados por unidades fenólicas unidas mediante grupos metileno. Tienen cavidades hidrófobicas que pueden alojar pequeñas moléculas. Una de las principales ventajas de estos macrociclos es la facilidad sintética para generar ligandos multivalentes, ya que se pueden introducir diferentes sustituyentes en los bordes superior e inferior. Por ejemplo, pueden tener un carácter hidrofílico si las unidades de benceno que forman el anillo, ya sea el borde superior o el inferior, están

funcionalizados con grupos iónicos. Es necesario señalar que la multivalencia es una de las características importantes de las interacciones no covalentes que se encuentran en la naturaleza y es un factor clave a considerar para un químico supramolecular. Otra característica de los calixarenos es que pueden presentar diferentes conformaciones. Los calixarenos que contienen un número de unidades fenólicas mayor de 5 son bastante flexibles, sin orientación específica de los sustituyentes en el borde superior e inferior. Sin embargo, los calixarenos con 4 unidades de fenol (calix[4]arenos) presentan conformaciones fijas, que pueden variar según la funcionalización de los bordes superior e inferior.⁸ Esto es importante porque uno de los factores relevantes en el transporte de medicamentos es el control estructural, con frecuencia deficiente, del complejo (fármaco/vehículo). Muchos calixarenos muestran una buena biocompatibilidad y baja citotoxicidad, que son requisitos previos importantes para la aplicación en organismos vivos.⁹ Además, su capacidad de autoagregación para formar micelas y vesículas ha sido explorada en numerosos estudios.¹⁰⁻¹³ Debido a este fenómeno, el monómero y la correspondiente estructura supramolecular muestran diferentes propiedades químicas y físicas. Esta característica ha sido empleada en el diseño de nanotransportadores de fármacos, así como de ácidos nucleicos.

Las micelas son una de las estructuras supramoleculares más simples empleadas como nanotransportadores de agentes terapéuticos. Los sistemas micelares en disolución acuosa presentan varias ventajas sobre otros sistemas,¹⁴ como polímeros solubles y liposomas, que incluyen un tamaño reducido, alta eficiencia de encapsulación (EE), así como un mayor control sobre el proceso de autoagregación, y por lo tanto, sobre su capacidad de encapsulación y liberación. En 2011, C. Tu y colaboradores¹⁵ aprovecharon las interacciones huésped-hospedador existentes entre un calix[4]areno pegilado y clorina e6 hidrofóbica para formar micelas poliméricas, que exhibieron una mayor eficacia quimioterapéutica sobre células tumorales que la clorina e6 libre. Para reparar lesiones o tratar enfermedades en el sistema nervioso

central, el estrés oxidativo es un elemento vital para la supervivencia celular. E. James y colaboradores¹⁶ desarrollaron nuevos sistemas micelares basados en fosfolípidos de calix[4]arenos, con un marcado efecto antioxidante frente a la generación de especies reactivas al oxígeno (ROS). Además, encapsularon curcumina, lo que permitió controlar su liberación para realizar la liberación y ejercer así un mayor efecto antioxidante sobre las células. Con el objetivo de mejorar la eficiencia de encapsulación, Z. Qin y colaboradores¹⁷ prepararon micelas esféricas multilamelares que contenían el antipsicótico clorpromazina, basándose en interacciones no covalentes con p-sulfonato-calixareno. Esto resultó en una alta eficiencia de encapsulación (61.0 %).

En relación con los procesos de introducción de material genético en las células del paciente para tratar determinadas enfermedades, R. Rodik y colaboradores^{10,18} contribuyeron a dilucidar el mecanismo de interacción entre micelas de calixarenos anfífilicos policatiónicos y ADN. Estos autores sugieren que el polinucleótido se dispone alrededor de las micelas catiónicas, originando partículas de tamaño nanométrico. Además, se observó la condensación del ADN, que se ve favorecida para los calixarenos catiónicos con cadenas hidrocarbonadas relativamente largas.

Entre las diferentes estructuras resultantes del proceso de autoagregación de los calixarenos, las vesículas exhiben ventajas notables para la administración y liberación controlada de fármacos.^{19,20} A diferencia de las micelas, las vesículas encapsulan preferentemente medicamentos hidrófilos, mostrando alta eficacia de encapsulación debido a su mayor tamaño. En 2015, J. Mo y colaboradores prepararon vesículas lipídicas basadas en calix[4]arenos para encapsular y liberar el agente antineoplásico carboplatino en el tratamiento contra el cáncer de ovario. Se observó un aumento de la eficacia del fármaco de 4.5 veces²¹ con respecto al fármaco libre. Estos mismos autores¹² presentaron un trabajo similar, donde empleaban paclitaxel para tratar células cancerosas de ovario y pulmón. Con la idea de mejorar su efecto terapéutico y disminuir los efectos secundarios, diseñaron vesículas que

contenían el mismo macrociclo anterior, que previamente había sido conjugado con receptores del ácido fólico. Los resultados demostraron que la presencia de este ligando esencial en el mecanismo celular permite alcanzar y penetrar en las células tumorales, sobreexpresando los receptores de folato en la superficie. Además, el agente terapéutico encapsulado se libera de una manera más controlada, sostenida y selectiva.

En este capítulo, se ha estudiado la autoagregación de cuatro calixarenos catiónicos anfifílicos (ver *Esquema 2.6* en el capítulo 2) en disolución acuosa y se han caracterizado los agregados formados en los diferentes intervalos de concentración de los calixarenos. Como puede verse en el *Esquema 2.6*, se ha variado la naturaleza del grupo hidrofílico presente en el borde superior, así como la longitud de las cadenas hidrófobas unidas al borde inferior. Dado que el interés de estudiar el potencial de estos agregados como vehículos, vectores de material genético, se eligieron calixarenos catiónicos con el objetivo de favorecer sus interacciones con el ADN, negativamente cargado. También se quiso investigar su potencial como nanotransportadores de fármacos, para lo que se estudió la encapsulación de la doxorubicina (DOX) en los agregados formados por los calixarenos. Como se ha citado anteriormente, DOX es un antibiótico perteneciente a la familia de las antraciclinas (ver *Esquema 2.3* en el capítulo 2) con una alta citotoxicidad, que se utiliza en el tratamiento del cáncer de pulmón, ovario y mama, así como en linfomas y leucemia, pero que causa importantes efectos secundarios.²² La encapsulación de este medicamento podría disminuir los efectos secundarios y mejorar el uso clínico de este medicamento, como ya se pudo observar en los resultados obtenidos en el capítulo anterior. Estos resultados permitirán obtener más información sobre las relaciones estructura-agregación de los calixarenos, así como la dependencia de las interacciones nanotransportador/fármaco de las características del agregado formado en disolución, lo cual es crucial para diseñar vectores y nanotransportadores más eficientes.

5.1 Parte experimental

Todas las medidas experimentales fueron realizadas a una temperatura de 298.15 ± 0.15 K y a pH fijo, mediante el uso de una disolución tampón ([HEPES]= 10 mM, pH= 7.4).

5.1.1. Espectroscopía de absorción UV-vis

Los espectros de absorción fueron obtenidos a diferentes relaciones molares X ($X = [\text{calixareno}]/[\text{ADN}]$) para comprobar la estabilidad de estas disoluciones. Se han recogido en un rango de longitudes de onda desde 200 a 700 nm. La estabilidad de las disoluciones de doxorubicina también se comprobó midiendo la absorbancia a la longitud de máxima absorción, a 490 nm.

5.1.2. Espectrofluorimetría

5.1.2.1. Determinación de la concentración de agregación crítica, CAC, utilizando como sonda el 8-anilino-1-naftalensulfonato de sodio (ANS)

Las titulaciones de fluorescencia fueron realizadas a una concentración de ANS de 2.50×10^{-5} mol dm^{-3} y variando la concentración de macrociclo presente en la disolución. Estas experiencias fueron realizadas con una potencia de lámpara de 400 V y anchuras de 5.0 y 5.0 nm para las rendijas de excitación y emisión, respectivamente. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron de 350 nm y 471 nm, correspondientes a los máximos de

absorción y emisión del ANS, respectivamente. Se observaron dos puntos de inflexión al representar I/I_0 frente a $[\text{calixareno}]$, donde I e I_0 son las intensidades de emisión de fluorescencia del ANS en presencia y en ausencia de calix, respectivamente. En el texto, la concentración de calixareno correspondiente al primer punto de inflexión será designada como CAC1 y la correspondiente al segundo punto de inflexión como CAC2.

5.1.2.2. Experimentos competitivos en presencia de bromuro de etidio (EtBr)

La intensidad de emisión de fluorescencia del EtBr fue medida a 587 nm ($\lambda_{\text{exc}}=520$ nm). Las rendijas de excitación y emisión dependieron de la concentración de calixareno, sin embargo la potencia de la lámpara fue fijada a 400 V. Para concentraciones bajas de calix, se utilizaron rendijas de excitación y emisión iguales a 10.0 nm. Al aumentar la concentración de macrociclo, las rendijas de excitación y emisión utilizadas fueron de 5.0 y 5.0 nm, respectivamente. Se varió la concentración de calixareno, pero las concentraciones de EtBr y ADN se mantuvieron constantes, aunque sus valores también dependieron del rango de concentraciones de calixareno empleado. Para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$, las concentraciones de polinucleótido y sonda fluorescente fueron de 5.00×10^{-7} mol dm^{-3} y de 5.00×10^{-6} mol dm^{-3} , respectivamente. Para $[\text{calix}] > \text{CAC1}$, se utilizaron $[\text{EtBr}] = 3.30 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} y $[\text{ADN}] = 2.00 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} . El rango de concentraciones de macrociclo investigado dependió de la naturaleza del calix estudiado.

5.1.3 Potencial zeta (ζ)

La determinación de esta propiedad fue realizada a una concentración fija de ADN y a una concentración variable de calixareno. Para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$ $[\text{ADN}] = 5.00 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, y para $[\text{calix}] > \text{CAC1}$ $[\text{ADN}] = 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Estas experiencias fueron realizadas siguiendo las pautas indicadas en la sección 2.2.4 del capítulo 2.

5.1.4 Electroforesis en gel de agarosa

Estas experiencias fueron realizadas siguiendo las pautas que se encuentran detalladas en la sección 2.2.12 del capítulo 2, a una concentración de ADN fija de $2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, en presencia de concentraciones variables de calix.

5.1.5 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

El diámetro hidrodinámico de las partículas y la polidispersidad (PDI) de estos sistemas fueron obtenidos en las mismas condiciones y utilizando el mismo equipo que las medidas de potencial zeta. Estas experiencias fueron realizadas a una concentración fija de ADN y a una concentración variable de calixareno. Para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$ $[\text{ADN}] = 5.00 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, y para $[\text{calix}] > \text{CAC1}$ $[\text{ADN}] = 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

5.1.6. Dicroísmo circular (DC)

Los espectros fueron registrados desde 220 a 320 nm dentro de la región intrínseca del ADN.

Las disoluciones de calixareno/ADN con $[\text{calix}] < \text{CAC1}$ no se pudieron estudiar, debido a la baja concentración de polinucleótido presente en las disoluciones, por lo que los resultados no eran fiables. Para $[\text{calix}] > \text{CAC1}$, la concentración de ADN se mantuvo constante a $2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, mientras que se varió la concentración de calix. Todas las medidas fueron expresadas en términos de elipticidad molar según la ec. 2.1. del capítulo 2.

5.1.7 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

Con el objetivo de caracterizar la morfología de estos sistemas, se obtuvieron imágenes de TEM de los diferentes agregados de calixareno. Estas imágenes fueron obtenidas mediante el protocolo especificado en la sección 2.2.11 del capítulo 2.

5.1.8 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Con el propósito de visualizar la conformación de las moléculas de polinucleótido, sólo y en presencia de los calixarenos, se utilizó una concentración de ADN de $3.00 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$ y de $5.00 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ para $[\text{calix}] > \text{CAC1}$. Las imágenes de AFM de los complejos calixareno/ADN fueron obtenidas mediante el protocolo que se encuentra detallado en la sección 2.2.10 del capítulo 2.

5.1.9 Ensayos *in vitro* de citotoxicidad (Ensayo MTT)

La evaluación de la citotoxicidad de los macrociclos estudiados y de sus agregados ha sido realizada en un período de 96 h, utilizando las líneas celulares A549, MCF7, LS180, HepG2 y RPE-1. El protocolo seguido se ha especificado en la sección 2.2.13. del capítulo 2.

5.1.10 Método de diálisis

La eficiencia de encapsulación del agente antineoplásico doxorubicina, DOX ($[DOX] = 2.00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$), en los agregados, así como su liberación de estos fue estudiada empleando el método de diálisis detallado en la sección 2.2.14. del capítulo 2. Para ello, se mezclaron los volúmenes necesarios para formar el complejo DOX/calix para cada sistema investigado y se mantuvo en ultrasonidos durante 2 min.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Estudio del proceso de auto-agregación de los calixarenos en disolución acuosa

El autoensamblaje de moléculas macrocíclicas como los calixarenos es un campo de estudio muy activo de la Química Supramolecular. Nanoestructuras, como las micelas y las vesículas, han encontrado muchas aplicaciones interesantes en Química, Biología y Ciencias de los Materiales. Para estudiar los procesos de autoagregación de los calixarenos investigados en este trabajo, se utilizó el cromóforo 8-anilino-1-naftalensulfonato de sodio, ANS. Esta sonda fluorescente se utiliza con frecuencia en la determinación de la concentración de agregación crítica (CAC) de moléculas anfifílicas.²³ Es bien conocido que la intensidad de emisión de fluorescencia, I , del ANS cuando se disuelve en agua es baja, con una longitud de onda de emisión máxima a 530 nm.²⁴ Pero, cuando el ANS se encuentra en un entorno menos polar, se observa un aumento significativo de la intensidad de emisión y un desplazamiento del máximo hacia la región del azul. Dado que la unión del ANS a las micelas y vesículas resulta en un gran aumento de la intensidad de emisión, es posible determinar los cambios estructurales presentes en estos sistemas. La *Figura 5.1* muestra la dependencia de la intensidad de emisión de fluorescencia del ANS a 471 nm del $\log([calix])$. Se observan dos puntos de inflexión y los valores de CAC1 y CAC2 se estimaron a partir de la intersección de las regiones lineales encontradas para los intervalos de concentración por debajo y por encima de ellos. Este comportamiento fue observado para todos los calixarenos investigados. Los valores de CAC1 y CAC2 para cada uno de los macrociclos estudiados se recogen en la *Tabla 5.1*. Se puede ver que los valores de CAC1 son similares para todos los calixarenos, siendo prácticamente independientes de la longitud de la cadena alquílica hidrófoba y de la naturaleza del grupo de cabeza hidrofílico. Sin

embargo, CAC2 disminuye cuando la longitud de la cadena hidrocarbonada aumenta para los derivados de imidazolinio. Por otro lado, la sustitución de un grupo catiónico de amonio cuaternario por un imidazolinio disminuye significativamente el valor de CAC2. Esta tendencia también fue encontrada por otros autores.²⁵

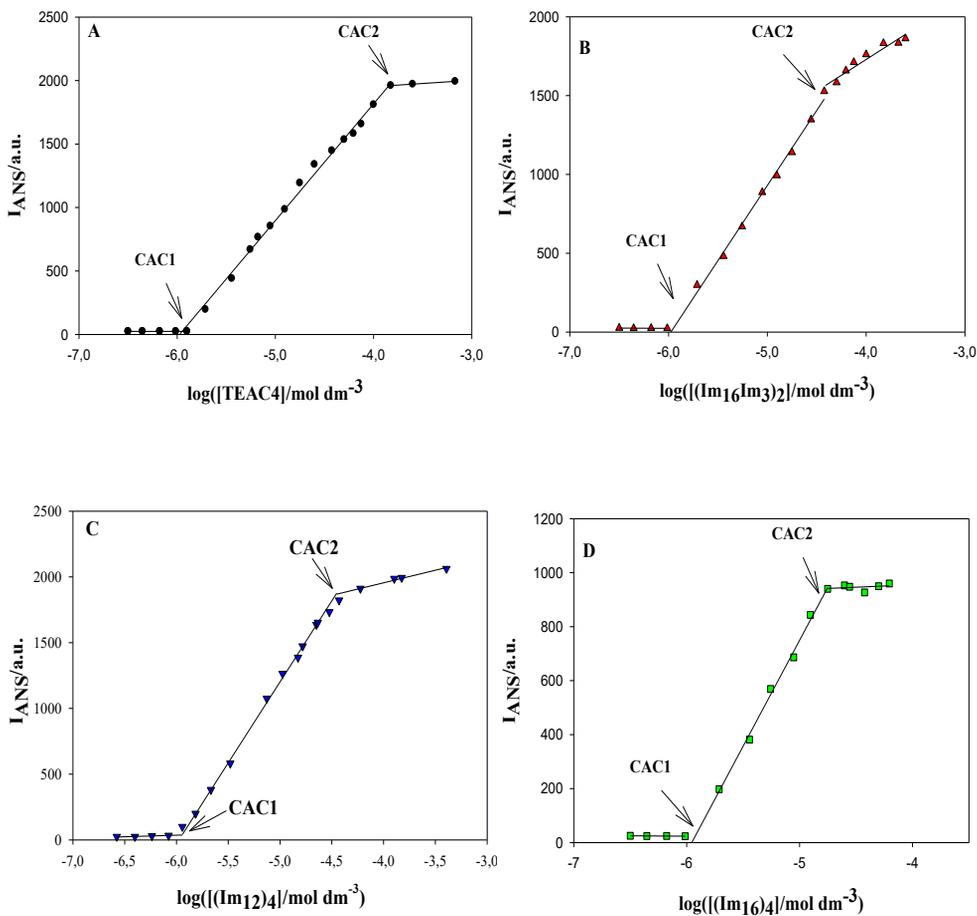


Figura 5.1. Dependencia de la intensidad de emisión de fluorescencia del ANS ($\lambda=471$ nm) del $\log([\text{calix}])$ (A: TEAC4, B: $(\text{Im}_{16}\text{Im}_3)_2$, C: $(\text{Im}_{12}\text{)}_4$, y D: $(\text{Im}_{16}\text{)}_4$).

Tabla 5.1. Valores de la primera y segunda concentración de agregación crítica, CAC1 y CAC2, de los calixarenos investigados en este capítulo obtenidos a partir de medidas de fluorescencia del ANS.

Calixareno	CAC1/mol dm ⁻³	CAC2/mol dm ⁻³
TEAC ₄	1.10 × 10 ⁻⁶	1.40 × 10 ⁻⁴
(Im ₁₆ Im ₃) ₂	1.80 × 10 ⁻⁶	2.50 × 10 ⁻⁵
(Im ₁₂) ₄	1.20 × 10 ⁻⁶	3.50 × 10 ⁻⁵
(Im ₁₆) ₄	1.70 × 10 ⁻⁶	7.20 × 10 ⁻⁶

Con el propósito de obtener información acerca del tamaño y la morfología de los agregados formados, se realizaron medidas de microscopía de transmisión electrónica (TEM). Esta técnica permite observar nanoestructuras como las micelas y vesículas, así como las transiciones de monómeros↔micelas, micelas↔micelas, micelas↔vesículas y vesículas↔vesículas.^{26,27} La *Figura 5.2* muestra las imágenes de TEM de las nanoestructuras formadas por los calixarenos para [calix]<CAC1 (A, D, G, J), CAC1<[calix]<CAC2 (B, E, H, K) y [calix]>CAC2 (C, F, I, L). Los diámetros promedio de las nanoestructuras observadas en la *Figura 5.2* se muestran en la *Tabla 5.2*. Las concentraciones de calix enumeradas en esta tabla para cada macrociclo, se corresponden con los valores de concentración empleados para obtener las imágenes de TEM. La *Tabla 5.2* también presenta el diámetro promedio y el índice de polidispersidad, PDI, obtenidos mediante la dispersión de luz dinámica (DLS) para los mismos sistemas. No se pudo obtener información sobre las concentraciones más bajas de calix a partir de las medidas de DLS debido a las limitaciones del instrumento utilizado. Esto se indica en la *Tabla 5.2* con el símbolo ^{a*}. Los resultados confirman la complejidad las disoluciones acuosas de los calixarenos. Para [calix]< CAC1 solo se observan micelas.

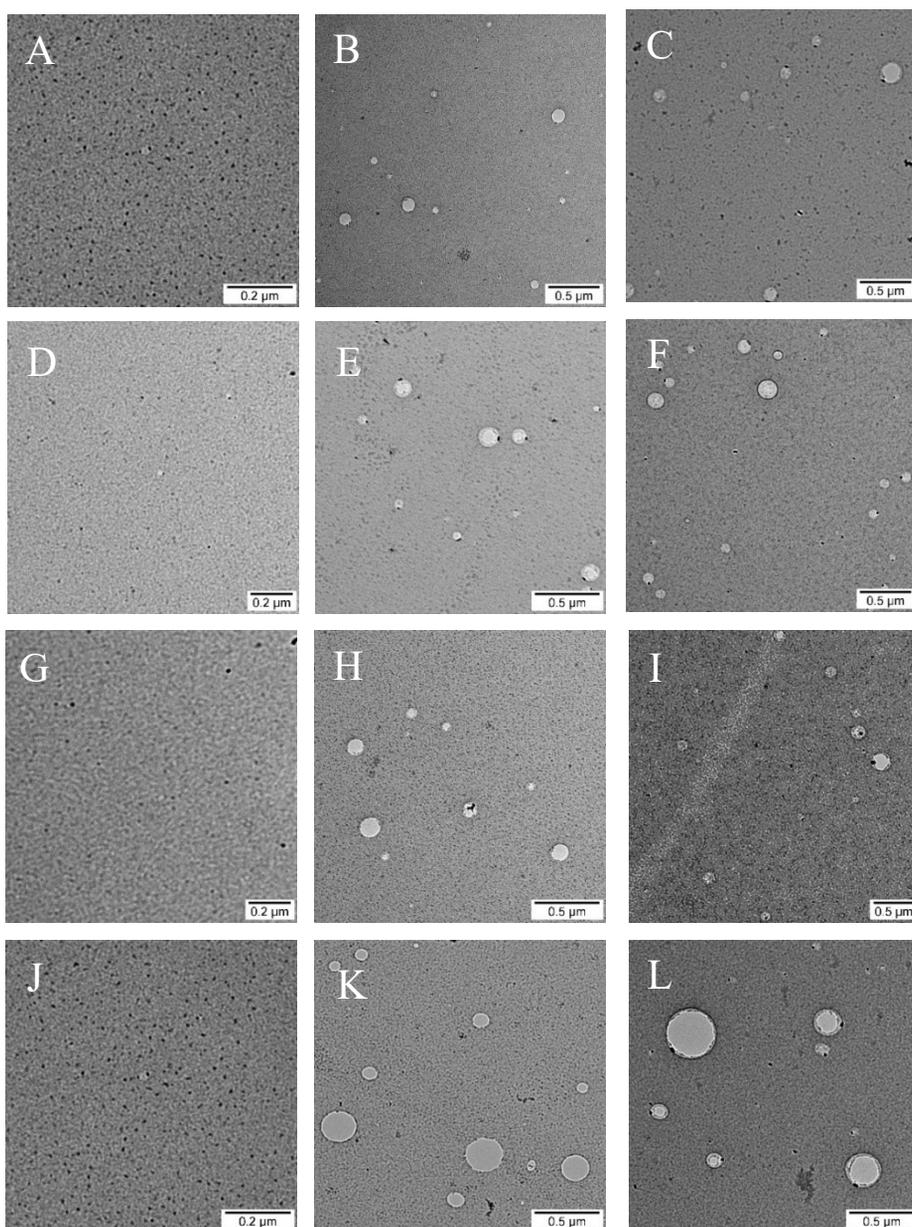


Figura 5.2. Imágenes de TEM de las nanoestructuras formadas por los calixarenos estudiados en este capítulo. TEAC4: A, B y C; (Im₁₆Im₃)₂: D, E y F; (Im₁₂)₄: G, H e I; (Im₁₆)₄: J, K y L (A, D, G y J para [calix]< CAC1; B, E, H, K para CAC1< [calix]< CAC2; y C, F, I, L para [calix]> CAC2).

Tabla 5.2. Diámetro promedio, estimado a partir de medidas de TEM y DLS, e índice de polidispersidad (PDI) para las nanoestructuras formadas por los calixarenos estudiados a diferentes concentraciones.

Calixareno	[calix]/M	TEM				DLS		
		P ₁ /nm	P ₂ /nm	P ₃ /nm	P ₄ /nm	P ₁ (%) /nm	P ₂ (%) /nm	PDI
TEAC ₄	^a 2.00×10 ⁻⁷	10±2	-	-	-	-	-	-
	^b 8.00×10 ⁻⁵	9.1±1.5	197±30	-	-	9.8±1.4 (41%)	255±33 (59%)	0.50±0.02
	^c 3.00×10 ⁻⁴	10±3	235±5	151±3	62±8	9.7±0.4 (45%)	294±40 (55%)	0.81±0.05
(Im ₁ Im ₃) ₂	^a 2.00×10 ⁻⁷	12.8±1.5	-	-	-	-	-	-
	^b 7.00×10 ⁻⁶	12±2	124±15	-	-	-	145±16 (100%)	0.24±0.03
	^c 6.00×10 ⁻⁵	13±2	170±16	99±18	-	9.1±1.9 (26%)	198±29 (74%)	0.39±0.13
(Im ₁₂) ₄	^a 2.00×10 ⁻⁷	20±3	-	-	-	-	-	-
	^b 7.00×10 ⁻⁶	19±3	83±9	-	-	-	157±13 (100%)	0.46±0.06
	^c 6.00×10 ⁻⁵	18±2	141±2	100±4	-	9.6±1.0 (16%)	195±33 (84%)	0.34±0.07
(Im ₁₆) ₄	^a 2.00×10 ⁻⁷	20±4	-	-	-	-	-	-
	^b 4.00×10 ⁻⁶	19.5±1.8	319±18	-	-	27±3 (5%)	360±50 (95%)	0.41±0.03
	^c 1.00×10 ⁻⁵	18±3	405±11	310±6	146±4	442±92 (56%)	136±17 (44%)	0.40±0.04

^a[calix]<CAC1; ^bCAC1<[calix]<CAC2; ^c[calix]>CAC2

^a No fue posible medir esta concentración en todos los casos investigados por DLS, debido a que es demasiado baja para obtener resultados significativos.

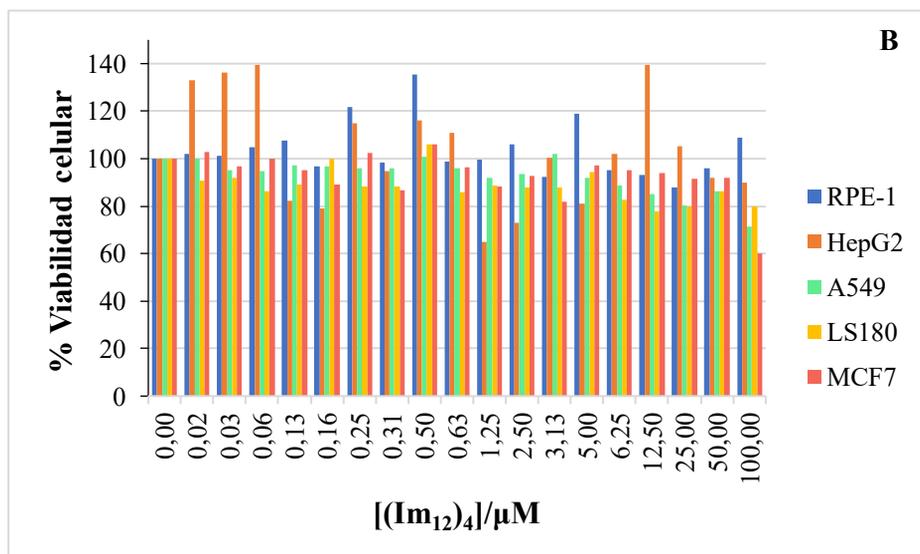
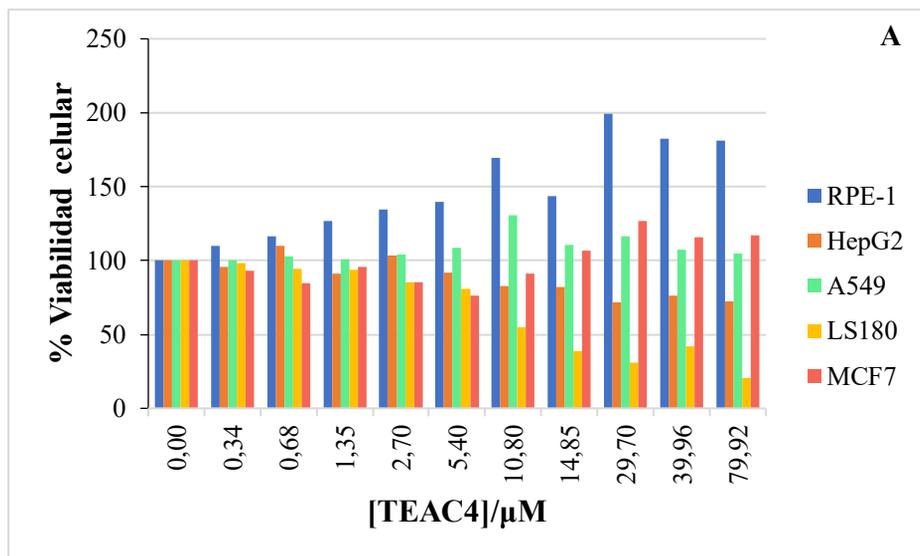
Los diámetros promedio obtenidos por TEM y DLS son los esperados para este tipo de nanoestructuras. El rango de concentración donde están presentes los monómeros de las moléculas de calix no pudo ser estudiado por fluorescencia, debido a que concentraciones muy bajas de calixareno no permitieron obtener resultados experimentales detectables, ni tampoco fue apreciado en experiencias previas mediante TEM. Por lo tanto, no se pudo obtener información fiable sobre las disoluciones de calixarenos en forma monomérica. Los resultados de TEM muestran la presencia de micelas y vesículas para CAC1<[calix]<CAC2. Para el intervalo [calix]>CAC2, se

encuentran micelas y una distribución de vesículas. El hecho de que se detecte un segundo valor de CAC es indicativo de una variación en la polaridad del entorno del ANS. Esto podría deberse a la formación de vesículas más grandes o incluso a la aparición de vesículas con varias capas o multilamelares. Los datos recogidos en la *Tabla 5.2* muestra que un aumento en la concentración de calix da como resultado un incremento de la polidispersidad de los sistemas.

La *Tabla 5.2* también muestra que el diámetro promedio estimado por las dos técnicas es diferente, siendo generalmente mayor el obtenido por DLS. Además, esta técnica no puede distinguir entre poblaciones de vesículas con varios tamaños y las micelas no son detectables para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$. Muchos autores han discutido las diferencias entre los tamaños promedio medidos por ambas técnicas.^{28,29} Se sabe que el TEM mide el tamaño del núcleo de la partícula, mientras que la DLS incluye la capa de solvatación de ésta. No obstante, para sistemas monodispersos, los tamaños obtenidos por TEM y DLS no suelen ser muy diferentes. Las diferencias aumentan cuando hay una distribución de tamaños. Esto se debe a que la microscopía electrónica de transmisión se basa en contar el número de partículas, dando un tamaño promedio numérico, mientras que la DLS pondera la distribución de una manera diferente, dando más peso a las partículas más grandes, lo que aumenta el tamaño promedio.

Con el propósito de obtener información sobre la influencia de la concentración de calix en la viabilidad celular, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de la citotoxicidad de los calixarenos a diferentes concentraciones. La *Figura 5.3* muestra la viabilidad celular de los macrociclos estudiados para diferentes líneas celulares. Se observó una viabilidad celular de ~100% para la mayoría de las líneas celulares, para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$, donde sólo están presentes las micelas. Sólo en el caso de $(\text{Im}_{16}\text{Im}_3)_2$ e $(\text{Im}_{16})_4$ se aprecia una cierta toxicidad para las líneas HepG2 y MCF7, y A549 y LS180, respectivamente, cuando las concentraciones de calix están cercanas a la CAC1. En definitiva,

en todos los calixarenos investigados, las micelas de estos macrociclos se pueden considerar nanotransportadores biocompatibles en casi la totalidad del intervalo de concentraciones de calix empleado.



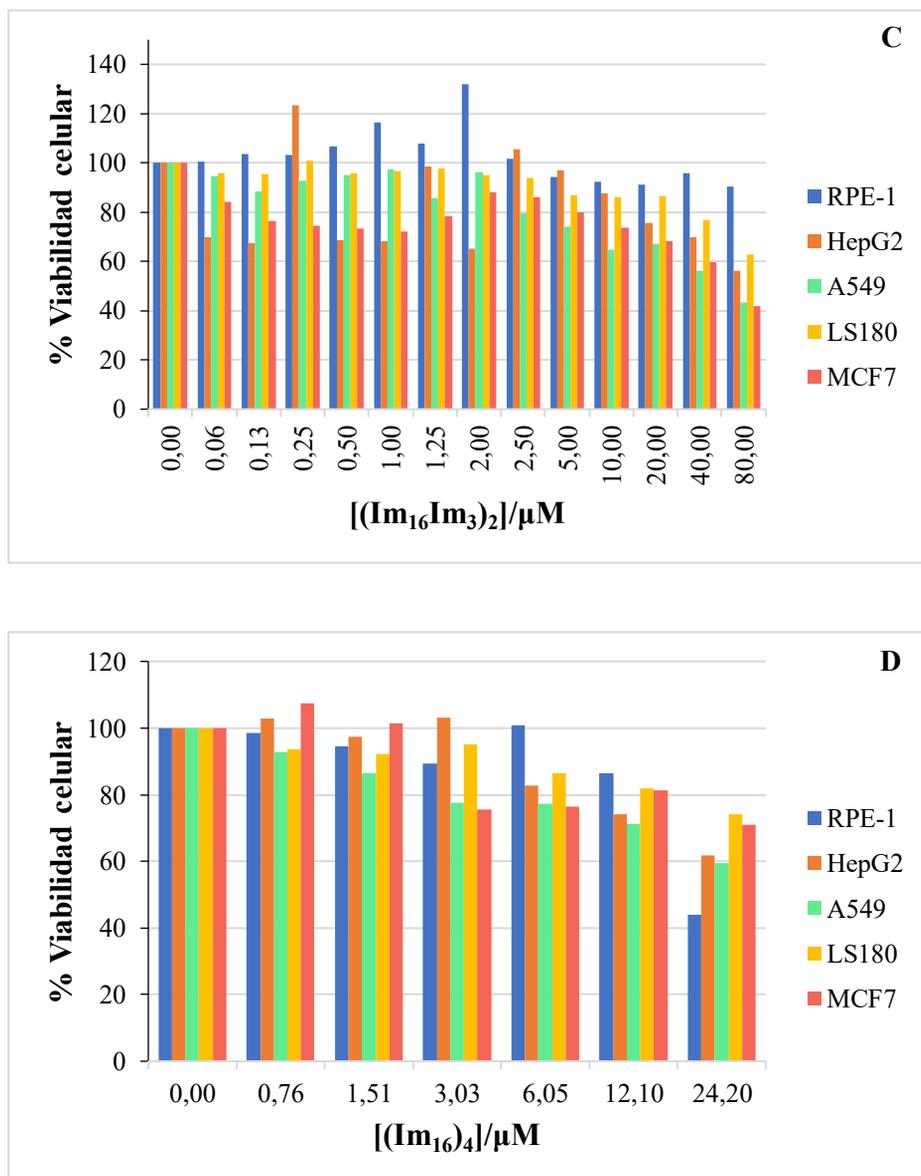


Figura 5.3. % de viabilidad en presencia de diferentes concentraciones de calixareno para diferentes líneas celulares durante un período de 96 h (A: TEAC₄, B: (Im₁₂)₄, C: (Im₁₆Im₃)₂, y D: (Im₁₆)₄).

Cuando las vesículas están presentes en las disoluciones, el comportamiento es diferente para cada calixareno. Cuando aumenta la concentración de TEAC₄, no se observa toxicidad, excepto para la línea HepG2 y, especialmente, para la línea LS180. Como la línea de células sanas no se ve afectada, este calixareno presenta cierto potencial como nanotransportador de fármacos antineoplásicos. (Im₁₂)₄ no es tóxico para ninguna de las líneas celulares investigadas, dentro del rango de concentración estudiado. Esto significa que sus agregados, tanto micelas como vesículas, pueden usarse como nanotransportadores biocompatibles. Sin embargo, las vesículas de (Im₁₆Im₃)₂ son sustancialmente más tóxicas para las líneas celulares cancerosas que para la línea celular normal. Por lo tanto, estas vesículas podrían usarse como nanotransportadores de agentes antitumorales. Finalmente, cuando aumenta la concentración de (Im₁₆)₄, sus vesículas son bastante tóxicas para todas las líneas, aunque un 90-70% de las células no se ven afectadas hasta una [calix]=12.1 μM.

Una vez que las disoluciones de calixareno han sido caracterizadas a diferentes concentraciones en función de los agregados presentes, se investigará la interacción de ADN de timo de ternera con las micelas y vesículas formadas por los siguientes macrociclos.

5.2.2 Estudio de las interacciones entre los agregados de calixareno y el ADN de timo de ternera

5.2.2.1 Interacción entre los calixarenos y el ADN de timo de ternera para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$

Antes de comenzar los experimentos, se comprobó mediante espectroscopía UV-visible la estabilidad de las disoluciones de calixareno/ctADN. No se observó turbidez en todo el intervalo de concentración de los diferentes calix estudiados.

Una forma sencilla de obtener información sobre las interacciones entre las micelas de calixareno y el ADN de timo de ternera es a través de ensayos competitivos en presencia de bromuro de etidio (EtBr). El bromuro de etidio es una sonda plana fluorescente que es capaz de unirse a la doble hélice del ADN mediante intercalación³⁰ y, como consecuencia, se produce un aumento en la intensidad de emisión de fluorescencia, en comparación con la que se muestra en un entorno más polar, como es la disolución acuosa.³¹ Por lo tanto, a partir de los cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia del EtBr, en una disolución que contiene ADN y EtBr, cuando las micelas de calixareno se agregan a la disolución, se puede obtener información sobre las interacciones entre las micelas y el ADN.

La *Figura 5.4* muestra la dependencia de I/I_0 de la relación molar X ($X = [\text{calix}]/[\text{ADN}]$) para los macrociclos investigados, donde I_0 e I son las intensidades de emisión de fluorescencia del EtBr en ausencia y en presencia de las micelas, respectivamente. Se ha preferido usar el parámetro X en lugar de la relación de carga Z^+/Z^- , porque este último es más adecuado cuando los monómeros y no los agregados son las especies que interaccionan con el polinucleótido. Se encontró el mismo comportamiento para todos los sistemas estudiados: una disminución sigmoideal de I/I_0 al aumentar la relación molar de X , hasta que la relación de I/I_0 alcanza un valor constante, independiente del valor de X . La línea horizontal de trazos representa el valor de I/I_0 mostrado

por el EtBr en una disolución de HEPES 10 mM pH=7.4, en ausencia de ADN. Estos resultados indican que las moléculas de EtBr son desplazadas hacia la disolución acuosa cuando se añaden micelas de calix al medio. Aunque, el porcentaje de moléculas de EtBr que se desplazan desde su sitio de intercalación en la doble hélice del ADN hacia la disolución acuosa, depende de la naturaleza del macrociclo empleado. Dado que la intercalación de las micelas de calixareno, o incluso de sus monómeros, entre los pares de bases del polinucleótido parece improbable, un cambio conformacional del ácido nucleico causado por sus interacciones con las micelas podría explicar estos resultados experimentales.

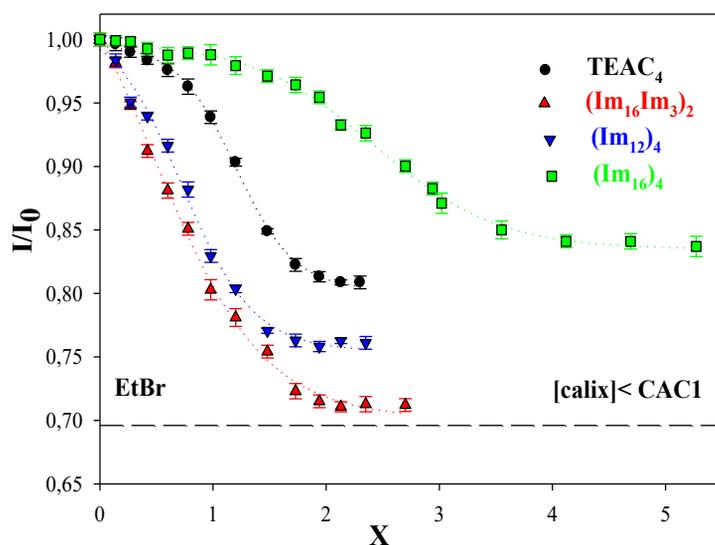


Figura 5.4. Representación gráfica de la relación de I/I_0 frente a la relación molar X , para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$. La línea horizontal discontinua representa el valor de I/I_0 mostrado por el EtBr en una disolución de HEPES 10 mM, en ausencia de ADN. $[\text{EtBr}] = 5.00 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ y $[\text{ADN}] = 5.00 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de X ($n = 3$).

La *Figura 5.4* muestra que la eficiencia de las micelas de calixareno para desplazar las moléculas de EtBr tiene la siguiente tendencia: $(\text{Im}_3\text{Im}_{16})_2 > (\text{Im}_{12})_4 > \text{TEAC}_4 > (\text{Im}_{16})_4$. Esta tendencia es difícil de explicar, especialmente por la falta de información sobre la concentración micelar crítica (CMC) y sobre el número de agregación micelar (N_{agg}). Ninguno de ellos pudo determinarse experimentalmente, debido a que las concentraciones de calixareno para las que los monómeros están presentes es tan baja, que no se observan señales de fluorescencia detectables. Además, no existe una correlación entre los tamaños de las micelas que se recogen en la *Tabla 5.2* y la tendencia experimental observada en la *Figura 5.4*. Con el fin de obtener más información sobre las interacciones entre las micelas de calixareno y el ADN, el potencial zeta (ζ), y el tamaño de los complejos micelas de calixareno/ADN fueron medidos.^{32,33}

La dependencia de la relación (ζ/ζ_0) de X se muestra en la *Figura 5.5*, donde ζ y ζ_0 son el potencial zeta de las disoluciones en presencia y en ausencia de micelas de calixareno, respectivamente. Los resultados indican que un incremento en la concentración de calix causa un aumento en el valor de ζ/ζ_0 . La *Figura* anterior muestra que la inversión de carga del polinucleótido se observa para el TEAC_4 , el $(\text{Im}_{16}\text{Im}_3)_2$ y el $(\text{Im}_{12})_4$, pero no para $(\text{Im}_{16})_4$. Además, en el caso del $(\text{Im}_{16}\text{Im}_3)_2$ y del $(\text{Im}_{12})_4$ se encuentra una inversión de carga completa. Como se ha demostrado en trabajos anteriores,^{33,34} la inversión de carga del ADN está estrechamente relacionada con su condensación y su compactación y está promovida por interacciones electrostáticas selectivas. Tanto un aumento de la entropía del sistema, debido a la liberación de contraiones Na^+ del ADN, como el mecanismo de fraccionamiento de carga sugerido por Shklovskii,³⁵ favorecen este proceso. Los resultados indican que el polinucleótido muestra una interacción fuerte con el $(\text{Im}_{16}\text{Im}_3)_2$ y el $(\text{Im}_{12})_4$, más débil con el TEAC_4 , aunque lo suficiente como para provocar la inversión de carga del ADN, y una interacción pobre con el $(\text{Im}_{16})_4$. El valor de X en el que ζ/ζ_0 es cero se corresponde con el valor

de electroneutralidad, donde el potencial zeta del complejo micelas de calixareno/ADN es cero. Este es igual a 0.95, 1.05 y 1.50 para el $(\text{Im}_{16}\text{Im}_3)_2$, el $(\text{Im}_{12})_4$ y el TEAC_4 , respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos a partir de los ensayos competitivos en presencia de EtBr.

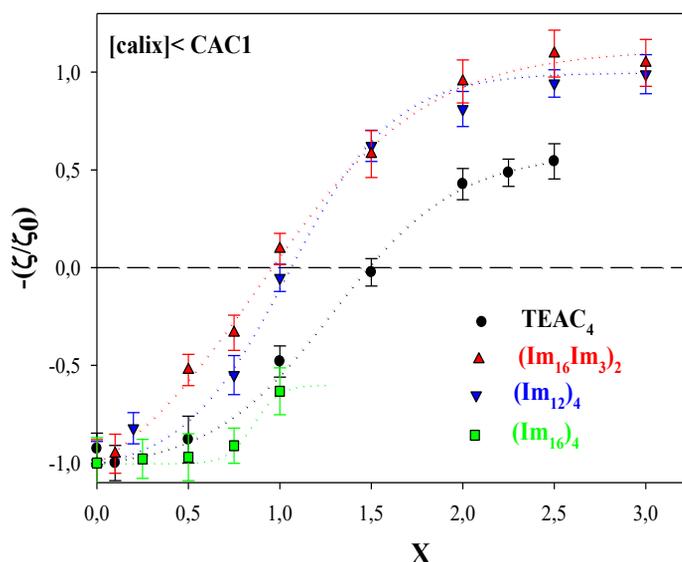


Figura 5.5. Dependencia del potencial zeta relativo (ζ/ζ_0) frente a la relación molar X, para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$. $[\text{ADN}] = 5.00 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de X ($n = 10$).

Los espectros de dicroísmo circular (DC) proporcionan información sobre los cambios conformacionales que sufren las moléculas de ADN cuando interactúan con otras especies.^{36,37} Sin embargo, para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$, la baja concentración de ADN presente en la disolución no permitió registrar espectros de DC que proporcionaran información fiable. Con el propósito de conocer los posibles cambios conformacionales que ocurren en las moléculas de ADN, cuando se forman los complejos micelas de calixareno/ADN, se realizaron medidas de dispersión de luz dinámica (DLS). Los datos se muestran en la Figura 5.6. En esta Figura se puede ver que el diámetro

hidrodinámico promedio (d) en ausencia de calix, es igual a 865 nm, resultado que está de acuerdo con resultados anteriores.³⁸ A valores bajos de X , se observa una distribución unimodal, con un valor de d similar al del ADN en su conformación extendida.³⁸ En el caso del $(Im_{16})_4$, el valor de d no varía prácticamente para todos los valores de X investigados, lo que indicaría que no ocurren cambios conformacionales sustanciales en el polinucleótido y estaría de acuerdo con la no observación de una inversión de carga para este calixareno. Para el $(Im_{16}Im_3)_2$ y el $(Im_{12})_4$, se observa una distribución bimodal al aumentar X , acompañada de una disminución del valor promedio del diámetro hidrodinámico, hasta alcanzar un cierto valor de X . A partir de ese valor, se observa una distribución unimodal, con un valor de d cercano a 145 nm, que es independiente de X . Estos resultados podrían explicarse si se considera que las micelas del $(Im_{16}Im_3)_2$ y del $(Im_{12})_4$ compactan el ADN, pasándolo de una conformación elongada a una de tipo globular, más pequeña. Otros autores obtuvieron valores de d similares a los encontrados en este trabajo para el ADN condensado.^{39,40} Se observa un comportamiento similar para el $TEAC_4$, pero en este caso el valor mínimo de d es cercano a 200 nm. Es decir, algo más grande que los encontrados para el $(Im_{16}Im_3)_2$ y el $(Im_{12})_4$. Esto puede deberse a una compactación parcial, o al menos no completa. Las medidas de DLS han demostrado que las micelas del $(Im_{16}Im_3)_2$, el $(Im_{12})_4$ y el $TEAC_4$ son capaces de provocar cambios conformacionales en el ADN.

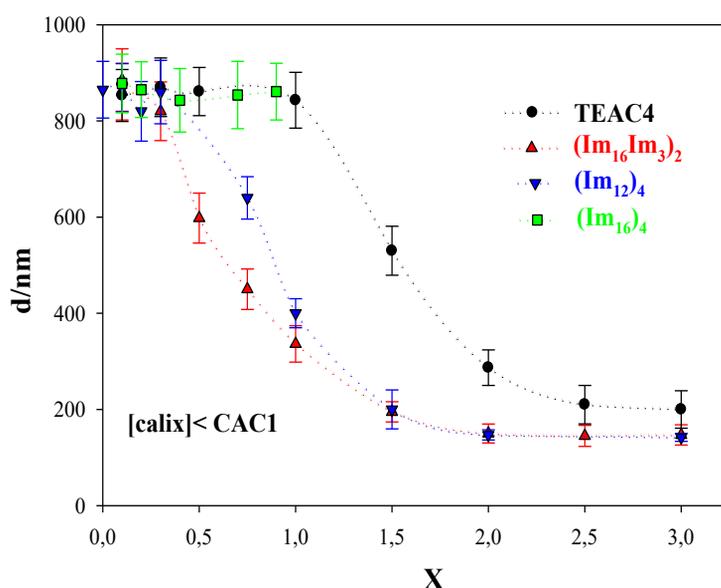


Figura 5.6. Dependencia del diámetro promedio (d) frente a la relación molar de X , para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$ $[\text{ADN}] = 5.00 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de X ($n = 10$).

Con el objetivo de visualizar la morfología de la estructura de los complejos micelas de calixareno/ADN, para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$, se llevaron a cabo experimentos de AFM. La Figura 5.7 muestra una imagen típica de la conformación totalmente extendida del ADN de timo de ternera en ausencia de micelas de calixarenos. La Figura 5.8 muestra los resultados obtenidos para las disoluciones de $(\text{Im}_{12})_4/\text{ADN}$, así como las imágenes de AFM obtenidas para los complejos TEAC_4/ADN , $(\text{Im}_{16}\text{Im}_3)_2/\text{ADN}$ y $(\text{Im}_{16})_4/\text{ADN}$. Las imágenes de AFM evidencian la efectividad de las micelas de TEAC_4 , de $(\text{Im}_{12})_4$ y de $(\text{Im}_{16}\text{Im}_3)_2$, para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$, para compactar las moléculas de ADN. En el caso del $(\text{Im}_{16})_4$, coexisten estructuras totalmente extendidas y globulares, ya que no se pudieron realizar experimentos a valores de X mayores debido a problemas de solubilidad, como ya se ha mencionado anteriormente.

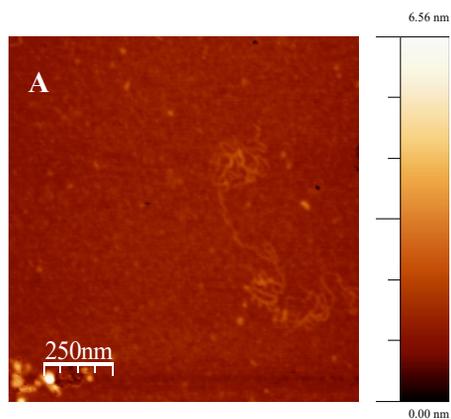


Figura 5.7. Imagen de AFM de ADN de timo de ternera en ausencia de liposomas ($[\text{ADN}] = 3.00 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$).

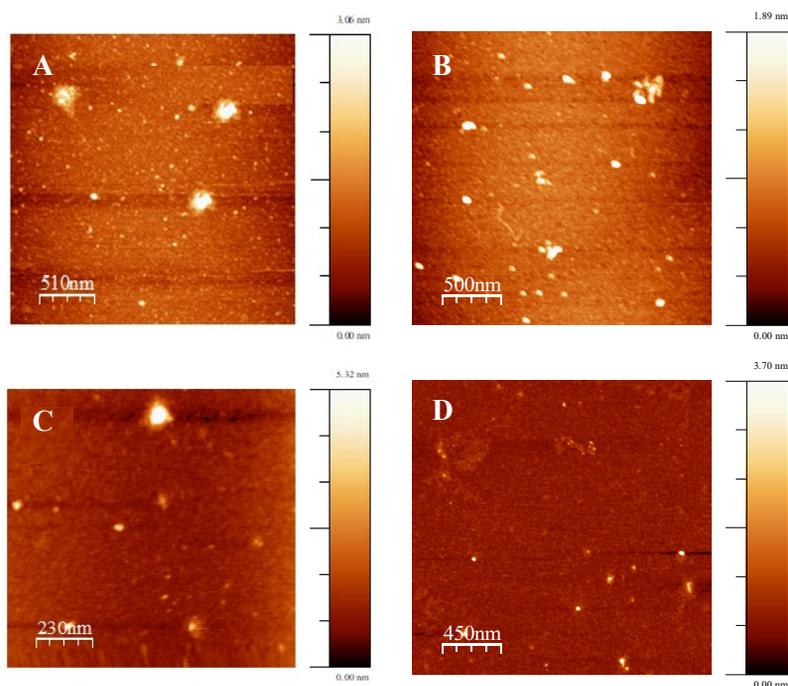


Figura 5.8. Imágenes topográficas de AFM de: A) TEAC4/ADN a $X = 1.50$, B) $(\text{Im}_{16}\text{Im}_3)_2/\text{ADN}$ a $X = 1.50$, C) $(\text{Im}_{12})_4/\text{ADN}$ a $X = 1.50$ y D) $(\text{Im}_{16})_4/\text{ADN}$ a $X = 0.9$, para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$.

5.2.2.2 Interacción entre los calixarenos y el ctDNA para [calix]>CAC1

Es importante resaltar que para [calix]>CAC1 existen diferentes agregados, dependiendo de la concentración de calix (ver *Tabla 5.2*). Se pueden encontrar monómeros, micelas y una distribución de vesículas, aunque la polidispersidad es mayor para el TEAC₄ que para el (Im₁₆Im₃)₂, el (Im₁₂)₄ y el (Im₁₆)₄.

Como en el caso de los estudios anteriormente realizados para [calix]<CAC1, antes de comenzar los experimentos, se usó espectroscopía UV-visible para verificar la estabilidad de las disoluciones de calixareno/ADN. No se observó turbidez en ninguno de los intervalos de concentración de calix estudiados.

La *Figura 5.9* muestra los resultados de los ensayos competitivos en presencia de EtBr obtenidos para los calixarenos investigados para [calix]>CAC1. Como en la *Figura 5.4*, se observa en todos los casos una disminución sigmoïdal de I/I_0 al aumentar X, hasta que la relación de I/I_0 alcanza un valor constante, independiente del valor de X. I_0 e I son las intensidades de emisión de fluorescencia del EtBr en ausencia y en presencia de los agregados de calixareno, respectivamente. La línea horizontal de trazos representa el valor de I/I_0 mostrado por el EtBr en una disolución de HEPES 10 mM pH= 7.4, en ausencia de ADN. En contraste con los resultados obtenidos para [calix]<CAC1, los agregados de calixareno desplazan completamente las moléculas de EtBr de su posición entre los pares de bases del ADN a la disolución acuosa, para todos los calixarenos investigados. Teniendo en cuenta que no se espera la intercalación de los monómeros, las micelas o las vesículas de calixareno entre los pares de bases del polinucleótido, un cambio conformacional del ADN causado por sus interacciones con los agregados de calixareno podría explicar estos resultados. Todos los macrociclos interaccionan fuertemente con el ADN y la afinidad de los agregados de

calixareno por el polinucleótido muestra la siguiente tendencia: $(Im_{12})_4 > TEAC_4 > (Im_{16}Im_3)_2 > (Im_{16})_4$. A partir de la comparación de los resultados obtenidos en la *Figura 5.4* y la *Figura 5.9*, se puede decir que las interacciones entre las vesículas de calixareno y el ADN son más fuertes que las que se producen entre las micelas de calixareno y el ADN.

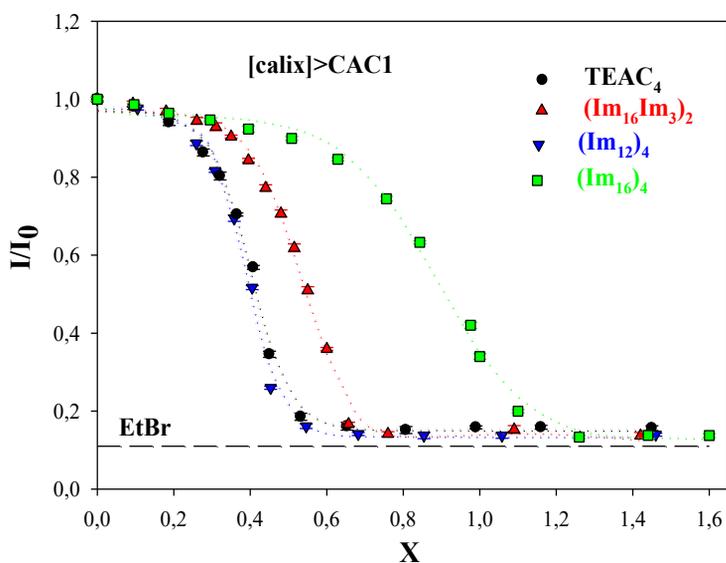


Figura 5.9. Representación gráfica de la relación de I/I_0 para la interacción del ADN con los agregados de calixareno, para $[calix] > CAC1$, en función de la relación molar X . La línea horizontal discontinua representa el valor de I/I_0 mostrado por el EtBr en una disolución de HEPES 10 mM, en ausencia de ADN ($[EtBr]=3.30 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $[ADN]=2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de X ($n=3$).

Teniendo en cuenta los datos que se muestran en la *Figura 5.9*, y considerando los resultados obtenidos para $[calix] < CAC1$, se esperaría una inversión de carga del ctADN para todos los calixarenos investigados, para $[calix] > CAC1$. La dependencia de la relación (ζ/ζ_0) frente a la relación molar

X, para $[\text{calix}] > \text{CAC1}$, se muestra en la *Figura 5.10*, donde ζ y ζ_0 tienen el mismo significado comentado anteriormente. Los resultados demuestran que un incremento en la concentración de calix provoca una inversión de carga del ADN, es decir, de valores negativos a positivos, como se esperaba. Solo en el caso del $(\text{Im}_{16})_4$, debido a problemas de solubilidad, no se pudieron realizar estos experimentos a concentraciones de calix más altas (en ausencia de EtBr, el $(\text{Im}_{16})_4$ es menos soluble en presencia de ADN). Sin embargo, se observa que para las disoluciones más concentradas de este calixareno, la carga del polinucleótido es neutralizada, por lo que cabría esperar que se produzca una inversión de carga a una mayor $[(\text{Im}_{16})_4]$. Los valores de X para los cuales se alcanza la electroneutralidad son iguales a 0.46 para el TEAC₄ y el $(\text{Im}_{12})_4$, y a 0.61 y 0.90 para el $(\text{Im}_{16}\text{Im}_3)_2$ y el $(\text{Im}_{16})_4$, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos competitivos en presencia de EtBr. La inversión de carga observada podría ser interpretada como un cambio conformacional del ADN desde un estado totalmente extendido a una forma compacta.

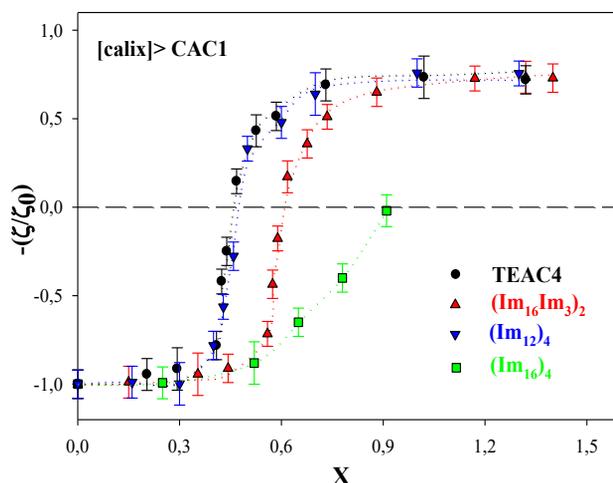


Figura 5.10. Dependencia del potencial zeta relativo (ζ/ζ_0) frente a la relación molar de X, para $[\text{calix}] > \text{CAC1}$ ($[\text{ADN}] = 2,00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de X ($n = 10$).

Con el objetivo de investigar los posibles cambios conformacionales en el ADN causados por sus interacciones con los agregados de calixareno, se realizaron experimentos de dicroísmo circular (DC). La *Figura 5.12* muestra los espectros de DC de disoluciones de calixareno/ADN obtenidos a diferentes valores de X, para $[\text{calix}] > \text{CAC1}$. Se comprobó que ni los monómeros, ni los agregados de calixareno, micelas y vesículas, contribuyen al espectro de dicroísmo circular. Estos espectros se registraron utilizando como referencia una disolución de HEPES 10 mM pH= 7.4. En la *Figura 5.12* el ADN en ausencia de calix presenta un espectro de DC característico de la forma B. Una banda positiva a aproximadamente 280 nm, debido al apilamiento entre las bases nitrogenadas del polinucleótido, y una banda negativa alrededor de 247 nm, como resultado de la supraestructura helicoidal del ADN.³⁶ Un aumento en la concentración de calix da como resultado un desplazamiento de las bandas a longitudes de onda mayores y una disminución gradual en la intensidad de la banda positiva, para todos los sistemas investigados. Estas variaciones se atribuyen, generalmente, a la neutralización de las cargas negativas del polinucleótido,⁴² debido a sus interacciones electrostáticas con especies catiónicas. Los resultados de DC muestran también un aumento en la elipticidad molar de la banda negativa, que junto con el desplazamiento de las bandas hacia longitudes de onda mayores y la disminución de la intensidad de la banda positiva, se relaciona con la formación de fases del ADN altamente condensadas,^{43,44} así como con una apertura parcial de la doble cadena del ADN.⁴⁵ Por lo tanto, las variaciones observadas se podrían atribuir a cambios, al menos parciales, en la conformación del polinucleótido que conducirían a la aparición de estructuras globulares. Los espectros de DC no sufren cambios significativos a valores de X mayores. La *Figura 5.12B*, muestra el espectro de DC para X=4, que correspondería al intervalo $[\text{calix}] > \text{CAC2}$. Se eligió el $(\text{Im}_{12})_4$ porque no presenta problemas de solubilidad a altos valores de X.

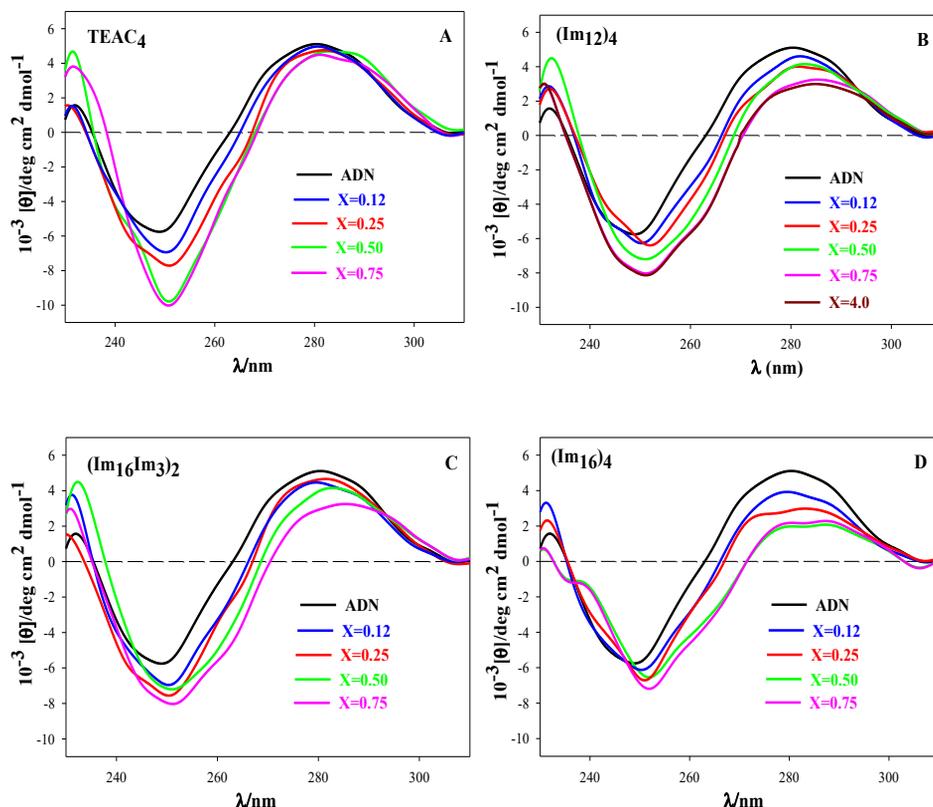


Figura 5.12. Espectros de dicroísmo circular de disoluciones calixarenos/ADN, para $[\text{calix}] > \text{CAC1}$ ($2.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). A: TEAC₄; B: (Im₁₂)₄; C: (Im₁₆Im₃)₂; y D: (Im₁₆)₄.

Debido a la complejidad de estos sistemas, no pudo ser estudiado el diámetro hidrodinámico de estos agregados mediante dispersión de luz dinámica (DLS).

Con el objetivo de visualizar la morfología de los agregados de calixareno/ADN para $[\text{calix}] > \text{CAC1}$, se realizaron medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM). Debido a que la concentración de ADN es mayor que la utilizada para el intervalo $[\text{calix}] < \text{CAC1}$, se encontraron muchos problemas

de solubilidad para estudiar los sistemas mediante esta técnica. Los sistemas más adecuados para realizar estos estudios resultaron ser las disoluciones de $(\text{Im}_{12})_4/\text{ADN}$, por ello en la *Figura 5.13* sólo aparecen las imágenes de AFM correspondientes a estos sistemas. Como puede verse, se observa una compactación parcial del ADN, coexistiendo moléculas de polinucleótido en forma alargada y otras en forma globular. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en las medidas de dicroísmo circular.

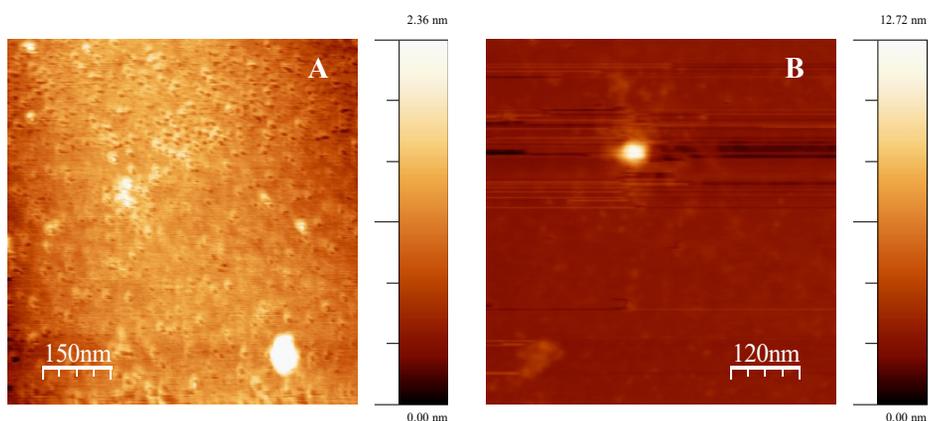


Figura 5.13. Imágenes topográficas de AFM de los complejos de $(\text{Im}_{12})_4/\text{ADN}$: A) $X= 3.00$ y B) $X= 9.00$, para $[\text{calix}] > \text{CAC1}$.

5.2.3. Encapsulación y liberación de la doxorubicina, DOX, en agregados de calixareno

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y el número cada vez mayor de investigaciones científicas confirma que existe una necesidad creciente de mejorar su tratamiento. La doxorubicina, DOX, es un antibiótico que fue aprobado con fines quimioterapéuticos en Estados Unidos en 1974.⁴⁶ Se trata de un medicamento de amplio espectro en el tratamiento de tumores, que a menudo es utilizado solo, o en combinación con otros fármacos. Sin embargo, su efecto secundario más importante es la cardiotoxicidad, que puede llegar incluso a provocar la muerte. Otros efectos adversos relacionados con su uso son diarrea, alopecia, mielosupresión, y decoloración de la orina. Cuando el propósito que se persigue es disminuir sus efectos secundarios y aumentar su tiempo de vida media en el organismo, la nanotecnología se convierte en una herramienta indispensable.

Los nanotransportadores de tamaños entre 10 y 400 nm son capaces de encapsular y liberar de manera eficiente numerosos fármacos.^{27,47} Por ejemplo, es bien conocido que la encapsulación de medicamentos en nanoestructuras tales como las micelas y las vesículas, ha resultado en un importante aumento de la solubilidad de fármacos hidrofóbicos, en una mayor biodisponibilidad y en excelentes resultados terapéuticos, todo ello acompañado de una disminución de los efectos secundarios.⁴⁸⁻⁵⁰ Teniendo en cuenta esta idea, la encapsulación de la DOX en los agregados de calix, y su posterior liberación, han sido estudiados en este trabajo de investigación, en todo el intervalo de concentraciones de calix empleado en las medidas de TEM, mediante el método de diálisis. En la *Figura 5.14* y la *Figura 5.15* se muestra la variación de la concentración de DOX frente al tiempo, obtenida a partir de medidas de absorbancia, en el proceso de diálisis a 4 °C, para los diferentes agregados de calixareno investigados. El procedimiento de diálisis empleado se describió detalladamente en el apartado 2.2.14 del capítulo 2 de esta memoria. Estos resultados experimentales permiten obtener la eficiencia de

encapsulación (% EE) de los agregados de calix, que se recogen en la *Tabla 5.3*. En el caso de las micelas, se obtuvo un % EE dentro del intervalo 80-60 %, dependiendo de la naturaleza del macrociclo empleado. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores.^{27,51} En este caso no se observa una correlación entre el % EE y el tamaño de los agregados (ver *Tabla 5.2*). Sin embargo, cuando se produce un incremento de la concentración de calix ($[\text{calix}] > \text{CAC1}$), que va acompañado de un aumento del tamaño de las vesículas, se observa un aumento del % EE. Este valor oscila entre un 90 % y un 70 %, dependiendo de la naturaleza del calixareno. Estos resultados suponen una mejora en la eficiencia de encapsulación de la DOX con respecto a las obtenidas por otros autores,^{52,53} por lo que formulaciones basadas en las vesículas de calixarenos se convierten en potenciales candidatos para transportar moléculas de DOX hacia células tumorales.

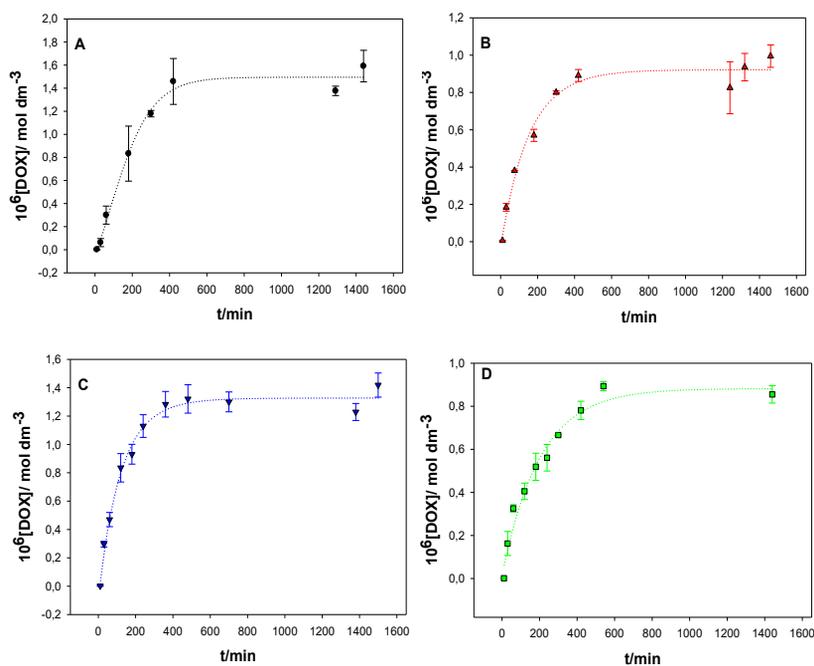
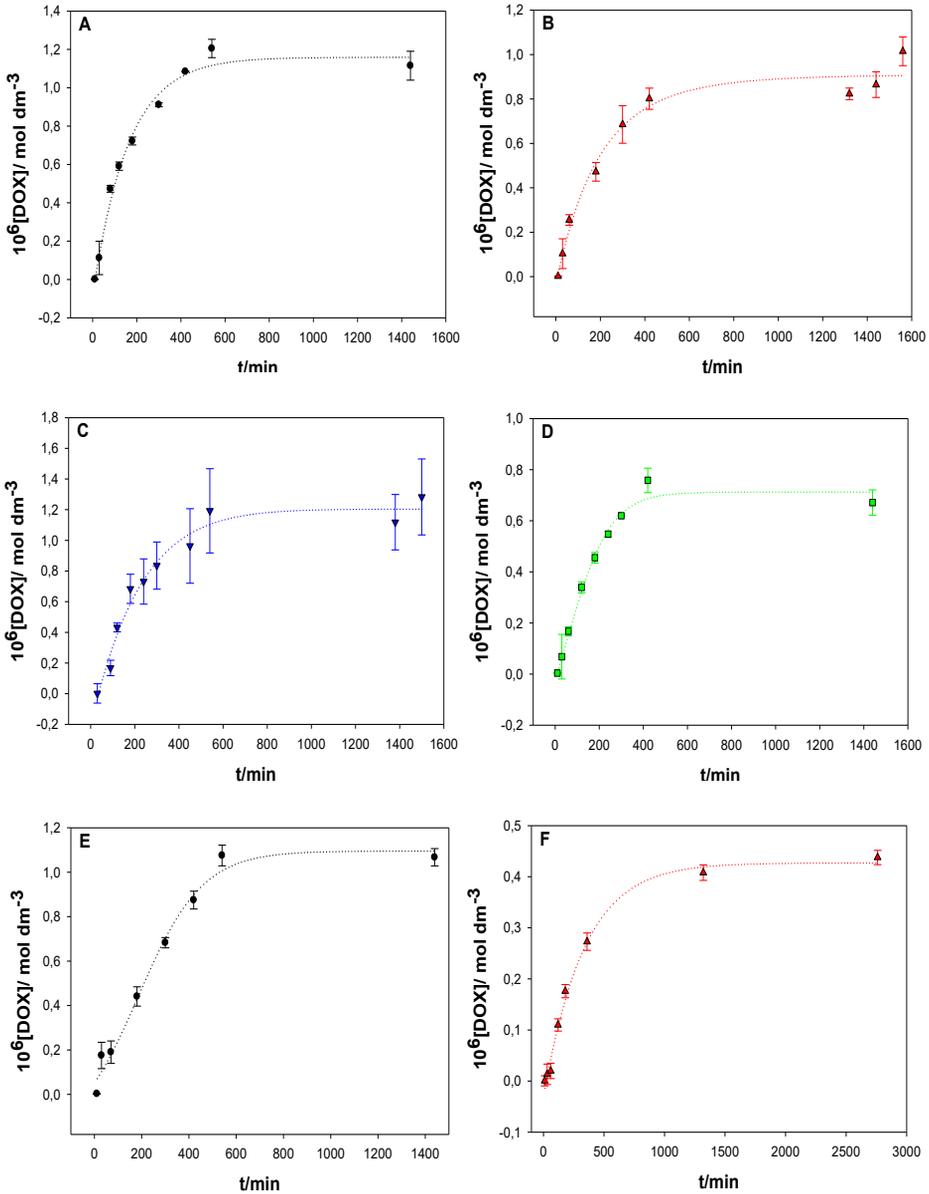


Figura 5.14. Concentración de DOX obtenida en diferentes momentos del proceso de diálisis a 4°C , para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$. A: TEAC₄; B: (Im₁₆Im₃)₂; C:

(Im₁₂)₄; y D: (Im₁₆)₄. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de t (n= 3).



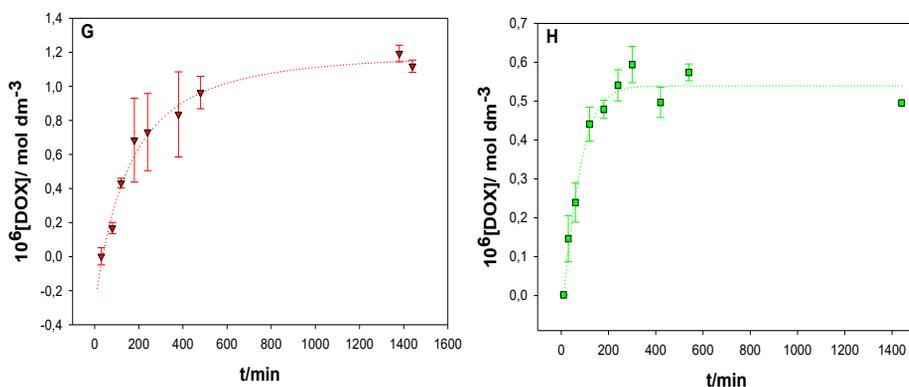


Figura 5.15. Concentración de DOX obtenida en diferentes momentos del proceso de diálisis, para [calix]>CAC1. A y E: TEAC4; B y F: (Im₁₆Im₃)₂; C y G: (Im₁₂)₄; y D y H:(Im₁₆)₄. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de t (n= 3).

Tabla 5.3. Valores medios de la eficiencia de encapsulación (% EE) de la DOX para los agregados de calixareno, en todo el rango de concentraciones de calix estudiados en este capítulo (n= 3).

Calixareno	% EE		
	[calix]<CAC1	CAC1<[calix]<CAC2	[calix]>CAC2
TEAC ₄	67±2	75.3±0.2	78±1
(Im ₁₆ Im ₃) ₂	79±1	81±2	92.0±0.5
(Im ₁₂) ₄	59±5	75±5	78±2
(Im ₁₆) ₄	81±1	84.4±0.8	87.8±1.4

Antes de comenzar el estudio de la liberación de la DOX encapsulada en los agregados de calixareno a 37 °C, se comprobó la estabilidad de la DOX

libre a esta temperatura. Teniendo en cuenta que una disolución de DOX es estable durante un 1 mes a 4 °C,⁵⁴ es de esperar que al aumentar la temperatura disminuya su estabilidad con el tiempo. Como puede verse en la *Figura 5.16*, la estabilidad de la DOX se ve afectada sustancialmente por la temperatura. Su tiempo de vida a 37°C es de aproximadamente 5 días. Este parámetro ha sido estimado mediante un ajuste a un proceso cinético de pseudo-primer orden. Teniendo en cuenta este parámetro, se llevaron a cabo experimentos para estudiar la liberación de la DOX de los agregados de calixareno, para [calix]<CAC1. Es decir, donde solo están presentes las micelas. No se pudieron realizar estos experimentos a concentraciones más elevadas de calix debido a los problemas de estabilidad que presentan las vesículas de calix a 37°C.

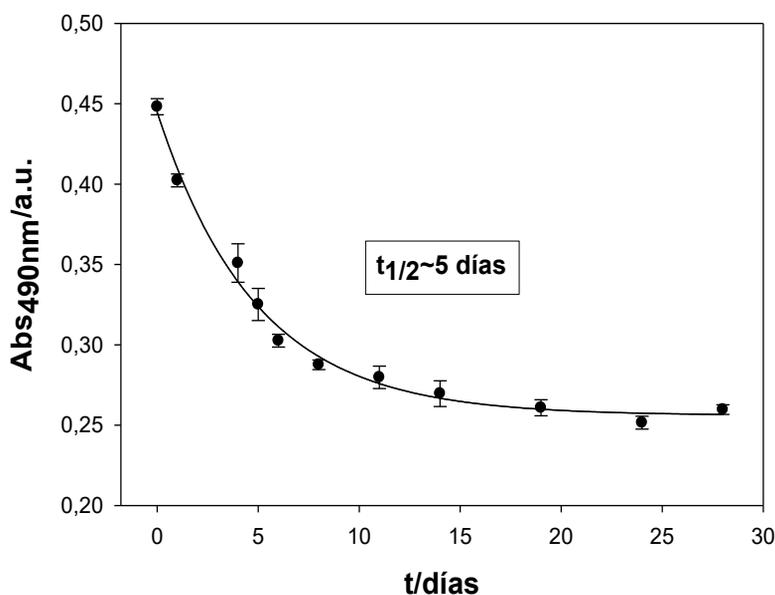


Figura 5.16. Estabilidad de la DOX a 37 °C en una disolución de HEPES 10 mM. La línea sólida se corresponde con un ajuste a un proceso cinético de pseudo-primer orden. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de t (n= 3).

La *Figura 5.17* muestra que para todos los macrociclos investigados el comportamiento es el mismo, obteniéndose un valor promedio de la constante de pseudo primer orden, k , correspondiente el proceso de liberación de la DOX de aproximadamente $2.0 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. Por lo tanto, su tiempo de vida medio es de ~ 2.5 días, que es mayor que el tiempo de vida medio de la DOX libre en el organismo.⁵⁵ Esto supondría una mejora de la estabilidad de la DOX en el organismo y podría servir de base para el desarrollo de nuevas formulaciones en el mercado basadas en el uso de calixarenos.

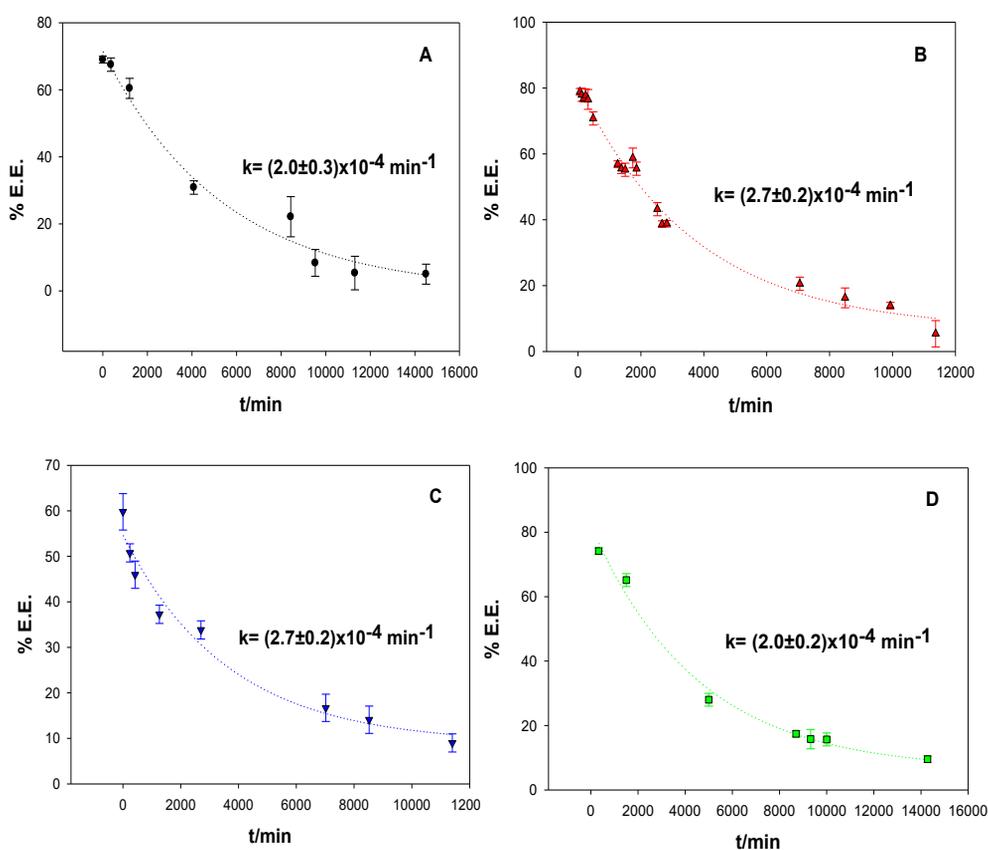


Figura 5.17. Liberación de DOX en agregados de calixareno para $[\text{calix}] < \text{CAC1}$ a 37°C (A: TEAC4, B: $(\text{Im}_{16}\text{Im}_3)_2$, C: $(\text{Im}_{12})_4$, y D: $(\text{Im}_{16})_4$). Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor de t ($n=3$).

5.3 Conclusiones

De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

Los calixarenos catiónicos anfifílicos TEAC₄, (Im₁₆Im₃)₂, (Im₁₂)₄ y (Im₁₆)₄ son capaces de autoagregarse en disoluciones acuosas, mostrando dos concentraciones de agregación crítica, CAC1 y CAC2. Para [calix]<CAC1, solo las micelas están presentes en las disoluciones. Para CAC1<[calix]<CAC2 se observa la existencia de micelas y de vesículas, y para [calix]>CAC2, en las disoluciones están presentes las micelas y una distribución de vesículas.

Los ensayos de citotoxicidad muestran que las micelas de calixareno, y buena parte de las vesículas, podrían usarse como nanotransportadores biocompatibles.

El estudio de las interacciones entre los agregados catiónicos de calixareno y el ADN de timo de ternera demuestra que la mayoría de los agregados de calix interaccionan con el polinucleótido, invirtiendo su carga y cambiando su conformación, en algunos casos parcialmente, desde una forma elongada a una estructura globular compacta. Por lo tanto, estos agregados, particularmente las micelas, se convierten en potenciales vectores para el transporte de material genético.

La doxorubicina se encapsuló en los agregados de calix, encontrándose una alta eficacia de encapsulación para las micelas y, especialmente, para las vesículas. Sin embargo, las vesículas de calixareno cargadas con DOX presentan una baja estabilidad a 37 °C, lo cual limita su aplicación en el transporte de fármacos. La liberación de la DOX de las micelas de calixareno muestra que podrían alargar la vida media de la doxorubicina en el organismo y, como resultado, podrían usarse menores cantidades de medicamento en los tratamientos contra el cáncer, disminuyendo así sus efectos secundarios.

5.4 Referencias bibliográficas

1. Driggers, E. M., Hale, S. P., Lee, J. & Terrett, N. K. The exploration of macrocycles for drug discovery - An underexploited structural class. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 608–624 (2008).
2. Mallinson, J. & Collins, I. Macrocycles in new drug discovery. *Future Med. Chem.* **4**, 1409–1438 (2012).
3. Marsault, E. & Peterson, M. L. Macrocycles are great cycles: Applications, opportunities, and challenges of synthetic macrocycles in drug discovery. *J. Med. Chem.* **54**, 1961–2004 (2011).
4. Joseph, R. & Rao, C. P. Ion and molecular recognition by lower rim 1,3-di-conjugates of calix[4]arene as receptors. *Chem. Rev.* **111**, 4658–4702 (2011).
5. Azzi, J., Jraj, A., Auezova, L., Fourmentin, S. & Greige-Gerges, H. Novel findings for quercetin encapsulation and preservation with cyclodextrins, liposomes, and drug-in-cyclodextrin-in-liposomes. *Food Hydrocoll.* **81**, 328–340 (2018).
6. Josić, D., Reutter, W. & Reusch, J. Crown ethers as ligands for high-performance liquid chromatography of proteins and nucleic acids. *J. Chromatogr. A* **476**, 309–318 (1989).
7. Li, X. *et al.* Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coord. Chem. Rev.* **379**, 147–160 (2019).
8. Böhmer, V. Calixarenes, Macrocycles with(Almost) Unlimited Possibilities. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **34**, 713–745 (1995).
9. Guo, D.-S. & Liu, Y. Supramolecular Chemistry of p -Sulfonatocalix[n]arenes and Its Biological Applications. *Acc. Chem. Res.* **47**, 1925–1934 (2014).
10. Rodik, R. V. *et al.* Virus-sized DNA nanoparticles for gene delivery based on micelles of cationic calixarenes. *Chem. - A Eur. J.* **17**, 5526–5538 (2011).
11. Pisagatti, I. *et al.* Novel PEGylated calix[5]arenes as carriers for Rose Bengal.

- Supramol. Chem.* **30**, 658–663 (2018).
12. Mo, J., Eggers, P. K., Yuan, Z., Raston, C. L. & Lim, L. Y. Paclitaxel-loaded phosphonated calixarene nanovesicles as a modular drug delivery platform. *Sci. Rep.* **6**, 23489 (2016).
 13. Wang, K., Guo, D. S., Wang, X. & Liu, Y. Multistimuli responsive supramolecular vesicles based on the recognition of p -sulfonatocalixarene and its controllable release of doxorubicin. *ACS Nano* **5**, 2880–2894 (2011).
 14. Vemula, V. R., Lagishetty, V. & Lingala, S. Solubility enhancement techniques. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **5**, 41–51 (2010).
 15. Tu, C. *et al.* Supramolecular polymeric micelles by the host-guest interaction of star-like calix[4]arene and chlorin e6 for photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **47**, 6063–6065 (2011).
 16. James, E. *et al.* Antioxidant phospholipid calix[4]arene mimics as micellular delivery systems. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 6108–6112 (2013).
 17. Qin, Z., Guo, D. S., Gao, X. N. & Liu, Y. Supra-amphiphilic aggregates formed by p-sulfonatocalix[4]arenes and the antipsychotic drug chlorpromazine. *Soft Matter* **10**, 2253–2263 (2014).
 18. Rodik, R. V., Anthony, A. S., Kalchenko, V. I., Mély, Y. & Klymchenko, A. S. Cationic amphiphilic calixarenes to compact DNA into small nanoparticles for gene delivery. *New J. Chem.* **39**, 1654–1664 (2015).
 19. Guo, D. S., Wang, K., Wang, Y. X. & Liu, Y. Cholinesterase-responsive supramolecular vesicle. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 10244–10250 (2012).
 20. Gualbert, J., Shahgaldian, P. & Coleman, A. W. Interactions of amphiphilic calix[4]arene-based Solid Lipid Nanoparticles with bovine serum albumin. *Int. J. Pharm.* **257**, 69–73 (2003).
 21. Mo, J. *et al.* Shear induced carboplatin binding within the cavity of a phospholipid mimic for increased anticancer efficacy. *Sci. Rep.* **5**, 10414 (2015).
 22. Harada, M. *et al.* Improved anti-tumor activity of stabilized anthracycline

- polymeric micelle formulation, NC-6300. *Cancer Sci.* **102**, 192–199 (2011).
23. Kordts, M., Kerth, A., Drescher, S., Ott, M. & Blume, A. The cmc-value of a bolalipid with two phosphocholine headgroups and a C24 alkyl chain: Unusual binding properties of fluorescence probes to bolalipid aggregates. *J. Colloid Interface Sci.* **501**, 294–303 (2017).
24. Palladino, P., Rossi, F. & Ragone, R. Effective critical micellar concentration of a zwitterionic detergent: A fluorimetric study on n-dodecyl phosphocholine. *J. Fluoresc.* **20**, 191–196 (2010).
25. Cornellas, A. *et al.* Self-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.* **355**, 164–171 (2011).
26. Moughton, A. O. & O'Reilly, R. K. Thermally induced micelle to vesicle morphology transition for a charged chain end diblock copolymer. *Chem. Commun.* **46**, 1091–1093 (2010).
27. Lebrón, J. A. *et al.* Preparation and characterization of metallomicelles of Ru(II). Cytotoxic activity and use as vector. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **175**, 116–125 (2019).
28. Fultz, B. & Howe, J. *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 2013).
29. R. Pecora. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *J. Nanoparticle Res.* **2**, 123–131 (2000).
30. Gabelica, V., De Pauw, E. & Rosu, F. Interaction between antitumor drugs and a double-stranded oligonucleotide studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **34**, 1328–1337 (1999).
31. Cosa, G., Focsaneanu, K.-S., McLean, J. R. N., McNamee, J. P. & Scaiano, J. C. Photophysical Properties of Fluorescent DNA-dyes Bound to Single- and Double-stranded DNA in Aqueous Buffered Solution¶. *Photochem. Photobiol.* **73**, 585 (2001).
32. López-López, M. *et al.* Importance of hydrophobic interactions in the single-

- chained cationic surfactant-DNA complexation. *J. Colloid Interface Sci.* **521**, (2018).
33. ZHAO, X., SHANG, Y., LIU, H., HU, Y. & JIANG, J. Interaction of DNA with Cationic Gemini Surfactant Trimethylene-1,3-bis (dodecyldimethylammonium bromide) and Anionic Surfactant SDS Mixed System. *Chinese J. Chem. Eng.* **16**, 923–928 (2008).
 34. Karlsson, L., Van Eijk, M. C. P. & Söderman, O. Compaction of DNA by gemini surfactants: Effects of surfactant architecture. *J. Colloid Interface Sci.* **252**, 290–296 (2002).
 35. Shklovskii, B. I. Screening of a macroion by multivalent ions: Correlation-induced inversion of charge. *Phys. Rev. E* **60**, 5802–5811 (1999).
 36. Berova, N., Nakanishi, K. & Woody, R. *Circular Dichroism. Principles and Applications (2nd Edition)*. (John Wiley & Sons, New York, 2000).
 37. Wang, L. *et al.* Versatile Self-Assembly and Biosensing Applications of DNA and Carbon Quantum Dots Coordinated Cerium Ions. *Chem. - A Eur. J.* **23**, 10413–10422 (2017).
 38. García, J. P., Marrón, E., Martín, V. I., Moyá, M. L. & Lopez-Cornejo, P. Conformational changes of DNA in the presence of 12-s-12 gemini surfactants (s=2 and 10). Role of the spacer's length in the interaction surfactant-polynucleotide. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **118**, 90–100 (2014).
 39. Dey, D., Maiti, C., Maiti, S. & Dhara, D. Interaction between calf thymus DNA and cationic bottle-brush copolymers: Equilibrium and stopped-flow kinetic studies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 2366–2377 (2015).
 40. Rodríguez-Pulido, A., Aicart, E., Llorca, O. & Junquera, E. Compaction process of calf thymus DNA by mixed cationic-zwitterionic liposomes: A physicochemical study. *J. Phys. Chem. B* **112**, 2187–2197 (2008).
 41. Secco, F. *et al.* Solvent effects on the kinetics of the interaction of 1-pyrenecarboxaldehyde with calf thymus DNA. *J. Phys. Chem. B* **114**, 4686–4691 (2010).

42. Pietralik, Z., Kumita, J. R., Dobson, C. M. & Kozak, M. The influence of novel gemini surfactants containing cycloalkyl side-chains on the structural phases of DNA in solution. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **131**, 83–92 (2015).
43. Bombelli, C. *et al.* Role of the spacer of cationic gemini amphiphiles in the condensation of DNA. *Langmuir* **21**, 10271–10274 (2005).
44. Simberg, D. *et al.* Phase behavior, DNA ordering, and size instability of cationic lipoplexes: Relevance to optimal transfection activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 47453–47459 (2001).
45. Rosa, M., Dias, R., da Graça Miguel, M. & Lindman, B. DNA–Cationic Surfactant Interactions Are Different for Double- and Single-Stranded DNA. *Biomacromolecules* **6**, 2164–2171 (2005).
46. Cortazar, P. *et al.* US Food and Drug Administration approval overview in metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **30**, 1705–1711 (2012).
47. Sarkar, K., Ahmed, S. & Dastidar, P. Self-Assembly of Spherical Organic Molecules to Form Hollow Vesicular Structures in Water for Encapsulation of an Anticancer Drug and Its Release. *Chem. - An Asian J.* **14**, 1992–1999 (2019).
48. Wan, X. *et al.* Co-delivery of paclitaxel and cisplatin in poly(2-oxazoline) polymeric micelles: Implications for drug loading, release, pharmacokinetics and outcome of ovarian and breast cancer treatments. *Biomaterials* **192**, 1–14 (2019).
49. Yang, X., Mao, W., Liu, Y., Li, L. & Ma, D. Supramolecular Vesicles Based on Water-Soluble 2,6-Helic[6]arene: High Affinity Binding, Stimuli Responsiveness and Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells. *Chinese J. Chem.* **37**, 575–580 (2019).
50. Wu, T., Qiao, Q., Qin, X., Zhang, D. & Zhang, Z. Immunostimulatory cytokine and doxorubicin co-loaded nanovesicles for cancer immunochemotherapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **18**, 66–77 (2019).

51. Deng, S. *et al.* Biodegradable polymeric micelle-encapsulated doxorubicin suppresses tumor metastasis by killing circulating tumor cells. *Nanoscale* **7**, 5270–5280 (2015).
52. Zhong, J. *et al.* Redox and pH responsive polymeric vesicles constructed from a water-soluble pillar[5]arene and a paraquat-containing block copolymer for rate-tunable controlled release. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **30**, 202–214 (2019).
53. Tian, Y. *et al.* A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* **35**, 2383–2390 (2014).
54. Nakamura, H. & Maeda, H. Cancer Chemotherapy. in *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience* 401–427 (Springer New York, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-9164-4_15
55. Rahman, A., Carmichael, D., Harris, M. & Roh, J. K. Comparative pharmacokinetics of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. *Cancer Res.* **46**, 2295–9 (1986).

CAPÍTULO 6. LIPOSOMAS DE
CALIX[4]ARENOS CATIONICOS
ANFIFÍLICOS. INTERACCIÓN CON
ADN

El concepto del sistema de administración de fármacos utilizando liposomas ha revolucionado el campo farmacéutico. A. Bangham, en 1961,¹ describió por primera vez los liposomas. Desde entonces, se han llevado a cabo multitud de investigaciones centradas en el uso de liposomas, y entre sus aplicaciones destacan la encapsulación y administración de genes, medicamentos y biomoléculas.² Los liposomas son vesículas esféricas caracterizadas por al menos una bicapa de lípidos con una cavidad acuosa interior. Los componentes estructurales de estas nanoestructuras son fosfolípidos o anfifilos sintéticos incorporados con esteroides, como el colesterol, que influyen en la permeabilidad de la membrana lipídica. La hidratación con película delgada o dispersión simple es el método de preparación de liposomas más utilizado, en el que los componentes lipídicos con o sin un medicamento, se disuelven en un disolvente orgánico. El disolvente se evapora por evaporación rotatoria, seguido por la rehidratación de la película con un disolvente acuoso. Otros métodos incluyen evaporación en fase inversa, liofilización e inyección de etanol.³ Además, se emplean técnicas como la extrusión a través de una membrana, la sonicación, la

homogeneización y/o la congelación y descongelación para controlar su tamaño y polidispersidad. Los liposomas pueden ser preparados modificando su tamaño, composición, carga y lamellaridad. Teniendo en cuenta sus características estructurales, una gran variedad de moléculas anfifílicas se han empleado para la preparación de estos nanotransportadores, favoreciendo la formación de vesículas en disolución acuosa.⁴⁻⁶

En particular, los calixarenos con carácter anfifílico se pueden utilizar en la preparación de liposomas. Poseen una cavidad hidrofóbica en su interior que permite el transporte de pequeñas moléculas. Debido a estas características, estas moléculas son idóneas para el transporte de material genético y/o fármacos. Los calixarenos anfifílicos con residuos catiónicos se han utilizado previamente como agentes de transfección, en presencia o ausencia de un lípido auxiliar,^{7,8} debido a su capacidad para formar complejos con el ADN a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Esto posibilita la formación del complejo liposoma/ADN, denominado lipoplejo. Normalmente, la bicapa lipídica de los liposomas está constituida por un lípido catiónico y un lípido auxiliar, por ejemplo, el 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o el 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), que proporciona estabilidad a la membrana lipídica.

M. Mochizuki y colaboradores⁸ estudiaron la eficiencia de transfección de liposomas con calixarenos incorporados en su capa lipídica con respecto a la longitud de la cadena alquílica de estos. Se observó que la longitud de la cadena está relacionada con la interacción de los liposomas con el endosoma y con la liberación del material genético. Existe una longitud óptima que muestra una alta eficiencia de transfección. Con respecto a esto, los lipoplejos formados con calixarenos que tenían cadenas hidrofóbicas de seis átomos de carbono, C6, mostraron la mayor eficiencia de transfección entre todos los lipoplejos estudiados, cuyas longitudes de cadena alquílica se situaban en el intervalo entre C3 y C15. Estos lipoplejos C6 se mantuvieron estables a pH= 7.0, pero liberaron el ADN como respuesta a un cambio de pH

de 7.0 a 5.0. Por tanto, la formación de lipoplejos con cadenas alquílicas excesivamente largas o cortas, no es adecuada para dar una respuesta a un cambio de pH, lo que resulta en una baja expresión de los genes.

Se ha encontrado que la capacidad de los lipoplejos resultantes para interactuar con membranas biológicas puede correlacionarse con el rendimiento de transfección del ADN plasmídico (pADN) y modularse variando la proporción de DOPE. A. Barrán-Berdón y colaboradores⁷ realizaron un amplio estudio, utilizando liposomas compuestos de un calixareno tetracatiónico (TMAC4) y un lípido auxiliar DOPE, en el que investigaron los liposomas obtenidos mediante medidas de potencial zeta, electroforesis en gel de agarosa, dispersión de rayos X de ángulo reducido (SAXS), crio-TEM, AFM, microscopía de fluorescencia y citotoxicidad. Se encontraron varias poblaciones de liposomas organizadas en estructuras multilamelares L_{α} en presencia de pADN. Cuando el ADN plasmídico se encuentra unido, parece hacer que la bicapa lipídica sea más deformable, mejorando así la capacidad de penetrar en las células.

Los esfuerzos no sólo se han centrado en mejorar los procesos de transfección en presencia de formulaciones liposomiales basadas en calixarenos. Entre otras posibles aplicaciones de estos macrociclos se encuentran el transporte de fármacos⁹ y aniones, reconocimiento de proteínas y/o agentes de contraste para posibles diagnósticos de enfermedades, etc. E. Drakalska y colaboradores⁹ estudiaron formulaciones liposomiales híbridas que contenían un complejo de inclusión formado por un polioxietilen-terbutilcalix[4]areno (BECX) y curcumina. Este último es un fármaco con extraordinarias propiedades terapéuticas como agente quimiopreventivo, antineoplásico y quimiosensibilizante, pero que presenta como desventajas una baja solubilidad acuosa, así como inestabilidad química y farmacocinética. Estos autores consiguieron mejorar la solubilidad de este medicamento en presencia de estas formulaciones liposomiales, así como también aumentaron

su efecto antineoplásico en ensayos de citotoxicidad y apoptosis celular en diferentes líneas tumorales humanas con respecto al fármaco libre.

Muchos de los procesos biológicos de reconocimiento y adhesión, como son la comunicación entre células, las infecciones bacterianas o virales y la progresión y dirección de un tumor, están mediados por la interacción de glicolípidos y glicoproteínas con proteínas específicas denominadas lectinas. Teniendo en cuenta esta idea, S. Aleandri y colaboradores¹⁰ prepararon liposomas con un nuevo glucocalixareno bolaanfílico y DOPC, resultando en una interacción específica con la proteína Concanavalin A. Estos resultados representan una nueva estrategia en la preparación de sistemas de administración de fármacos potencialmente capaces de dirigirse a lectinas específicas.

No sólo se pueden transportar fármacos en este tipo de nanoestructuras, sino también aniones a través de las bicapas lipídicas. Esto ha despertado un creciente interés en los últimos años, debido a su importancia para comprender los procesos de transporte biológicos y a su potencial aplicación tecnológica y biomédica. S. Licen y colaboradores¹¹ demostraron una alta selectividad de liposomas basados en un conjugado guanídínico de calixareno (4G4Oct) hacia el ion cloruro. Estos estudios complementan la capacidad observada para este macrociclo de condensar ADN plasmídico y transfectar células,¹² lo que demuestra que este receptor también puede transportar iones cloruro de manera eficiente a través de una bicapa de fosfolípidos.

Otro campo explorado es el tratamiento y diagnóstico de enfermedades. Daniel T. Schühle y colaboradores¹³ sintetizaron un calixareno anfílico que incorpora ligandos quelados de Gd (III) y prepararon los correspondientes liposomas. Estas nanoestructuras presentaron una alta estabilidad cinética, lo que permite su uso como agentes de contraste, así como el transporte de fármacos en el interior de su cavidad.

Este capítulo se centra en el estudio del empleo de liposomas catiónicos como vectores no virales en el transporte de material genético. Los liposomas empleados son unilamelares y están constituidos por un lípido catiónico, un calixareno funcionalizado, y un lípido auxiliar, el DOPE. Los calixarenos empleados pueden verse en el *Esquema 2.6* del capítulo 2. El lípido auxiliar el DOPE, como puede observarse en el *Esquema 2.2* del capítulo 2, es una especie zwitteriónica que presenta una carga global cero a pH fisiológico.

Además de preparar estos liposomas catiónicos, se han caracterizado estructural y fisicoquímicamente y se ha profundizado en el estudio de la formación de los complejos liposoma/ADN (lipoplejos), con el objetivo de establecer una relación entre las características del macrociclo incorporado en la estructura del liposoma y la condensación de moléculas de ADN. Finalmente, se ha evaluado la viabilidad celular de estas nanoestructuras para conocer la toxicidad que ejercen sobre células normales y cancerosas.

6.1 Parte experimental

Todas las medidas experimentales fueron realizadas a una temperatura de 298.15 ± 0.15 K y a pH fijo, utilizando una disolución tampón ([HEPES]= 10 mM, pH= 7.4).

6.1.1 Preparación de los lipoplejos

La preparación de los complejos liposoma/ADN (lipoplejos) requiere una serie de pasos y definir distintas magnitudes,¹⁴ que se detallarán a continuación. Es necesario esperar un cierto período de tiempo en cada paso.

6.1.1.1 Formación de la bicapa (membrana) lipídica

En primer lugar, se pesan las cantidades necesarias de calixareno y de DOPE, las cuales se disuelven por separado en 2 mL de cloroformo o en una mezcla 1:1 AcOEt/EtOH (sólo para el $(\text{Im}_{16})_4$), que se agitan durante unos segundos en un vórtex a 1200 rpm. Las cantidades de calixareno y de DOPE son las necesarias para obtener la bicapa lipídica de una cierta composición, que es definida por la fracción molar de lípido catiónico (α):

$$\alpha = \frac{\left(\frac{L^+}{M_L^+}\right)}{\left[\left(\frac{L^+}{M_L^+}\right) + \left(\frac{L^0}{M_L^0}\right)\right]} \quad (6.1)$$

donde L^+ y L^0 son las masas del lípido catiónico y neutro, respectivamente, y M_L^+ y M_L^0 son las masas molares de estos.

Una vez disueltos ambos componentes de la membrana, se pipetea 400 μL de cada disolución en un mismo eppendorf y se somete a ultrasonidos durante 2 minutos para homogeneizar la disolución. Este proceso permite preparar 4 membranas lipídicas para su posterior caracterización.

A continuación, se colocan cada uno de los eppendorf abiertos en una centrifugadora evaporadora durante 50 minutos, en modo V-HV (de alta presión de vapor para líquidos volátiles), para así obtener la membrana lipídica y evaporar el disolvente orgánico. Transcurrido ese tiempo, se observa una fina película incolora en las paredes del eppendorf, que se corresponde con la membrana lipídica. Es importante mantener la membrana lipídica durante un mínimo de 24 horas en una cámara frigorífica a -80°C , antes de proceder a la hidratación. Además, este último paso permite la conservación de las membranas lipídicas, debido a que impide fenómenos de hidrólisis y de oxidación de los fosfolípidos¹⁴ durante un período de tiempo prolongado.

6.1.1.2 Hidratación de la membrana lipídica

Con el objetivo de preparar los liposomas, se procede a la hidratación de las membranas lipídicas preparadas con anterioridad. Para ello, se añaden 2 mL de una disolución tampón de HEPES 10 mM ($\text{pH} = 7.4$) a la membrana lipídica y se realizan 10 ciclos, 3 minutos de vortex/2 minutos de ultrasonidos por cada ciclo. Transcurridos estos 50 minutos, el eppendorf se somete a agitación en un vortex (1200 rpm) durante 2 horas para favorecer la correcta hidratación y formación de los liposomas.

En este punto, los liposomas obtenidos son multilamelares y con una distribución de tamaño muy heterogénea, por tanto, se someten a un nuevo procedimiento, la extrusión, para conseguir liposomas unilamelares y de tamaño homogéneo, consiguiendo así reducir su polidispersidad. Para ello, se

emplea un extrusor manual de Avanti Polar Lipids (*Figura 6.1*). Con esta técnica, se obliga a los liposomas a pasar a través de una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm, también de la misma marca comercial. Este proceso es repetido 10 veces para asegurar la obtención de liposomas unilamelares.



Figura 6.1. Imagen del extrusor de Avanti Polar Lipids empleado en esta tesis.

Una vez finalizada la extrusión, la muestra se conserva en el frigorífico a una temperatura de aproximadamente 4° C durante 24 horas para conseguir una completa estabilización del sistema.

6.1.1.3 Preparación de los lipoplejos

La definición de la relación de masas, L/D permite obtener diferentes composiciones del complejo liposoma/ADN (lipoplejo). En especial, es importante conocer la relación de $(L/D)_\phi$ de electroneutralidad, donde se equilibran las cargas positivas y negativas ($Z_{\text{eff}} = 1$), ya que así se puede conocer el valor óptimo de carga neta del lipoplejo para emplearlo como agente potencial de transfección en células.¹⁵ Estos parámetros son definidos mediante las siguientes ecuaciones:

$$\left(\frac{L}{D}\right)_\phi = \left(\frac{L^+ + L^0}{D}\right)_\phi \quad (6.2)$$

$$Z_{\text{eff}} = \frac{n_+}{n_-} = \left(\frac{q_{L^+}^+}{q_{\text{ADN}}^-} \right) \times \left(\frac{\left(\frac{L^+}{M_L^+} \right)}{\left(\frac{D}{M_{\text{bp}}} \right)} \right) \quad (6.3)$$

Cuando $Z_{\text{eff}} = 1$, la masa de ADN (D) puede expresarse como:

$$D = \left(\frac{q_{L^+}^+}{q_{\text{ADN}}^-} \right) \times \left(\frac{\left(\frac{L^+}{M_L^+} \right)}{\left(\frac{1}{M_{\text{bp}}} \right)} \right) \quad (6.4)$$

Cuando se introduce la ec. 6.4 en la ec. 6.2 se obtiene la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} \left(\frac{L}{D} \right)_{\phi} &= \frac{(L^+ + L^0)}{\left(\frac{q_{L^+}^+}{q_{\text{ADN}}^-} \right) \times \left(\frac{\left(\frac{L^+}{M_L^+} \right)}{\left(\frac{1}{M_{\text{bp}}} \right)} \right)} = \frac{q_{\text{ADN}}^-}{q_{L^+}^+} \times \frac{M_L^+}{M_{\text{bp}}} \times \left(\frac{L^+ + L^0}{L^+} \right) = \\ &= \frac{q_{\text{ADN}}^-}{q_{L^+}^+} \times \frac{M_L^+}{M_{\text{bp}}} \times \frac{(n^+ M_L^+ + n^0 M_L^0)}{n^+ M_L^+} \end{aligned} \quad (6.5)$$

Después de multiplicar por $[(n^+ + n^0)/(n^+ + n^0)]$, e introducir el parámetro de fracción de lípido catiónico (α), se obtiene finalmente la expresión que relaciona la relación de masas $(L/D)_{\phi}$ y α (ec. 6.1):

$$\begin{aligned} \left(\frac{L}{D} \right)_{\phi} &= \frac{q_{\text{ADN}}^-}{q_{L^+}^+} \times \frac{M_L^+}{M_{\text{bp}}} \times \frac{(n^+ M_L^+ + n^0 M_L^0)}{(n^+ + n^0)} \times \frac{1}{\frac{n^+}{(n^+ + n^0)}} = \\ &= \frac{q_{\text{ADN}}^-}{q_{L^+}^+} \times \frac{M_L^+}{M_{\text{bp}}} \times \frac{\alpha M_L^+ + (1-\alpha) M_L^0}{\alpha} \end{aligned} \quad (6.6)$$

donde L^+ , L^0 , M_L^+ y M_L^0 tienen el significado indicado anteriormente. D es la masa de ADN (1.00×10^{-4} g), n^+ y n^- son el número de moles de cargas positivas y negativas, provenientes del lípido catiónico y del ADN, $q_{L^+}^+$ y q_{DNA}^- son las cargas del lípido catiónico y de los pares de bases del ADN. Hay que destacar que en estos sistemas se hace una aproximación para las cargas de cada uno de los componentes, $q_{L^+}^+ = 4^+$ y $q_{\text{DNA}}^- = 2^-$. M_{bp} es la masa molar promedio por par de bases de ADN. Esta relación puede ser estimada a partir de esta expresión, así como también experimentalmente.

En la *Tabla 6.1* se recogen los valores de $(L/D)_\phi$, para $Z_{\text{eff}}= 1$, para cada uno de los sistemas estudiados en este capítulo, según el valor de α . En base a estos resultados, se estudiaron valores de L/D por debajo y por encima del punto de electroneutralidad para cada composición. Por tanto, estas experiencias se realizaron a concentración variable de liposoma y concentración constante de ADN ($[ADN]=1.00\times 10^{-4}$ g/mL, 1.62×10^{-4} mol dm⁻³). Se realizaron medidas de las disoluciones que contenían los liposomas en ausencia y en presencia del ADN. De esta forma se lleva a cabo una exhaustiva caracterización del sistema, no sólo de los lipoplejos formados, sino también del liposoma. La *Tabla 6.1* muestra que a medida que aumenta la fracción molar α , disminuye el valor de L/D correspondiente a la neutralidad. Esto se debe a que para valores de α mayores, aumenta la concentración del calixareno, y por lo tanto, la carga negativa del ADN se neutraliza antes. Este método de trabajo permitirá demostrar la concordancia entre los valores estimados, utilizando la ec. 6.6, y los valores experimentales, como se verá más adelante.

Tabla 6.1. Valores de $(L/D)_\phi$, estimados teóricamente para cada uno de los diferentes sistemas estudiados, según el valor de α .

α	$(L/D)_{\phi, \text{est}}$			
	TEAC4	(Im ₁₂) ₄	(Im ₁₆ Im ₃) ₂	(Im ₁₆) ₄
0.1	-	-	6.62	6.91
0.2	3.78	3.72	3.61	3.90
0.3	2.78	2.72	2.60	2.90
0.4	2.28	2.21	2.10	-
0.45	2.11	2.05	-	-
0.5	1.97	1.91	1.80	-

Hay que destacar que es importante el orden de adicción de cada una de las especies implicadas para la formación de los lipoplejos, dado que se

pueden evitar problemas de solubilidad en el sistema. Por tanto, la secuencia a realizar es la siguiente:

- Añadir el volumen de ADN correspondiente para obtener una concentración de 1.00×10^{-4} g/mL en un eppendorf.
- Posteriormente, se añade el volumen necesario de una disolución tampón de HEPES 10 mM (pH= 7.4), y se agita la disolución.
- Finalmente, se añade el volumen de liposoma correspondiente para cada valor de L/D, que se desee estudiar.

De esta forma, sólo precipitaron aquellos valores de L/D cercanos a la electroneutralidad.

6.1.2 Potencial zeta (ζ)

La determinación de esta propiedad fue realizada a una concentración variable de liposoma y a una concentración de ADN fija ($[ADN]=1.00 \times 10^{-4}$ g/mL, 1.62×10^{-4} mol dm⁻³), con el objetivo de obtener la relación de masas de L/D apropiada para caracterizar el sistema. Estas experiencias fueron realizadas siguiendo las pautas indicadas en la sección 2.2.4 del capítulo 2.

6.1.3 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

El diámetro hidrodinámico de las partículas de estos sistemas fue obtenido en las mismas condiciones y con el mismo equipo que las medidas de potencial zeta.

6.1.4 Dicroísmo circular (DC)

Los espectros fueron registrados desde 220 a 320 nm dentro de la región intrínseca del ADN. Estos espectros fueron obtenidos a una concentración variable de liposoma y a una concentración de ADN fija ($[\text{ADN}] = 1.00 \times 10^{-4}$ g/mL, 1.62×10^{-4} mol dm⁻³). Todas las medidas fueron expresadas en términos de elipticidad molar, según la ec. 2.1. del capítulo 2.

6.1.5 Electroforesis en gel de agarosa

Estas experiencias fueron realizadas siguiendo las pautas que se encuentran detalladas en la sección 2.2.12 del capítulo 2, a una concentración de ADN fija de 1.00×10^{-4} g/mL, para los lipoplejos y liposomas estudiados en este trabajo.

6.1.6 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

Con el objetivo de caracterizar la morfología de los sistemas, fue necesario emplear un rango de concentraciones de 100-200 µg/mL de lípido total. Imágenes de TEM de los liposomas y de los lipoplejos fueron obtenidas mediante el protocolo especificado en la sección 2.2.11 del capítulo 2.

6.1.7 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Con el propósito de obtener imágenes de moléculas aisladas de ADN, fue necesario utilizar disoluciones diluidas del polinucleótido (3.00×10^{-7} mol dm⁻³

³) debido al gran tamaño de estas moléculas. Imágenes de AFM de los complejos liposoma/ADN fueron obtenidas mediante el protocolo que se encuentra detallado en la sección 2.2.10 del capítulo 2.

6.1.8 Ensayos *in vitro* de citotoxicidad (Ensayo MTT)

La evaluación de la citotoxicidad de los liposomas estudiados ha sido realizada en un período de 24 h para diferentes líneas celulares (A549, MCF7, LS180, HepG2 y RPE-1), mediante el protocolo especificado en la sección 2.2.13 del capítulo 2, con el objetivo de evaluar la viabilidad celular en presencia de los distintos liposomas investigados.

6.2 Resultados y discusión

En primer lugar, fue realizada una caracterización de los liposomas preparados, que contenían, como se ha indicado anteriormente en este capítulo, un lípido catiónico multivalente, basado en el uso de un calixareno, y un lípido auxiliar, el DOPE. La dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica empleada para obtener información acerca de la distribución de tamaños en disoluciones acuosas de vesículas y liposomas.¹⁶ Por ello, las disoluciones liposomiales investigadas fueron caracterizadas mediante este tipo de medidas. Los diferentes valores del diámetro hidrodinámico de los sistemas estudiados con respecto a la composición (α), se muestran en la *Figura 6.2*. Como puede observarse, la variación de las diferentes formulaciones liposomiales es bastante similar. Inicialmente, se produce una disminución del tamaño al aumentar la concentración del calix en los liposomas, hasta un determinado valor de α . A partir de ese valor de α , se observa de nuevo un aumento del tamaño. Este comportamiento puede explicarse en base a las interacciones existentes en la formación de estas nanoestructuras. Las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de calix favorecerán una disminución del tamaño. Sin embargo, las interacciones electrostáticas repulsivas entre las cabezas polares de los macrociclos provocan un aumento del tamaño. Como ya se mencionó anteriormente, un aumento del parámetro α implica un aumento de la cantidad del calix con respecto a la composición de lípidos total. Teniendo esto en cuenta, a valores bajos de α , parece que las interacciones hidrofóbicas prevalecen frente a las interacciones electrostáticas repulsivas de las cabezas polares de los macrociclos y, en consecuencia, se produce una disminución de los tamaños de los liposomas. Cuando α sigue aumentando, llega un momento en que la contribución de las interacciones electrostáticas será mayor que la de las hidrofóbicas y, como resultado, se observará un aumento del tamaño de los liposomas. El valor mínimo del

tamaño se corresponderá a una situación de equilibrio entre ambas interacciones.

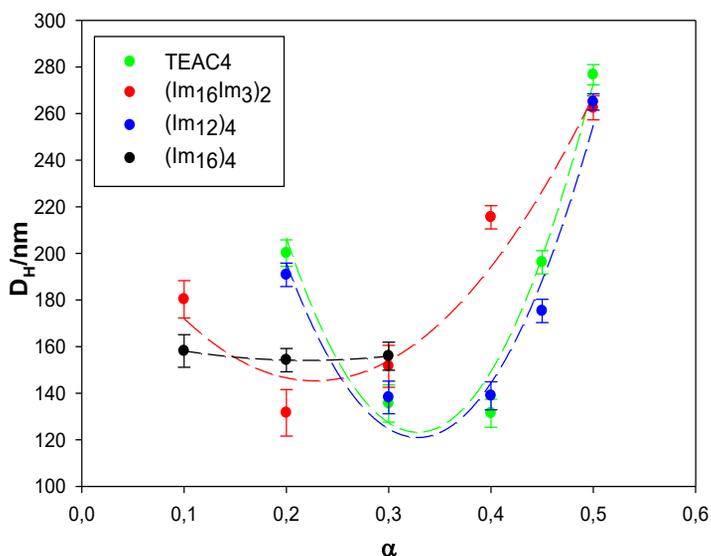


Figura 6.2. Representación de la dependencia del tamaño de los liposomas de la fracción molar α para cada uno de los sistemas estudiados. Las barras de errores representan la desviación estándar para cada valor valor de α ($n=10$).

El razonamiento expuesto anteriormente también permitiría explicar los valores de α para los que se observa el tamaño mínimo, que se encuentran experimentalmente para los calix cuando varía la longitud de las cadenas alquílicas. Se esperaría que las interacciones hidrofóbicas fueran más fuertes para el (Im₁₂)₄ y TEAC₄ (ambos con la misma longitud de cadena alquílica), que para el (Im₁₆Im₃)₂. Por ello, el valor esperado de α , para el que se encuentre un valor mínimo de tamaño, sería mayor para los dos calix con cadenas de doce átomos de C que para el (Im₁₆Im₃)₂, como de hecho se observa. Puede verse que la naturaleza del grupo polar no influye en estos valores de α , dado que el (Im₁₂)₄ y el TEAC₄ presentan prácticamente el mismo valor. Hay que decir que la carga positiva del grupo imidazolinio y del

amonio cuaternario es para ambos carga +1. Siguiendo el mismo razonamiento, el valor de α correspondiente al mínimo tamaño debería ser mayor para el $(Im_{16})_4$. Sin embargo los datos experimentales no están de acuerdo con lo esperado. En este caso hay que resaltar que los problemas de solubilidad no permitieron el estudio de un rango mayor de valores de α . Por otro lado, la posibilidad de que las cadenas de 16 átomos de C pudieran doblarse sobre sí mismas supondría un coste energético que disminuiría la contribución favorable de las interacciones hidrofóbicas, y esto podría explicar que la preponderancia de las interacciones electrostáticas se diera a valores de α más bajos.

El resto de las formulaciones liposomiales fueron estudiadas hasta un valor máximo de $\alpha= 0.5$, ya que para valores de α más grandes los sistemas presentaban una alta polidispersidad. Como se indicó anteriormente, los liposomas del calix $(Im_{16})_4$ fueron preparados en una mezcla 1:1 AcOEt/EtOH. Se comprobó que el uso de esta mezcla de disolventes orgánicos, en lugar de cloroformo puro, no influía en la distribución de tamaño del resto de liposomas en las mismas condiciones de preparación.

Para determinar la relación óptima L/D de las preparaciones liposomiales para su uso en transfección génica, se llevaron a cabo medidas de potencial zeta (ζ). Esta técnica nos da información acerca de la carga neta superficial de los complejos liposoma/ADN (lipoplejos),¹⁷ por lo que se convierte en una herramienta indispensable para evaluar este tipo de sistemas. Esta investigación es crucial puesto que es necesario preparar lipoplejos con una cierta carga positiva que permita a estos vectores atravesar la membrana celular, negativamente cargada. No interesa que su carga sea muy positiva porque, en general, esto supone un aumento de la citotoxicidad de los vectores. Como puede verse en la *Figura 6.3*, se observó un comportamiento sigmoidal y una inversión de carga del ADN en todos los sistemas estudiados. Se observa que a valores bajos de L/D, los lipoplejos poseen una carga neta negativa, ya que predomina la carga del ADN frente a la del calix catiónico.

Sin embargo, una vez alcanzado el $(L/D)_\phi$, la carga del calix presente en el lipoplejo es capaz de neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfato del polinucleótido, resultando finalmente en una carga neta positiva a valores más altos de L/D . Además, a partir de estos datos se puede determinar experimentalmente el valor del $(L/D)_\phi$ y compararlo con los valores estimados de $(L/D)_\phi$ utilizando la ec. 6.6 y que se recogen en la *Tabla 6.1*. Los valores de $(L/D)_\phi$ experimentales se recogen en la *Tabla 6.2* y puede verse que existe una buena concordancia entre los valores teóricos y los experimentales, si se consideran los errores experimentales. Además, puede haber diferencias debido a que los valores de teóricos de las cargas de los macrociclos catiónicos puedan diferir de los valores reales de sus cargas en disolución.

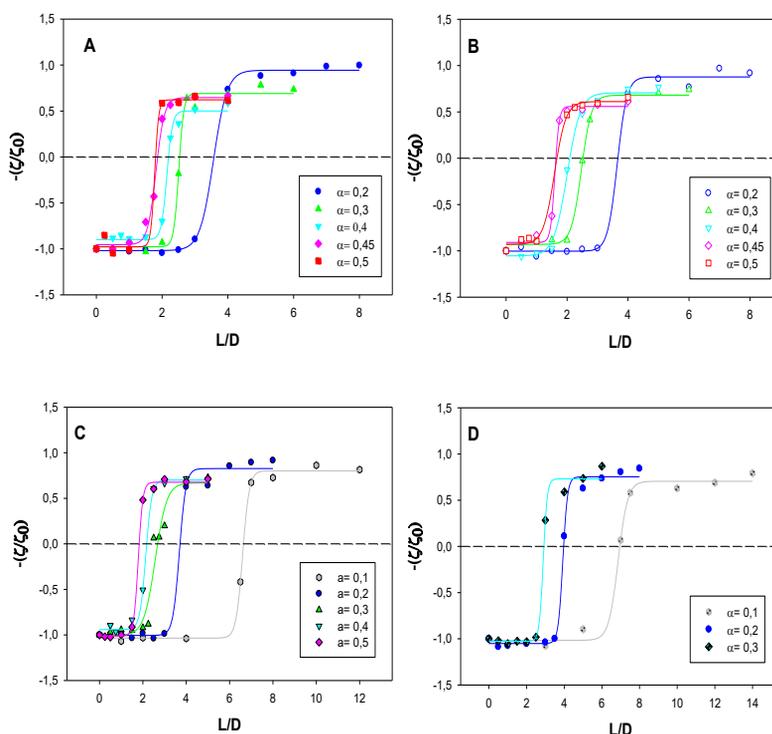


Figura 6.3. Comparación de los valores de potencial zeta relativos $-(\zeta/\zeta_0)$ de los lipoplejos a valores crecientes de L/D para liposomas con distinta fracción molar α (A: TEAC₄, B: (Im₁₂)₄, C: (Im₁₆Im₃)₂ y D: (Im₁₆)₄).

Tabla 6.2. Valores de $(L/D)_\phi$ experimentales obtenidos para los diferentes α , a partir de medidas de potencial zeta, para los diferentes sistemas estudiados.

α	$(L/D)_{\phi,exp}$			
	TEAC ₄	(Im ₁₂) ₄	(Im ₁₆ Im ₃) ₂	(Im ₁₆) ₄
0.1	-	-	6.60	6.86
0.2	3.56	3.64	3.67	3.93
0.3	2.50	2.47	2.57	2.89
0.4	2.14	2.01	2.14	-
0.45	1.81	1.61	-	-
0.5	1.77	1.59	1.79	-

Otra propiedad importante es el diámetro hidrodinámico de los lipoplejos, que influye en la eficacia de los procesos de transfección. Estudios recientes indican que existe un rango de tamaño particular para la captación celular.¹⁸ Aunque la captación celular depende de las células y las vías de captación, el tamaño de partícula adecuado se considera normalmente que es de unos pocos cientos de nanómetros. Teniendo esto en cuenta, el tamaño de los lipoplejos se determinó mediante medidas de DLS. En la *Figura 6.4* se muestran los resultados obtenidos. Se observó en todos los casos una dependencia del diámetro hidrodinámico de la relación de masas de L/D de tipo gaussiano. Este comportamiento puede explicarse si se considera que tanto a valores bajos de L/D como a valores altos, los lipoplejos están cargados negativa y positivamente, respectivamente. Por tanto, no se esperaría la formación de agregados, ya que sistemas con la misma carga se repelen entre sí, resultando en una distribución estable del tamaño. Sin embargo, cuando se alcanza un valor de L/D cercano al $(L/D)_\phi$, se produce un aumento del tamaño como consecuencia de fenómenos de agregación, debido a una disminución de las repulsiones electrostáticas entre los lipoplejos. No se ha observado ninguna correlación entre el tamaño para el $(L/D)_\phi$ y la fracción de lípido catiónico (α). En la *Tabla 6.3* se recogen los valores experimentales de $(L/D)_\phi$. Estos

resultados están de acuerdo con los valores de $(L/D)_\phi$ estimados teóricamente (Tabla 6.1), así como con los valores obtenidos experimentalmente mediante medidas de potencial zeta (Tabla 6.2).

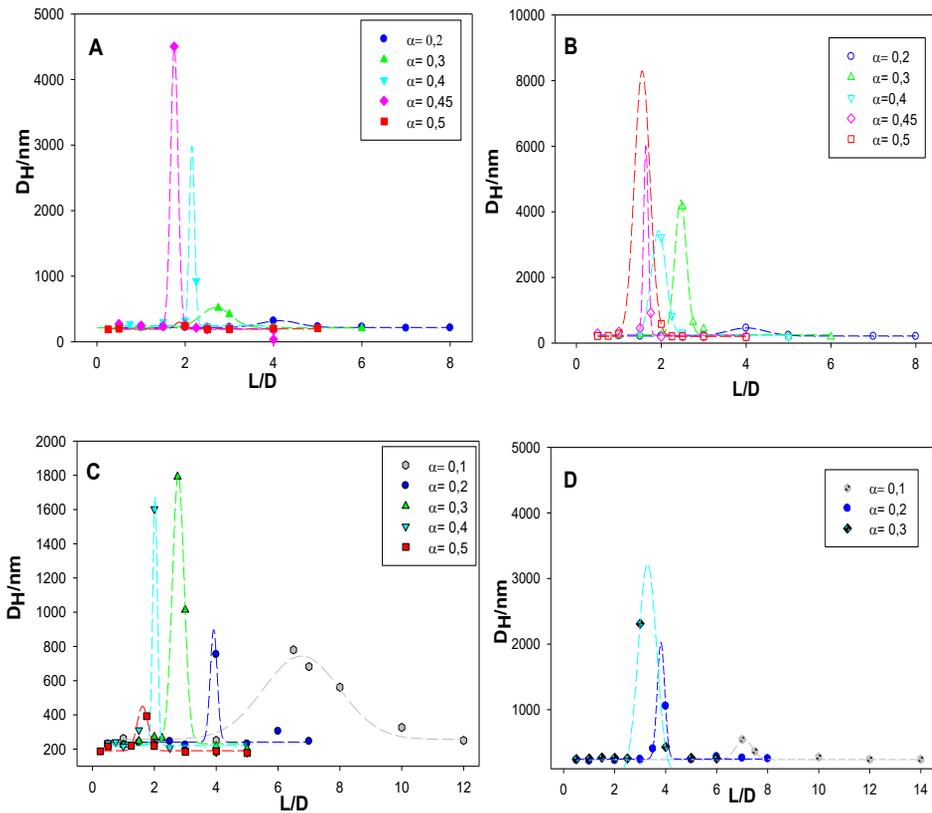


Figura 6.4. Comparación de los valores de diámetro hidrodinámico (R_H) de los lipoplejos a valores crecientes de L/D para liposomas con distinta fracción molar α (A: TEAC₄, B: (Im₁₂)₄, C: (Im₁₆Im₃)₂ y D: (Im₁₆)₄).

Tabla 6.3. Valores de $(L/D)_\phi$ experimentales obtenidos a partir de medidas de DLS para cada uno de los diferentes sistemas estudiados, según el valor de α .

α	$(L/D)_{\phi,exp}$			
	TEAC ₄	(Im ₁₂) ₄	(Im ₁₆ Im ₃) ₂	(Im ₁₆) ₄
0.1	-	-	6.76	7.07
0.2	4.12	4.01	3.92	3.81
0.3	2.69	2.46	2.77	2.88
0.4	2.15	1.94	1.83	-
0.45	1.78	1.64	-	-
0.5	1.87	1.55	1.78	-

En la *Figura 6.5* se muestra la concordancia existente entre los valores experimentales correspondientes a las medidas de potencial zeta (ζ) y de dispersión de luz dinámica (DLS), para cada formulación liposomal (calixareno/DOPE) estudiada a $\alpha=0,2$.

Con el propósito de obtener más información acerca de los diferentes cambios conformacionales que sufre el ADN en presencia de los liposomas investigados, se realizaron medidas de dicroísmo circular. Todos los espectros se realizaron utilizando como referencia una disolución de HEPES 10 mM a pH= 7.4 y se comprobó previamente que los liposomas estudiados en ausencia de ADN no presentaban espectro de DC. Como se ha mencionado anteriormente, el ADN en disolución acuosa adopta una conformación en forma B dextrógira, que muestra un espectro de DC característico en la región ultravioleta cercana (220–320 nm). El espectro muestra una banda positiva a aproximadamente 278 nm y una banda negativa a 247 nm.

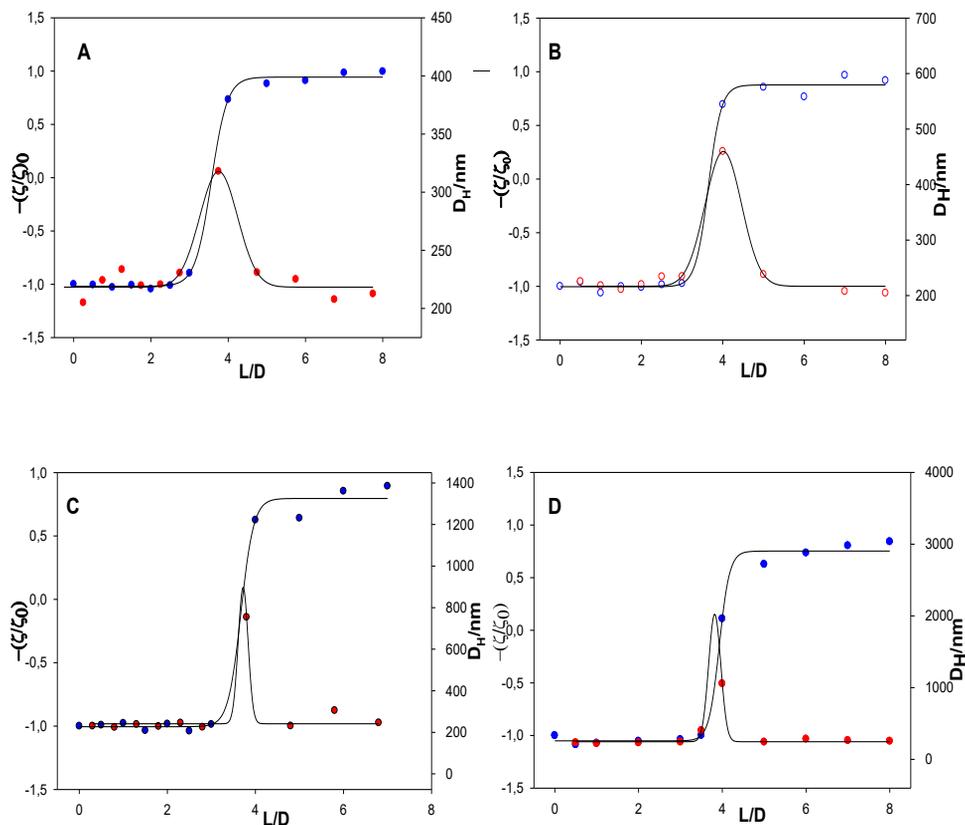


Figura 6.5. Comparación de los resultados entre las medidas de potencial zeta y DLS para un valor de $\alpha= 0,2$ (A: TEAC₄, B: (Im₁₂)₄, C: (Im₁₆Im₃)₂ y D: (Im₁₆)₄).

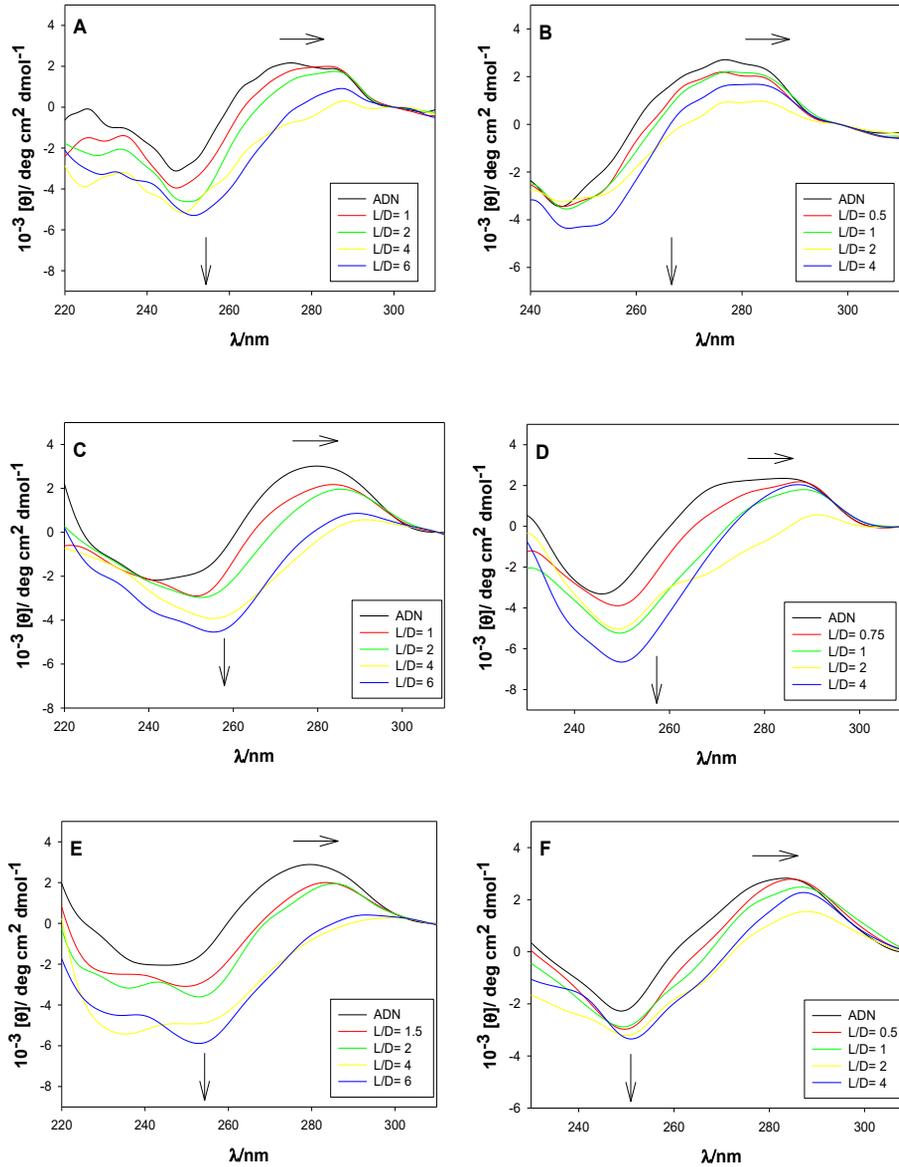
Se observó, para todas las formulaciones estudiadas (Figura 6.6), una disminución de intensidad de la banda positiva cuando aumenta L/D y un incremento de la intensidad de la banda negativa al aumentar la relación L/D. Los liposomas constituidos por (Im₁₆)₄/DOPE no pudieron ser estudiados a valores de α mayores por problemas de solubilidad, lo que limita su comparación con el resto de los sistemas estudiados. Los cambios provocados en la banda positiva podrían ser explicados en base a la fuerte atracción electrostática entre los grupos fosfato del ADN y los calixarenos positivamente cargados presentes en los liposomas. Estas interacciones podrían causar la apertura de la doble hebra del polinucleótido y cambios

conformacionales en el mismo. Dado que un valor mayor de α supone un mayor contenido de calixareno en los liposomas, la disminución, e incluso la desaparición en algunos casos, de la banda positiva se observará a valores de L/D más bajos, como de hecho se encuentra. Los posibles cambios conformacionales estarían de acuerdo con el desplazamiento hacia el rojo observado para el punto de inflexión ($\lambda = 260$ nm, en ausencia de liposomas) del espectro. También lo estaría el aumento de los valores de la elipticidad molar de la banda negativa, que se suele relacionar con la desnaturalización del polinucleótido.¹⁹ El desplazamiento en el punto de inflexión hacia el rojo disminuye al aumentar el valor de α . Esto puede ser debido a la influencia que ejerce la presencia del DOPE sobre la conformación estructural del polinucleótido, como proponen R. Marty y colaboradores²⁰ para diferentes preparaciones liposomiales.

La *Figura 6.6* muestra un menor desplazamiento en el punto de inflexión para los liposomas que contenían TEAC₄ (~24 nm → ~6 nm), que para su análogo en longitud de cadena alquílica, el (Im₁₂)₄ (~24 nm → ~14 nm) (ver *Figura 6.6A-D*), para la misma variación de α . Esto podría deberse a la intercalación, al menos parcial, del grupo planar aromático metilimidazolinio del calix (Im₁₂)₄ entre los pares de bases del ADN, lo que favorecería una estabilización de la forma B del ADN.²¹ Cabe resaltar de nuevo, que los liposomas formados por (Im₁₆)₄ no pueden ser comparados con el resto de los sistemas, como ya se mencionó anteriormente.

En este punto conviene indicar que C. Bombelli y colaboradores²² observaron un comportamiento similar en el espectro de dicroísmo circular de ADN plasmídico en presencia de liposomas que contenían tensioactivos diméricos (gémíni), al aumentar la relación de L/D. Estos autores sugirieron que la interacción liposomas/ADN promovía la transición conformacional del ADN de una forma B a una fase Ψ , donde las moléculas de ácido nucleico se encuentran parcialmente insertadas en un reordenamiento hexagonal invertido

de lípidos, que proporciona al ADN una determinada organización espacial y una direccionalidad fija.



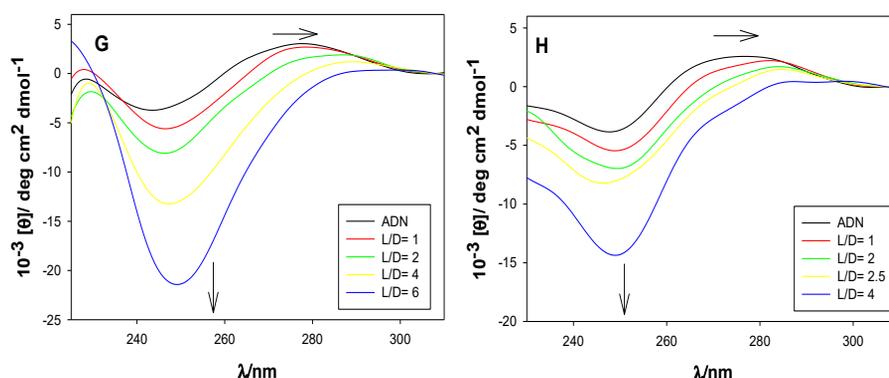


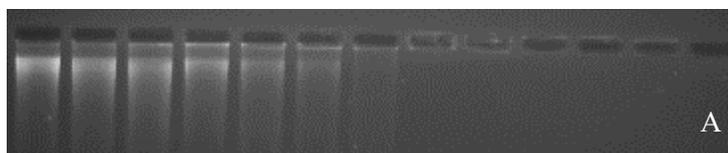
Figura 6.6. Espectros de dicroísmo circular del ADN a diferentes valores de L/D para cada uno de los sistemas investigados. TEAC4: A) $\alpha= 0.2$ y B) $\alpha= 0.5$; $(Im_{12})_4$: C) $\alpha= 0.2$ y D) $\alpha= 0.5$; $(Im_{16}Im_3)_2$: E) $\alpha= 0.2$ y F) $\alpha= 0.5$ y $(Im_{16})_4$: G) $\alpha= 0.2$ y H) $\alpha= 0.3$.

En definitiva, los resultados de DC parecen indicar que el polinucleótido sufre un cambio conformacional cuando interacciona con los liposomas, como se observará más adelante mediante medidas de AFM.

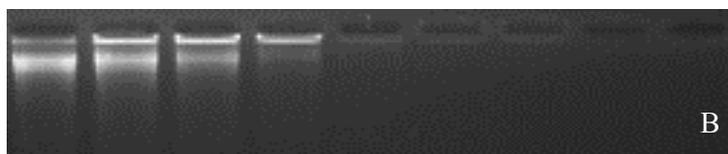
La inversión de carga del ADN en presencia de los liposomas fue también evaluada mediante medidas de electroforesis en gel de agarosa (1.00 % (p/v)). Esta técnica permite separar moléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades al aplicar una diferencia de potencial. En un primer pocillo se añade el ADN en ausencia de liposomas. Consecutivamente, se cargaron los restantes pocillos con los lipoplejos en orden creciente de L/D. Por último, se añade una disolución de liposomas en ausencia de ADN. La Figura 6.7 muestra los resultados obtenidos. Se observa una migración del ADN hacia el polo positivo para valores de L/D inferiores al $(L/D)_\phi$, para todos los sistemas estudiados. Además, se observa una disminución de la movilidad de la banda del ADN hasta alcanzar el $(L/D)_\phi$. A partir de ese valor, no se observa movilidad electroforética en las

imágenes adquiridas, lo que indica que se ha producido una inversión de carga del polinucleótido. Estos resultados confirman los obtenidos en las medidas de potencial zeta, dispersión de luz dinámica y dicroísmo circular.

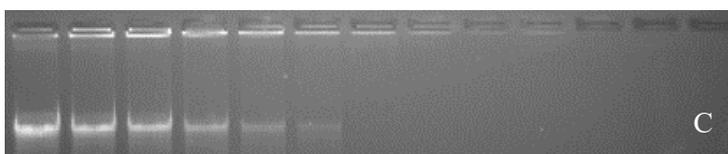
ADN 0.5 1 1.5 2 2.5 3 4 5 6 7 8 L



ADN 0.25 0.5 1 2 2.5 3 4 L



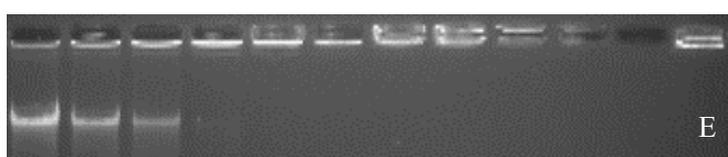
ADN 0.5 1 1.5 2 2.5 3 4 5 6 7 8 L



ADN 0.5 0.75 1 2 2.25 2.5 3 4 L



ADN 1 4 6 6.5 7 8 9 10 11 12 L



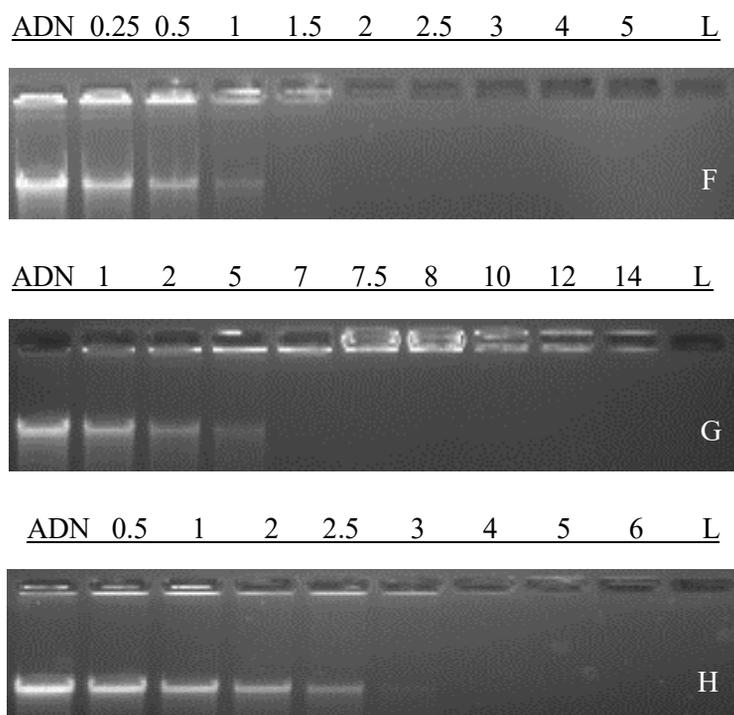


Figura 6.7. Imágenes de electroforesis del ADN a diferentes valores de L/D para cada uno de los sistemas investigados. TEAC₄: A) $\alpha= 0.2$ y B) $\alpha= 0.5$; (Im₁₂)₄: C) $\alpha= 0.2$ y D) $\alpha= 0.5$; (Im₁₆Im₃)₂: E) $\alpha= 0.1$ y F) $\alpha= 0.5$ y (Im₁₆)₄: G) $\alpha= 0.1$ y H) $\alpha= 0.3$.

Con la idea de visualizar los cambios conformacionales que sufre el ADN en presencia de los liposomas, se realizaron medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM). Una imagen topográfica de AFM del ADN de timo de temera en ausencia de liposomas se muestra en la *Figura 6.8*, donde puede verse que el polinucleótido se encuentra en una conformación de hilo o hebra, totalmente extendida.

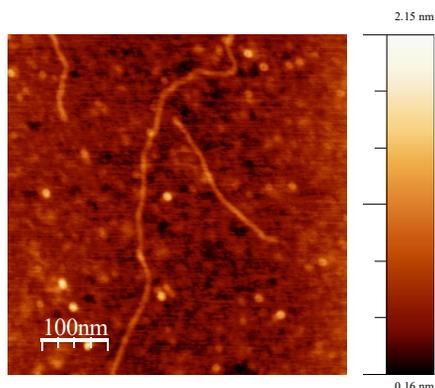


Figura 6.8. Imagen de AFM de ADN de timo de temera, adsorbido sobre una superficie de mica modificada con APTES, en ausencia de liposomas ($[\text{ADN}] = 3.00 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$).

En la *Figura 6.9* se pueden ver las imágenes de AFM obtenidas para un valor de $\alpha = 0.2$, y diferentes valores de L/D para dos de los calixarenos estudiados. Como se puede observar, para valores de L/D por debajo del valor de $(L/D)_\phi$, el polinucleótido se encuentra aún en un estado elongado, y no se ha producido un cambio conformacional sustancial en su estructura (ver *Figura 6.9A* y *Figura 6.9C*). No obstante, se puede apreciar la formación de estructuras globulares y una disminución de la longitud del ADN. L. Yan y H. Iwasaki²³ explicaron la formación de estas estructuras globulares, unidas a través de las cadenas de ADN, en base a un aumento de la flexión de la doble hélice del ADN, que resulta en la formación y estabilización de los bucles intramoleculares. La estructura de los glóbulos es el resultado de una separación de la doble cadena en cadenas de una sola hebra, así como de un cambio desde un estado elongado a uno globular. La *Figura 6.9* muestra que para valores de L/D mayores que el $(L/D)_\phi$, aumenta sustancialmente la presencia de estructuras globulares, aunque no se alcanza una condensación total de las moléculas de ADN (ver *Figura 6.9B* y *Figura 6.9D*). Los resultados muestran que el polinucleótido pasa desde un estado elongado a un

estado parcialmente compactado. Este comportamiento está de acuerdo con los resultados observados en los espectros de DC.

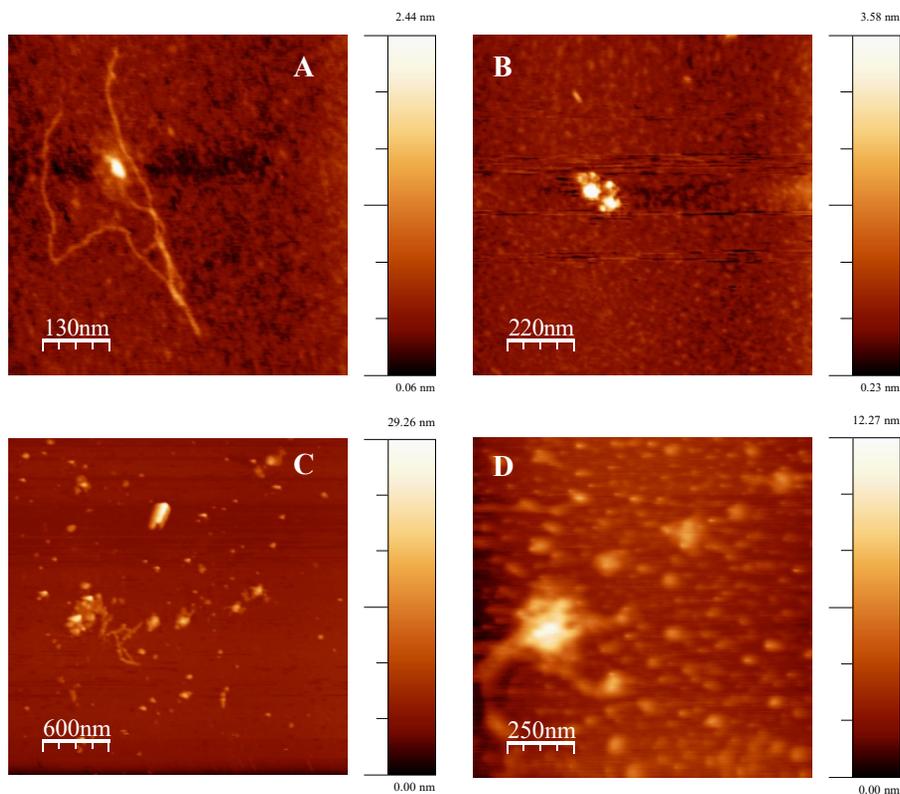


Figura 6.9. Imagen topográfica de AFM del ADN de timo de temera, adsorbido sobre una superficie de mica modificada con APTES, en presencia de los liposomas estudiados a diferentes relaciones de L/D para $\alpha= 0.2$. $(Im_{16}Im_3)_2$: A) L/D= 1 y B) L/D=7; $(Im_{16})_4$: C) L/D= 1, y D) L/D= 7.

Es bien conocido que los vectores que presentan una morfología esférica son más idóneos para su aplicación en terapia génica,^{24,25} dado que se observa que la esfericidad contribuye aumentando la eficiencia de la transfección.²⁶ Teniendo esto en cuenta, se realizaron medidas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para obtener información sobre la morfología de los

sistemas liposomiales estudiados. La *Figura 6.10* demuestra que tanto los liposomas, en ausencia de ADN, como los lipoplejos son esféricos, por lo que su morfología es la adecuada para actuar como vectores. Además, los tamaños medidos por TEM son consistentes con los resultados obtenidos mediante medidas de dispersión de luz dinámica (DLS) (ver la *Tabla 6.4*).

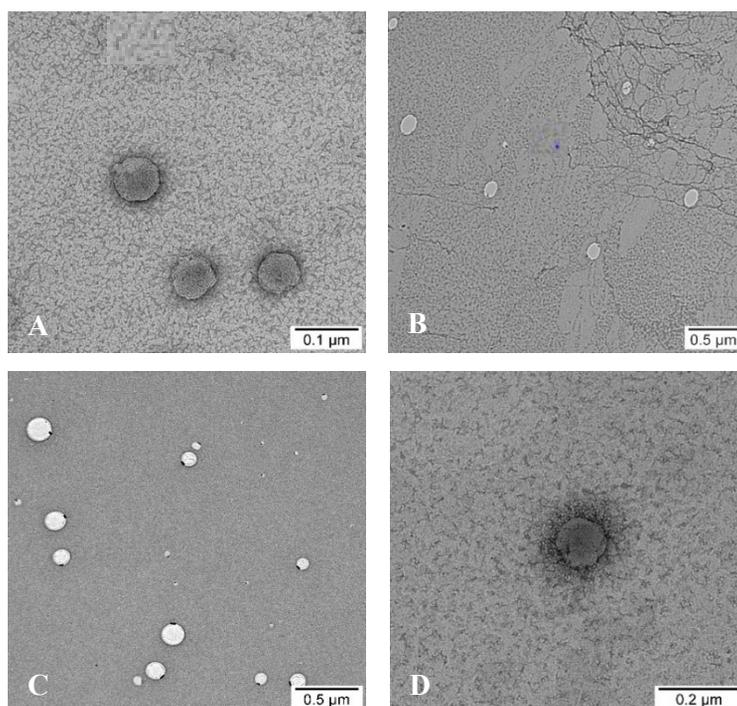
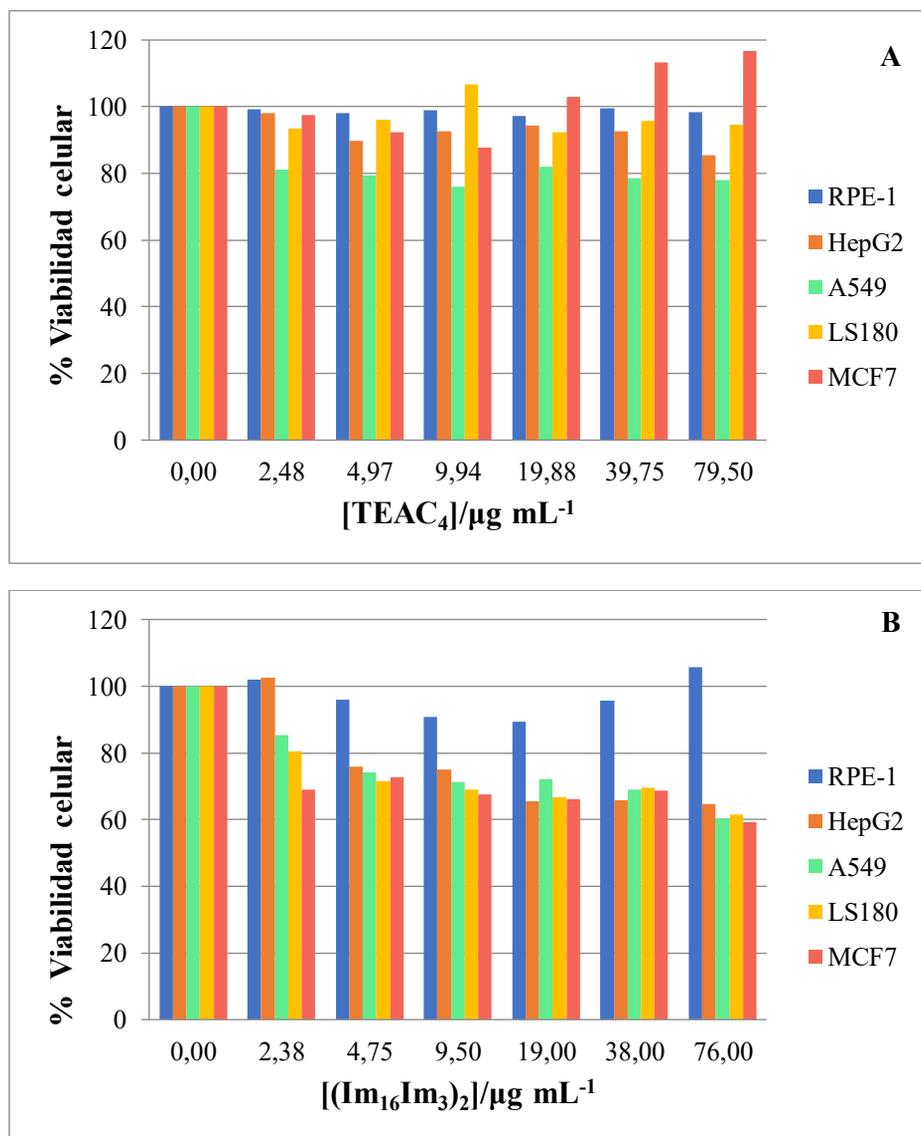


Figura 6.10. Imágenes de TEM de los liposomas (A: TEAC4 y C: (Im₁₆)₄) y lipoplejos (B: TEAC4 y D: (Im₁₆)₄) para una relación de L/D= 5 ($\alpha= 0.3$).

Tabla 6.4. Comparación de los valores de tamaño de partícula (nm) obtenidos mediante medidas de TEM y DLS.

	Tamaño TEM/nm		Tamaño DLS/nm	
	TEAC4	(Im ₁₆) ₄	TEAC4	(Im ₁₆) ₄
$\alpha= 0.3$				
Liposoma	82.4±4.4	138.1±45.7	146.6±3.9	155.9±4.1
L/D= 5	182.6±38.7	192.0±3.9	182.8±9.3	275.5±8.4

Los calixarenos pueden mostrar una baja citotoxicidad e inmunogenicidad,²⁷⁻²⁹ dependiendo de su funcionalización. El efecto citotóxico de los liposomas preparados en este estudio sobre diferentes líneas celulares fue evaluado mediante ensayos *in vitro* MTT, para el máximo valor de α utilizado. Los resultados se muestran en la *Figura 6.11*.



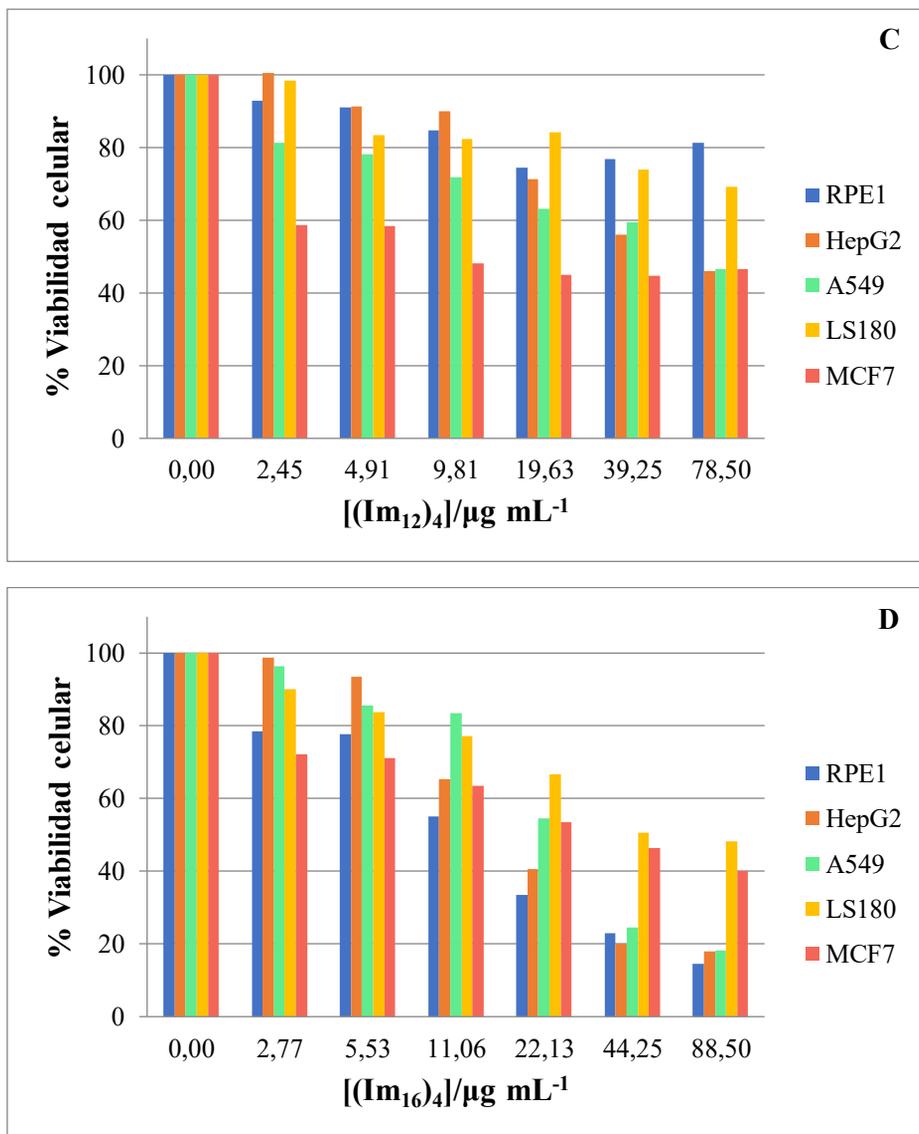


Figura 6.11. % de viabilidad celular de los liposomas estudiados para diferentes líneas celulares durante un período de 24 h (A: TEAC4, B: $(Im_{16}Im_3)_2$, C: $(Im_{12})_4$ y D: $(Im_{16})_4$ para su valor máximo de α).

Se observó que la introducción de grupos aromáticos en el borde superior del calixareno resulta en un aumento de la toxicidad, (*Figura 6.11A y Figura 6.11C*), a igualdad en la longitud de la cadena alquílica. De hecho, los liposomas TEAC4/DOPE presentan una baja citotoxicidad en todo el rango de concentraciones estudiado. Un resultado similar fue encontrado por R. Rodik y colaboradores³⁰ en el estudio de la viabilidad celular de diferentes calixarenos. Por otro lado, cuando aumenta la longitud de la cadena alquílica en el borde inferior del macrociclo presente en los liposomas, también se observa un incremento de la citotoxicidad (*Figura 6.11B-D*). Esta tendencia también ha sido observada por otros autores.²⁹ Esto explica la alta citotoxicidad observada para los liposomas de (Im₁₆)₄/DOPE. Además, puede decirse que los liposomas (Im₁₆Im₃)₂/DOPE presentan una selectividad específica hacia las células tumorales, mientras que los de (Im₁₂)₄/DOPE actúan especialmente sobre las células mamarias MCF7, y a altas concentraciones de calix sobre las células HepG2 y A549. Finalmente, un aumento notable de la cadena alquílica en (Im₁₆)₄ produce considerables efectos tóxicos a una [calix] ≥ 11.06 μg mL⁻¹.

Teniendo en cuenta esta idea, los calixarenos se convierten en potenciales candidatos para el transporte y liberación de genes y/o fármacos, atendiendo especialmente a los grupos que forman parte de su estructura.

6.3 Conclusiones

Se han preparado liposomas catiónicos que contienen un calixareno cargado positivamente y el fosfolípido neutro DOPE. El tamaño de los liposomas depende del balance entre las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y por ello se ve afectado por la relación entre el número de moles de lípido catiónico, el calixareno, y el número de moles totales de lípidos, calix+DOPE, es decir, por el parámetro α .

Se ha demostrado que los liposomas catiónicos interactúan con el ADN de timo de ternera, causando una inversión de carga del polinucleótido y dando lugar a una compactación parcial del mismo.

Las imágenes de TEM confirman que los liposomas preparados, tanto en ausencia como en presencia de ADN, poseen una morfología esférica. Los estudios de citotoxicidad muestran una baja y/o moderada toxicidad (con una cierta especificidad hacia determinadas células tumorales, en el caso de los macrociclos con grupos metilimidazolinios), excepto para los liposomas constituidos por $(\text{Im}_{16})_4$, que son altamente citotóxicos, sobre todo a una $[\text{calix}] \geq 11.06 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estos dos resultados permiten decir que algunas de las preparaciones liposomiales estudiadas en este trabajo, las menos citotóxicas, podrían ser utilizadas como vectores en procesos de transfección génica. Además, se ha puesto de manifiesto que los calixarenos presentan un gran interés potencial para ser utilizados como vectores, solos o en preparaciones liposomiales, dado que su versatilidad permite funcionalizarlos para maximizar su interacción con los ácidos nucleicos, a la vez que se minimiza su citotoxicidad.

6.4 Referencias bibliográficas

1. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238–52 (1965).
2. Hua, S. & Wu, S. Y. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. *Front. Pharmacol.* **4**, 1–7 (2013).
3. Akbarzadeh, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 102 (2013).
4. Nam, J., Beales, P. A. & Vanderlick, T. K. Giant phospholipid/block copolymer hybrid vesicles: Mixing behavior and domain formation. *Langmuir* **27**, 1–6 (2011).
5. Matsumura, A. *et al.* Photochemical control of molecular assembly formation in a cationic surfactant system. *Langmuir* **27**, 1610–1617 (2011).
6. Devi, U., Brown, J. R. D., Almond, A. & Webb, S. J. Pd(II)-mediated assembly of porphyrin channels in bilayer membranes. *Langmuir* **27**, 1448–1456 (2011).
7. Barrán-Berdón, A. L. *et al.* Polycationic macrocyclic scaffolds as potential non-viral vectors of DNA: A multidisciplinary study. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 14404–14414 (2015).
8. Mochizuki, S., Nishina, K., Fujii, S. & Sakurai, K. The transfection efficiency of calix[4]arene-based lipids: The role of the alkyl chain length. *Biomater. Sci.* **3**, 317–322 (2015).
9. Drakalska, E. *et al.* Hybrid liposomal PEGylated calix[4]arene systems as drug delivery platforms for curcumin. *Int. J. Pharm.* **472**, 165–174 (2014).
10. Aleandri, S. *et al.* Incorporation of a calixarene-based glucose functionalised bolaamphiphile into lipid bilayers for multivalent lectin recognition. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 4811–4817 (2013).
11. Lichen, S. *et al.* Anion transport across phospholipid bilayers promoted by a guanidinium calix[4]arene conjugate. *Supramol. Chem.* **25**, 631–640 (2013).

12. Sansone, F. *et al.* DNA condensation and cell transfection properties of guanidinium calixarenes: Dependence on macrocycle lipophilicity, size, and conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14528–14536 (2006).
13. Schühle, D. T. *et al.* Liposomes with conjugates of a calix[4]arene and a Gd-DOTA derivative on the outside surface; an efficient potential contrast agent for MRI. *Chem. Commun.* **46**, 4399–4401 (2010).
14. Grit, M. & Crommelin, D. J. A. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem. Phys. Lipids* **64**, 3–18 (1993).
15. Shirazi, R. S. *et al.* Synthesis and characterization of degradable multivalent cationic lipids with disulfide-bond spacers for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 2156–2166 (2011).
16. Hallett, F. R., Watton, J. & Krygsmann, P. Vesicle sizing: Number distributions by dynamic light scattering. *Biophys. J.* **59**, 357–362 (1991).
17. Radwan Almofti, M. *et al.* Cationic liposome-mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization. *Arch. Biochem. Biophys.* **410**, 246–253 (2003).
18. Gratton, S. E. A. *et al.* The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 11613–11618 (2008).
19. Rosa, M., Dias, R., da Graça Miguel, M. & Lindman, B. DNA–Cationic Surfactant Interactions Are Different for Double- and Single-Stranded DNA. *Biomacromolecules* **6**, 2164–2171 (2005).
20. Marty, R. *et al.* Structural analysis of DNA complexation with cationic lipids. *Nucleic Acids Res.* **37**, 849–857 (2009).
21. Chaires, J. B. A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Arch. Biochem. Biophys.* **453**, 26–31 (2006).
22. Bombelli, C., Faggioli, F., Luciani, P., Mancini, G. & Sacco, M. G. Efficient transfection of DNA by liposomes formulated with cationic gemini amphiphiles. *J. Med. Chem.* **48**, 5378–5382 (2005).
23. Yan, L. & Iwasaki, H. Thermal Denaturation of Plasmid DNA Observed by

- Atomic Force Microscopy. *Jpn. J. Appl. Phys.* **41**, 7556–7559 (2002).
24. Dewa, T. *et al.* Liposomal Polyamine–Dialkyl Phosphate Conjugates as Effective Gene Carriers: Chemical Structure, Morphology, and Gene Transfer Activity. *Bioconjug. Chem.* **21**, 844–852 (2010).
25. Puras, G. *et al.* A novel cationic niosome formulation for gene delivery to the retina. *J. Control. Release* **174**, 27–36 (2014).
26. Ma, B., Zhang, S., Jiang, H., Zhao, B. & Lv, H. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *J. Control. Release* **123**, 184–194 (2007).
27. Rodik, R. V. *et al.* Virus-sized DNA nanoparticles for gene delivery based on micelles of cationic calixarenes. *Chem. - A Eur. J.* **17**, 5526–5538 (2011).
28. Rodik, R. V., Anthony, A. S., Kalchenko, V. I., Mély, Y. & Klymchenko, A. S. Cationic amphiphilic calixarenes to compact DNA into small nanoparticles for gene delivery. *New J. Chem.* **39**, 1654–1664 (2015).
29. Giuliani, M., Morbioli, I., Sansone, F. & Casnati, A. Moulding calixarenes for biomacromolecule targeting. *Chem. Commun.* **51**, 14140–14159 (2015).
30. Rodik, R. V. *et al.* Virus-sized DNA nanoparticles for gene delivery based on micelles of cationic calixarenes. *Chem. - A Eur. J.* **17**, 5526–5538 (2011).

CONCLUSIONS

Conclusions

Chapter 3

- The macrocycles used interact with calf-thymus DNA causing different conformational changes. Initially the macrocycle binds to the polynucleotide by a groove mode inducing a partial denaturation of the double chains. The interaction, favoured by the breakup of the double helix, results in the compaction of the DNA; that is, the polynucleotide goes from an elongated (coil) conformation to a more compact globular form. An increment in the calixarene concentration, $X > 0.07$ for dinitro-diester calix[4]arene and $X > 0.003$ for difluorene-diester calix[4]arene, produces the de-compaction of the DNA. This is probably due to the formation of supramolecular assemblies where a calixarene molecule is stacked inside other macrocycle molecule.
- Cytotoxicity measurements demonstrate that dinitro-diester calix[4]arene is a potential candidate to be used in gene therapy or as a nanocarrier of drugs. However, difluorene-diester calix[4]arene shows a toxicity too high to be used as a nanovector. Nonetheless, it could have some potential as a nanocarrier of anticancer drugs such as doxorubicin, cytarabine, paclitaxel, etc.
- The importance of adequately choosing the structure of the calixarenes in order to prepare and design novel vectors for gene therapy has been demonstrated.

Chapter 4

- p-Sulfocalix[6]arene is an adequate nanocarrier for the antineoplastic antibiotic doxorubicin. This calixarene displays a preference for locating close to the DNA structure, in a groove mode, according to the obtained CD spectra. This fact facilitates the transport of the antibiotic towards the polynucleotide as compared to the free doxorubicin.
- Cytotoxicity results make evident that the encapsulation of the doxorubicin inside the calixarene partially reduces the side effects of the drug.

Chapter 5

- The cationic amphiphilic calixarenes TEAC₄, (Im₁₆Im₃)₂, (Im₁₂)₄, and (Im₁₆)₄ self-aggregate in aqueous solutions showing two critical aggregation concentrations, CAC1 and CAC2. For [calix]<CAC1 only micelles are present in the solutions. For a calixarene concentration in the range CAC1<[calix]<CAC2 micelles as well as vesicles are observed, and for [calix]>CAC2 both micelles and a distribution of vesicles are present in the solution.
- Cytotoxicity experiments show that calixarene micelles and several of the calixarene vesicles investigated could be used as biocompatible nanocarriers.
- The study of the interactions between the cationic calixarene aggregates and calf thymus DNA shows that most of them strongly interact with the polynucleotide, inverting its charge. Micelles compact the polynucleotide, whereas vesicles only cause a partial

condensation of the DNA molecules. Therefore, the calix micelles show potential as vectors in gene therapy.

- The antineoplastic drug doxorubicin was encapsulated into the calixarene aggregates and a high encapsulation efficiency was found for micelles and, specially, for vesicles. However, DOX-loaded calixarene vesicles present low stability at 37°C, which is a serious restriction in their use as nanocarriers for this drug. Release values of DOX from the calixarene micelles shows that they can lengthen the half-life of free doxorubicin in the body and, as a result, lower amounts of drug could be used in the cancer treatments, diminishing the important side effects of DOX.

Chapter 6

- Cationic liposomes (calix/DOPE) have been prepared with the four cationic amphiphilic calixarenes. Their size depends on the balance between electrostatic and hydrophobic interactions. Therefore, it depends on their composition (α).
- The calf thymus DNA interacts with the cationic liposomes forming lipoplexes. A partial compaction of the DNA is achieved for L/D values higher than those corresponding to the electroneutrality of the lipoplexes.
- TEM images show that the lipoplexes have a spherical morphology, which increases the potential of the lipoplexes to be used as vectors in gene transfection.
- Cytotoxicity results show a low or moderate toxicity of the liposomes for several cell lines, except for those containing (Im₁₆)₄, which are highly cytotoxic up to [calix] ≥ 11.06 μg mL⁻¹. The liposomes prepared with (Im₁₆Im₃)₂, (Im₁₂)₄, and (Im₁₆)₄ show a certain selectivity towards certain cancer cells.

Publicaciones en revistas científicas:

1. Ostos, F. J., Lebron, J. A., Moyá, M. L., Deasy, M. & López-Cornejo, P. Binding of DNA by a dinitro-diester calix[4]arene: Denaturation and condensation of DNA. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **127**, 65–72 (2015).
2. Lebrón, J. A. *et al.* Cooperative interaction between metallosurfactants, derived from the [Ru(2,2'-bpy)₃]²⁺ complex, and DNA. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **135**, 817–824 (2015).
3. Ostos, F. J. *et al.* P -Sulfocalix[6]arene as Nanocarrier for Controlled Delivery of Doxorubicin. *Chem. - An Asian J.* **12**, 679–689 (2017).
4. Martín, V. I. *et al.* Host-guest interactions between cyclodextrins and surfactants with functional groups at the end of the hydrophobic tail. *J. Colloid Interface Sci.* **491**, 336–348 (2017).
5. López-López, M., López-Cornejo, P., Lebrón, J. A., Ostos, F. J. & Moyá, M. L. Binding and reactivity under restricted geometry conditions: Applicability of the Pseudophase Model to thermal and photochemical processes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **32**, 23–28 (2017).
6. López-López, M. *et al.* Importance of hydrophobic interactions in the single-chained cationic surfactant-DNA complexation. *J. Colloid Interface Sci.* **521**, (2018).
7. Moyá, M. L. *et al.* Preparation and characterization of new

- liposomes. Bactericidal activity of cefepime encapsulated into cationic liposomes. *Pharmaceutics* **11**, 1–12 (2019).
8. Lebrón, J. A. *et al.* Preparation and characterization of metallomicelles of Ru(II). Cytotoxic activity and use as vector. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **175**, 116–125 (2019).
 9. Perez-Puyana, V., Ostos, F. J., López-Cornejo, P., Romero, A. & Guerrero, A. Assessment of the denaturation of collagen protein concentrates using different techniques. *Biol. Chem.* **400**, 1583–1591 (2019).
 10. López, A. *et al.* Influence of the degree of oligomerization of surfactants on the DNA/surfactant interaction. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **182**, 110399 (2019).

