



# VNIVERSITAT D VALÈNCIA

**PROGRAMA DOCTORADO EN QUÍMICA-3154 R.D. 99/2011**

**DERIVADOS DE [1,2,3]TRIAZOLO[1,5- $\alpha$ ]QUINOLINA**

**Y [1,2,3]TRIAZOLO[1,5- $\alpha$ ]PIRIDINA.**

**INTERACCIÓN CON ADN. ACTIVIDAD FOTONUCLEASA.**

**POTENCIALES APLICACIONES COMO ANTI-TUMORALES O AGENTES**

**LEISHMANICIDAS**

**Tesis Doctoral**

**Sònia López Molina**

Directores:

Dra. Belén Abarca González

Dra. Gloria Alzuet Piña

Dr. Rafael Ballesteros Campos

**Facultad de Química, Departamento de Química Orgánica**

**Septiembre, 2018**



**Dña. Belén Abarca González, Catedrática del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia, D. Rafael Ballesteros Campos, Catedrático del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia y Dña. Gloria Alzuet Piña, Catedrática del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia**

**CERTIFICAN:**

Que **Dña. Sonia López Molina**, ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada:

**DERIVADOS DE [1,2,3]TRIAZOLO[1,5- $\alpha$ ]QUINOLINA Y [1,2,3]TRIAZOLO[1,5- $\alpha$ ]PIRIDINA. INTERACCIÓN CON ADN. ACTIVIDAD FOTONUCLEASA. POTENCIALES APLICACIONES COMO ANTI-TUMORALES O AGENTES LEISHMANICIDAS**

Y autorizan la presentación de la correspondiente memoria en la Facultad de Química para que se cumplan los trámites reglamentarios.

Y para que así conste a los efectos oportunos y a petición del interesado expiden y firman la presente autorización.

En Burjassot a 25 de Septiembre de 2018

**Fdo: Belén Abarca González**

**Fdo: Rafael Ballesteros Campos**

**Fdo: Gloria Alzuet Piña**



## ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b> .....	xv
<b>Abreviaturas</b> .....	xvii
<b>Capítulo I. Introducción y Objetivos</b> .....	1
1. Introducción y Objetivos.....	3
2. Bibliografía.....	8
<b>Capítulo II. Síntesis y caracterización de sales de Triazoloquinolinio</b> .....	11
1. Antecedentes bibliográficos de la Química de las Triazoloquinolinas.....	13
1.1. Síntesis de [1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]quinolina.....	13
1.2. Reactividad de [1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]quinolina.....	15
1.2.1. Reacciones con electrófilos no alquilantes.....	15
1.2.2. Reacciones de litiación.....	17
1.2.3. Reacciones con electrófilos alquilantes. Sales de triazoloquinolinio..	21
1.2.4. Síntesis de iluros de triazoloquinolina y su reactividad con dipolarófilos.....	22
1.2.5. Fotoquímica de iluros de triazoloquinolinio.....	27
1.3. Equilibrio anillo-cadena-anillo en 3-(2-piridil)-[1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]quinolinas.....	28

1.4. Propiedades fluorescentes de derivados de triazoloquinolina.....	34
2. Resultados y discusión.....	38
2.1. Síntesis.....	38
2.2. Caracterización Espectroscópica.....	39
2.2.1. Propiedades Espectroscópicas de Monosales de Triazoloquinolinio...39	
2.2.2. Propiedades Espectroscópicas de Disales de Triazoloquinolinio.....	49
3. Conclusiones.....	53
4. Parte Experimental.....	54
4.1. Síntesis del producto de partida.....	54
4.2. Síntesis de monosales.....	55
4.3. Síntesis de disales.....	62
5. Bibliografía.....	70
<b>Capítulo III. Estudios de interacción con ADN de monosales y disales de Triazoloquinolinio.....</b>	<b>73</b>
1. Metodologías de estudio de interacción de moléculas con ADN. Introducción y objetivos.....	75
1.1. Estructura del ADN.....	76
1.2. Interacción del B-ADN con moléculas pequeñas.....	82
1.2.1. Unión al surco.....	83

1.2.2. Intercalación.....	87
1.2.3. Intercalación electrostática con el esqueleto azúcar-fosfato.....	90
1.2.4. Unión covalente.....	90
1.3. Técnicas para el estudio de la interacción de compuestos con el ADN.....	92
1.3.1. Valoraciones UV-visible.....	92
1.3.2. Fluorescencia: Ensayo de desplazamiento con Bromuro de Etidio.....	94
1.3.3. Desnaturalización térmica del ADN.....	95
1.3.4. Viscosimetría.....	98
1.4. Objetivos.....	99
2. Interacción de monosales de Triazoloquinolinio con ADN.....	103
2.1. Desnaturalización térmica.....	103
2.2. Valoraciones UV-visible.....	106
2.3. Estudios por Fluorescencia.....	117
2.4. Estudios de interacción compuestos-ADN mediante Viscosimetría.....	125
3. Interacción de disales de Triazoloquinolinio con ADN.....	128
3.1. Desnaturalización térmica.....	129
3.2. Valoraciones UV-visible.....	134
3.3. Estudios por Fluorescencia.....	142

3.3.1. Ensayos de desplazamiento de bromuro de etidio.....	142
3.4. Estudios mediante Viscosimetría.....	149
4. Conclusiones.....	152
5. Parte experimental. Estudios de interacción con ADN.....	154
5.1. Preparación de las disoluciones de ADN.....	154
5.2. Temperatura de fusión.....	154
5.3. Valoraciones de absorción electrónica.....	155
5.4. Valoraciones de fluorescencia.....	155
5.5. Ensayos de desplazamiento de bromuro de etidio.....	155
5.6. Medidas de viscosidad.....	156
6. Bibliografía.....	157
<b>Capítulo IV. Estudios de Foto-ruptura de ADN con monosales y disales de Triazoloquinolinio.....</b>	<b>163</b>
1. Introducción y objetivos.....	165
1.1. Agentes de escisión del ADN.....	165
1.2. Ensayo de la actividad nucleasa fotoinducida mediante electroforesis en gel de agarosa.....	172
1.3. Objetivos.....	174
2. Estudios de foto-ruptura del ADN con monosales de triazoloquinolinio.....	175



2.1. Actividad fotonucleasa inducida.....	175
2.1.1. Estudios de la influencia de la fuerza iónica sobre la actividad nucleasa de las monosales de triazoloquinolinio.....	183
2.2. Mecanismo de fotoescisión del ADN.....	184
2.2.1. Interacción con los surcos mayor y menor del ADN.....	186
3. Estudios de foto-ruptura del ADN con disales de triazoloquinolinio.....	189
3.1. Actividad fotonucleasa inducida.....	189
3.1.1. Influencia de la fuerza iónica sobre la actividad nucleasa de las disales de triazoloquinolinio.....	197
3.2. Mecanismo de fotoescisión del ADN.....	198
3.2.1. Mecanismo de interacción en los surcos del ADN.....	201
4. Valoraciones de absorción electrónica con DPBF.....	202
5. Conclusiones.....	205
6. Parte experimental.....	206
6.1. Fotoescisión del ADN.....	206
6.2. Influencia de la fuerza iónica en la actividad nucleasa.....	207
6.3. Mecanismo de fotoescisión del ADN.....	207
6.4. Mecanismo de interacción en los surcos del ADN.....	208

6.5. Valoraciones de absorción electrónica con DPBF.....	208
7. Bibliografía.....	209
<b>Capítulo V. Estudio de la actividad antitumoral de sales de Triazoloquinolinio y Triazolopiridinio.....</b>	<b>213</b>
1. Introducción y objetivos.....	215
2. Antecedentes bibliográficos.....	218
2.1. Biología del cáncer.....	218
2.2. Genes causantes de tumores.....	221
2.3. Ciclo celular.....	223
2.4. Muerte celular programada: Apoptosis.....	227
2.5. Tratamiento oncológico.....	232
3. Técnicas de estudio para la actividad antitumoral.....	240
3.1. Ensayos de viabilidad celular.....	240
3.2. Actividad caspasa.....	241
3.3. Daño al ADN.....	241
4. Estudios de actividad antitumoral de las sales de Triazoloquinolinio y Triazolopiridinio.....	243
4.1. Ensayos de viabilidad celular.....	243
4.2. Análisis de la distribución del ciclo celular.....	253

4.3. Inducción de la apoptosis: activación de caspasas	
ejecutoras -3 y -7.....	255
4.4. Ensayos de formación de colonias.....	256
5. Conclusiones.....	259
6. Parte experimental.....	260
6.1. Síntesis de monosales de Triazolopiridinio.	
Procedimiento general.....	260
6.2. Ensayos de evaluación antitumoral <i>in vitro</i> .....	266
6.2.1. Cultivos celulares.....	266
6.2.2. Preparación de las disoluciones <i>stock</i> .....	272
6.2.3. Ensayos de viabilidad celular.....	272
6.2.4. Determinación del valor IC <sub>50</sub> .....	273
6.2.5. Análisis d la distribución del ciclo celular.....	274
6.2.6. Análisis de inducción de la apoptosis.....	276
6.2.7. Análisis del daño al ADN.....	277
6.2.8. Análisis estadístico.....	278
7. Bibliografía.....	279

<b>Capítulo VI. Estudio de la interacción con ADN de Triazolopiridil Aril Cetonas activas frente Leishmania. Interacción con BSA.....</b>	<b>283</b>
1. Introducción.....	285
2. Antecedentes.....	288
2.1 Aplicaciones biológicas de derivados de [1,2,3]triazolo[1,5- <i>a</i> ]piridina	288
2.2. Síntesis y evaluación de 7-arylhidroximetiltriazolopiridinas como agentes cardiovasculares potenciales.....	288
2.3. Evaluación biológica de [1,2,3]triazolo[1,5- <i>a</i> ]pyridines como nuevos inhibidores de la sintasa del óxido nítrico neuronal.....	289
2.4. Actividad antileishmania de derivados de triazolopiridinas.....	290
2.4.1. Actividad antileishmania de triazolopiridopirimidinas.....	290
2.4.2. Actividad antileishmania de sales de triazolopiridinio.....	294
2.5. Interacción con ADN de nuevos diquats basados en triazolopiridinas y triazoloquinolinas.....	295
3. Resultados y discusión.....	297
3.1. Síntesis de triazolopiridil piridil cetonas y triazolopiridil cetonas.....	297
3.2. Actividad biológica.....	298
3.2.1. Actividad <i>in vitro</i> frente a <i>Leishmania</i> spp.....	298
3.2.2. Eficacia <i>in vivo</i> frente a <i>L. Infantum</i> .....	301

3.2.3. Estudios de interacción con ADN.....	302
3.2.4. Estudio de interacción con BSA.....	308
3.2.4.1. Estudios de desactivación fluorescente de BSA	
con <b>16</b> y <b>17</b> .....	309
3.2.4.2. Sitio de unión selectiva de la BSA.....	315
4. Conclusiones.....	320
5. Parte experimental.....	321
5.1. Química.....	321
5.1.1. Materiales y métodos.....	321
5.1.2. Procedimiento general para la síntesis de <b>2, 3, 10, 11, 12a-c, 13a,</b>	
<b>14a-c,15, 17</b> .....	321
5.1.3. Procedimiento general para la síntesis de bistriazolopiridil	
cetonas <b>13</b> y bistriazolopiridil piridil cetona <b>16</b> .....	322
5.1.4. Bis(3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5- <i>a</i> ]piridil) cetona <b>13b</b> .....	322
5.1.5. Bis(3-fenil-[1,2,3]triazolo[1,5- <i>a</i> ]piridil) cetona <b>13c</b> .....	323
5.1.6. Bis{6-([1,2,3]triazolo[1,5- <i>a</i> ]piridin-3-il) piridil-2-il}	
cetona <b>16</b> .....	324
5.2. Actividad biológica.....	325
5.2.1. Fármacos y reactivos.....	325
5.2.2. Ensayos Leishmanicidas.....	325

5.2.2.1. Parásitos y procedimientos de cultivos.....	325
5.2.2.2. Ensayos <i>in vitro</i> de susceptibilidad de promastigotes..	326
5.2.2.3. Ensayos <i>in vitro</i> de susceptibilidad de amastigotes	
Intracelulares.....	326
5.2.2.4. Ensayo Leishmanicida <i>in vivo</i> .....	327
5.2.3. Ensayos de citotoxicidad.....	328
5.2.3.1. Cultivos celulares.....	328
5.2.3.2. Ensayos de citotoxicidad en macrófagos J774.....	328
5.2.3.3. Estadística.....	329
5.2.4. Ensayos de interacción con ADN.....	329
5.2.4.1. Valoraciones UV-Visible.....	329
5.2.4.2. Medidas de viscosidad.....	330
5.2.5. Ensayos de unión a la proteína BSA.....	330
5.2.5.1. Medidas de fluorescencia.....	330
5.2.5.2. Estudios de absorción UV.....	331
5.2.5.3. Ensayos de competitividad.....	331
6. Bibliografía.....	332

## **AGRAÏMENTS**

En primer lloc m'agradaria agrair als meus directors, els professors Belén Abarca, Gloria Alzuet i Rafael Ballesteros, per tot el que m'han ensenyat i per l'esforç que han fet per a que este treball sortirà endavant. Per el seu suport i per aguantar-me les llàgrimes, que no han sigut poques.

A Rafa i Belén per donar-me la primera oportunitat , allà per juliol del 2007. Per ensenyar-me tot i més sobre les triazolopiridines i perquè gràcies a ells vaig descobrir el que realment volia fer.

A Gloria, perquè a més de directora, de vegades ha sigut psicòloga. Per estar ahí en moments molt durs per a les dos. Sense la teua ajuda no podria haver fet ni la meitat del treball.

També vull donar-li les gràcies al professor Priam Villalonga i a la professora Silvia Fernández per acollir-me al seu laboratori durant 6 mesos. Per a mi va ser tota una experiència adentrar-me en el món del càncer.

A tots el meus companys de laboratori des del principi fins al final: Cristina, Joan, Moncef, Leo i Pedro J. A Rafa, per la seua ajuda i consells. A Empar, per convertir-se en una gran amiga. Però en especial a Rosa, que ha sigut un exemple a seguir i he tingut la sort de poder compartir molts moments amb ella, tant dins com fora del laboratori.

A la gent del Laboratori Ambulatori: Marga, Guillem, Fernando i Elena. A Ruth i Clara perquè des de Madrid i Canadà encara m'ajuden a millorar. Però sobretot, vull donar-li les gràcies a Cristina, que com Rosa, me transmet les ganes de ser millor científica i continuar aprenent. Per tot lo bo i no tant bo que hem passat, a Palma i a

casa. Per les nits de “vídeo clips”, els trellats, Rita, La Duquesa... Per a mi sempre seràs la meua suecana.

A les farmacèutiques que he tingut la sort de conèixer: Elisa, Núri, Mireia, Empar, Rosa i Marí. Per entendre'ns unes a altres, per les rises i ploreres. Perquè són unes gran científiques que esperen que algun dia, per el bé de la ciència, tinguen el seu propi grup d'investigació, perquè elles ho valen.

A Santi, Fèlix, Peti, Richi, Miquel, Felipe, Javi, Espada, Ali, Dani, Paco i Sofi. Per les cerveses de després de molts dies de m.

A Ana, Jacobo, Gema i Mireia.

A Vanne, Lucía i Ana. Què faria jo sense els seus consells i ànims? Per entendre'm, per escoltar-me quan estic cabrejada amb els de doctorat, per dir-me “va, ja queda poc” durant molt de temps. Per les converses sobre ciència, política, feminisme i netflix (entre moltes altres coses) que fan que aquesta etapa siga més amena i divertida. Sobre tot a Vanne, per ajudar-me en els moments més difícils.

A Jordi. Gràcies per entrar aquell dia a la farmàcia, per les cançons que me cantes a cau d'orella, per estimar-me, per abraçar-me quan me pose nerviosa, que és sempre. Per posar la rentadora, el rentaplats, netejar la caixa de les gates i fer la compra mentre estic amb l'ordinador tot el dia.

I per últim, a la meua família, que sense ells açò no haguera sigut possible, per creure en mi i no deixar-me rendir-me mai. Per el seu esforç i suport incondicional. A mon pare, per ensenyar-me que s'ha de treballar per a tindre recompensa. A ma mare, per creure en mi com ningú i per animar-me a fer el que més m'agrada. A Núri, Nadia i Mía, simplement per estar ahí.



## **ABREVIATURAS**

**Å:** Angstrom

**AcOEt:** Acetato de Etilo

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**AIF:** Apoptosis-Inducing Factor

**APAF:** Apoptotic Protease Activating Factor

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**AS:** Albúmina Sérica

**ATP:** Adenosín Trifosfato

**ΔT:** Incremento de Temperatura

**BSA:** Albúmina Sérica Bovina

**tBuLi:** *tert*-Butil Litio

**BE:** Bromuro de Etidio

**°C:** Grados Celsius

**CT-DNA:** *Calf Thymus DNA*

**δ:** Desplazamiento Químico

**d:** Doblete

**dd:** Doble Doblete

**DABCO:** 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DC:** Dicroísmo Circular

**DIABLO/Smac:** *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*

**DIFNOE:** *Differential Nuclear Overhauser Enhancement*

**DMAD:** Dimetil Acetilendicarboxilato

**DMF:** Dimetilformamida

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DPBF:** 2,6-difenildibenzo[a]furano

**ε:** Coeficiente de Extinción Molar

**EndoG:** Endonucleasa G

**ESI:** Electrospray Ionization

**FS:** Fotosensibilizador

**η:** Viscosidad

**HRMS:** Espectroscopía de Masas de Alta Resolución

**HSQC:** Correlación Hetronuclear Cuántica Simple

**Hz:** Herzios

**IAP:** *Inhibitors of Apoptosis Proteins*

**IC<sub>50</sub>**: Concentración Inhibitoria 50

**IP**: Yoduro de Propidio

**J**: Constante de Acoplamiento

**K<sub>app</sub>**: Constante Aparente

**K<sub>b</sub>**: Constante de Unión

**K<sub>sv</sub>**: Constante de Stern-Volmer

**λ**: Longitud de Onda

**LDA**: Litio Diisopropilamida

**LiTMP**: Tetrametilpiperidida de Litio

**m**: Multiplete

**MDR/P-gp**: *Multidrug Resistance Protein/Permeability Glicoprotein*

**MHz**: Megahertzios

**MOMP**: *Mithochondrial Outer Membrane Permeabilization*

**MP**: Metilpropiolato

**MS**: Espectroscopía de Masas

**MSH**: *O*-metilensulfonilhidroxilamina

**m/z**: Relación masa/carga

**nm**: nanómetros

**NFSI:** *N*-fluorobencenosulfonamida

**NOS:** Óxido Nítrico Sintasa

**PDT:** Terapia Fotodinámica

**pf:** Punto de Fusión

**PMDTA:** Pentametildietilentriamina

**PPA:** Ácido Polifosfórico

**ppm:** Partes por Millón

**PTP:** Pridinriazolopiridina

**PTQ:** Pridinriazoloquinolina

**pUC18:** Plásmido 18 de la Universidad de California

**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**<sup>1</sup>H RMN:** Resonancia Magnética Nuclear de Protón

**<sup>13</sup>C RMN:** Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

**Rto:** Rendimiento

**s:** singulete

**SN<sub>2</sub>:** Sustitución Nucleofílica Binuclear

**SOD:** Superóxido Dismutasa

**t:** Triplete

**THF:** Tetrahidrofurano

**Tm:** Temperatura de Fusión

**TMP:** 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona

**trp:** Triptófano

**UV:** Ultra Violeta

**VL:** Leishmaniosis Visceral

**VM:** Verde de metilo



A Joan, Angelines, Núri, Nadia i Mía

A Rosalind Elsie Franklin





## **CAPÍTULO I**

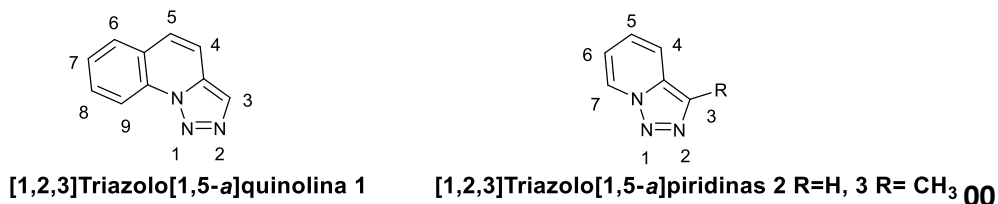
### **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



## 1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Los compuestos aromáticos heterocíclicos son moléculas clave dentro de numerosos campos científicos. Gran cantidad de fármacos, fitosanitarios, y, en definitiva, sustancias con actividad biológica tienen estructura heterocíclica. Es de destacar que los heterociclos son parte fundamental de la química de la vida, ya que gran número de moléculas con funciones biológicas esenciales, tales el ADN, la clorofila o la vitamina C, presentan estructura heterocíclica. Además este tipo de compuestos también tienen una gran importancia dentro de la química de coordinación y en el área de los materiales moleculares.<sup>1</sup>

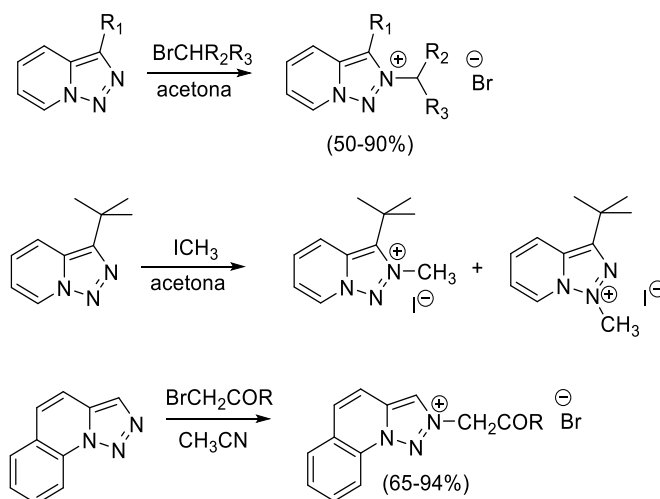
La [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina **1** y las [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridinas **2**, **3** (Figura I-1) son compuestos heterocíclicos que, a pesar de su simplicidad estructural, poseen una reactividad muy peculiar. La química de las Triazolopiridinas ha sido ampliamente desarrollada desde los años 80 fundamentalmente por el grupo del profesor Jones (Universidad de Keele, Gran Bretaña)<sup>2-4</sup> y nuestro grupo de investigación.<sup>4-6</sup>



**Figura I.1:** [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina y [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridinas

Ambos sistemas heterocíclicos poseen dos nitrógenos susceptibles de ser alquilados. Jones, Abarca y colaboradores, han estudiado la reactividad de las triazolopiridinas frente a electrófilos alquilantes, halogenuros de alquilo, determinándose que en todos los casos la posición de alquilación corresponde al nitrógeno N2. Cuando la

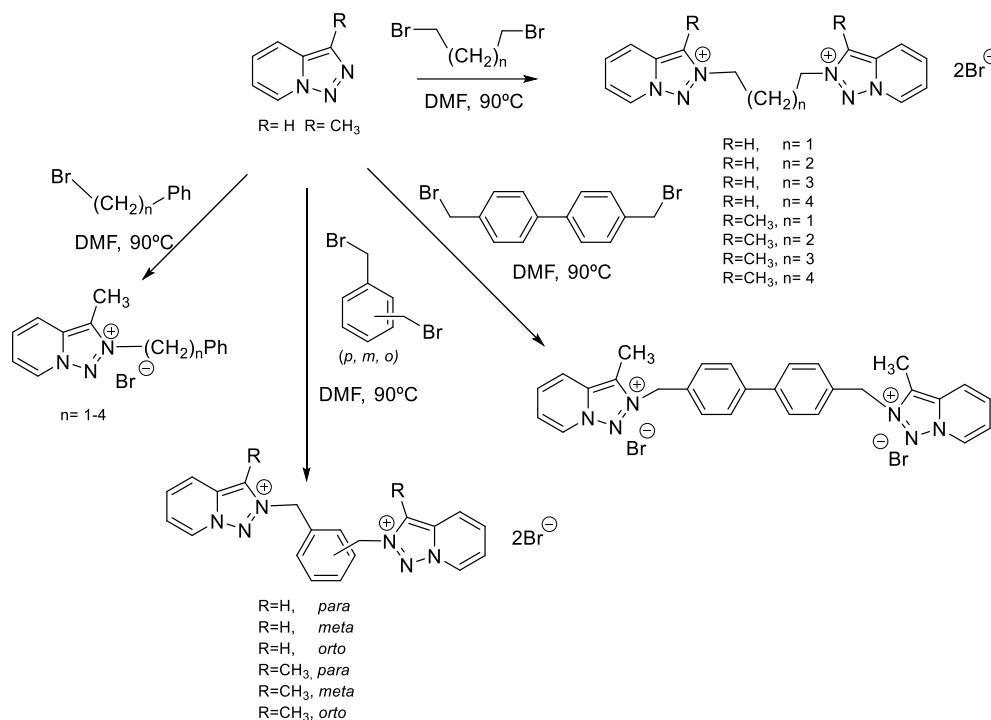
posición C3 esta sustituida por un grupo voluminoso como el t-butilo, la alquilación se produce tanto en el N1 como en el N2. En todos los casos la posición de alquilación se ha determinado mediante análisis de DIFNOE <sup>7</sup> así como por cálculos *ab initio*.<sup>8</sup> También se ha estudiado la alquilación de las triazoloquinolinas, e igualmente se alquilan en el nitrógeno N2 con altos rendimientos, como asimismo se ha demostrado a través de estudios DIFNOE y cálculos.<sup>8-10</sup> (Esquema I.1).



**Esquema I.1** Reacciones de alquilación en triazolopiridinas y triazoloquinolinas

El mecanismo de alquilación es básicamente una reacción  $S_N2$  en la que el ataque del nucleófilo (Nitrógeno N2 del heterociclo) se produce al carbono que contiene el grupo saliente. Este carbono presenta una polaridad positiva considerable, debida a la electronegatividad del halógeno. Al mismo tiempo que ataca el nucleófilo se produce la ruptura del enlace carbono-halógeno, obteniéndose la sal de triazolopiridinio o de triazoloquinolinio. La reacción esta favorecida por disolventes polares y apróticos como acetona, acetonitrilo o DMF.<sup>11</sup>

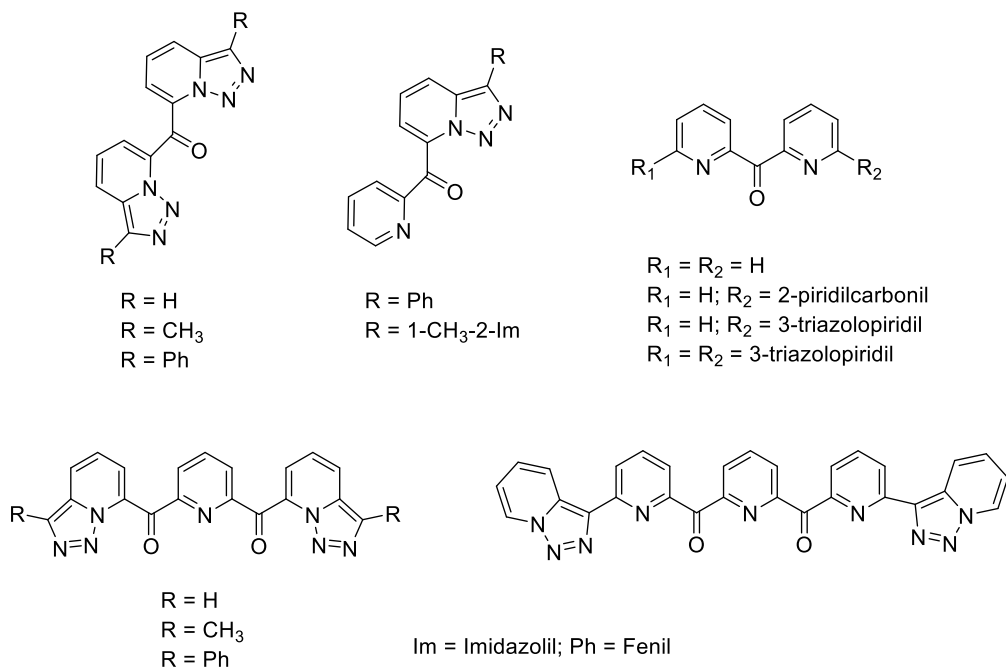
Recientemente, Abarca y colaboradores han preparado unas series de monosales y disales de triazolopiridinio (Esquema 1.2), compuestos que presentan una mayor solubilidad en agua lo que los hace interesantes como compuestos de interés biológico. Estas nuevas sales han mostrado actividad Leishmanicida en diferentes cepas de Leishmania.<sup>12</sup>



**Esquema 1.2:** Obtención de monosales y disales de triazolopiridinio con actividad leishmanicida

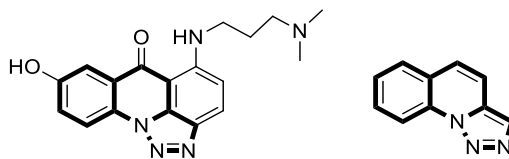
También han sido estudiados derivados de tipo triazolopiridil piridil cetonas, (Figura 1.2) que han mostrado interesantes propiedades biológicas como actividad antichagásica.<sup>13</sup> En ese trabajo, se ha demostrado que estos heterociclos

interaccionan con ADN y, en consecuencia, son susceptibles de ensayarse como antineoplásicos.



**Figura I.2:** Estructuras de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridil piridil cetonas

Derivados de [1,2,3]triazoles han mostrado un gran potencial en actividades anticancerígena y antiprotozoaria. Ejemplos de estos compuestos los constituyen las triazoloquinolonas,<sup>14</sup> las triazolonaftalimidias<sup>15</sup> y especialmente las triazoloacridonas,<sup>16</sup> compuestos estructuralmente relacionados con las triazoloquinolinas, entre ellas es destacable la C-1305,<sup>17</sup> (Figura I.3) ya que es activa frente al cáncer de mama,<sup>18</sup> colon,<sup>19</sup> y leucemia.<sup>20</sup> En estos casos la actividad se debe a su capacidad para inhibir la topoisomerasa II, hecho íntimamente relacionado con su actividad como agente intercalante del ADN.



**Figura I.3.** Triazoloacridona C-1305 y su relación estructural con triazoloquinolona.

Las triazoloquinolinas y triazolopiridinas, son sistemas aromáticos deficientes de electrones, por lo que son susceptibles de comportarse como agentes intercalantes del ADN, especialmente compuestos como la triazoloquinolona que posee tres anillos condensados. Las sales derivadas de estos compuestos al ser catiónicas tendrían previsiblemente mayor capacidad de interactuar con ADN y una mayor solubilidad en agua.

Teniendo en cuenta estos antecedentes los objetivos de esta Tesis han sido:

- Síntesis y estudio espectroscópico de nuevas sales derivadas de la [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolona **1**.
- Estudiar la capacidad de las sales de triazoloquinolinio de interactuar con el ADN y su actividad fononucleasa nucleasa.
- Síntesis y estudio espectroscópico de nuevas sales derivadas de las [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridinas **2** y **3**.
- Estudiar la potencial actividad como anticancerígenos en diferentes líneas celulares de sales de triazoloquinolinio y triazolopiridinio.
- Síntesis, estudio de la potencial actividad frente a Leishmania, de la interacción con ADN y de la interacción con BSA de triazolopiridil aril cetonas.

## 2. BIBLIOGRAFÍA

1. A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F. V. Scriven, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry Vol. I, II, III*, Ed. Elsevier Science Ltd., **1984, 1996, 2008**.
2. G. Jones, D. R. Sliskovic, *Adv. Heterocyclic Chem.* **1983**, *34*, 79.
3. G. Jones, *Adv. Heterocyclic Chem.* **2002**, *83*, 1.
4. B. Abarca, G. Jones, *Adv. Heterocyclic Chem.* **2010**, *100*, 195
5. B. Abarca-González, *J. Enz. Inh. Med. Chem.* **2002**, *17*, 359.
6. B. Abarca, R. Ballesteros-Garrido, *Topics in Heterocyclic Chemistry.* **2015**, *40*, 325.
7. B. Abarca, A. Asensio, R. Ballesteros, J. Bosch, G. Jones, F. Mojarrad, M. R. Metni, C. M. Richardson, *J. Chem. Res., Synop.* **1990**, *9*, *J. Chem. Res., M.* **1990**, 347.
8. G. Jones, C. M. Richardson, P. C. Yates, G. Hajos, G. Timari, *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 4307.
9. N. Houari, *Tesis doctoral, Universitat de València* **2000**.
10. B. Abarca, R. Ballesteros, N. Houari, *Tetrahedron*, **1997**, *37*, 12765.
11. a) F. Carey, R. J. Sundberg *Advanced Organic Chemistry* (4 ed) Kluwer Acad/ Plenum Publ. **2000**. b) Reacciones similares se han descrito para la obtención de inhibidores de la colinesterasa con sistemas piridínicos ver: K. Musilek, M. Komloova, V. Zavadova, O. Holas, M. Hrabnova, M. Pohanka, V. Dohnal, F. Nachon, M. Dolezal, K. Kuca, Y.-S. Jung, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 1763.
12. A. Martín-Montes, R. Ballesteros-Garrido, R. Martín-Escolano, C. Marín, R. Gutiérrez-Sánchez, B. Abarca, R. Ballesteros, M. Sánchez-Moreno, *RSC Advances*, **2017**, *7*, 15715.
13. M. Lapiere, M. C. Zúñiga-López, B. Aguilera-Venegas, R. Adam, B. Abarca, R. Ballesteros, R. López-Muñoz, Juan D. Maya, C. Olea-Azar, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2017**, *17*, 399.



14. (a) T. Aravinda, N. H. S. Bhojya, N. H. R. Prakash, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **2009**, *15*, 273; (b) S.-F. Cui, Y. Ren, S.-L. Zhang, X.-M. Peng, G. L. V. Damu, R.-X. Geng, C.-H. Zhou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 3267.
15. X. Li, Y. Lin, Q. Wang, Y. Yuan, H. Zhang, X. Qian, *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *46*, 1274.
16. (a) K. Lemke, M. Wojciechowski, W. Laine, H. Bailly, P. Colson, M. Baginski, A. K. Larsen, A. Skladanowski, *Nucleic Acids Res.*, **2005**, *33*, 6034; (b) E. Zabost, A. M. Nowicka, Z. Mazerska, Z. Stojek, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2012**, *14*, 3408.
17. W. M. Cholody, S. Martelli, J. Konopa, *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 2852.
18. J. Węsierska-Gądek, N. Zulehner, F. Ferk, A. Składanowski, O. Komina, M. Maurer, *Biochem. Pharmacol.*, **2012**, *84*, 1318.
19. H. Kusnierczyk, W. M. Cholody, J. Paradziej-Lukowicz, C. Radzikowski, J. Konopa, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **1994**, *42*, 415.
20. E. Augustin, A. Moś-Rompa, A. Skwarska, J. M. Witkowski, J. Konopa, *Biochem. Pharmacol.*, **2006**, *72*, 1668.



## **CAPÍTULO II**

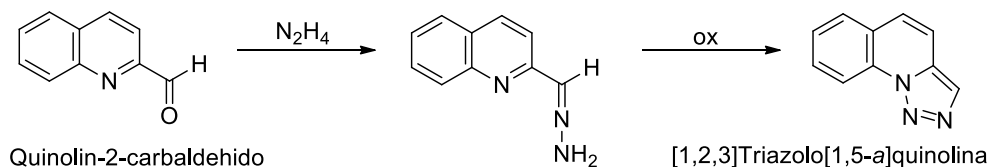
# **SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SALES DE TRIAZOLOQUINOLINIO**



## 1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE LA QUÍMICA DE LAS TRIAZOLOQUINOLINAS

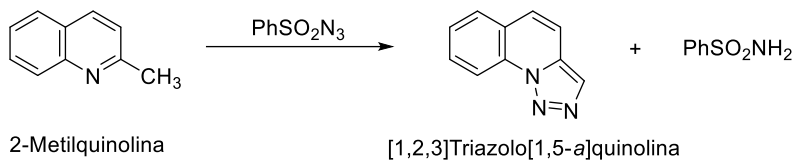
### 1.1. Síntesis de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina

Boyer, Borgers y Wolford,<sup>1</sup> publicaron la primera síntesis de la [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina en tres etapas. En la primera etapa se utiliza la 2-metilquinolina (quinaldina) como producto de partida que se oxida para obtener el 2-quinolincarbaldhído, el cual se transforma en la hidrazona correspondiente por tratamiento con hidracina. Finalmente, la hidrazona se oxida con óxido de plata y sufre una ciclación intramolecular dando lugar a la triazoloquinolina (Esquema II.1).



**Esquema II.1:** Síntesis de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina

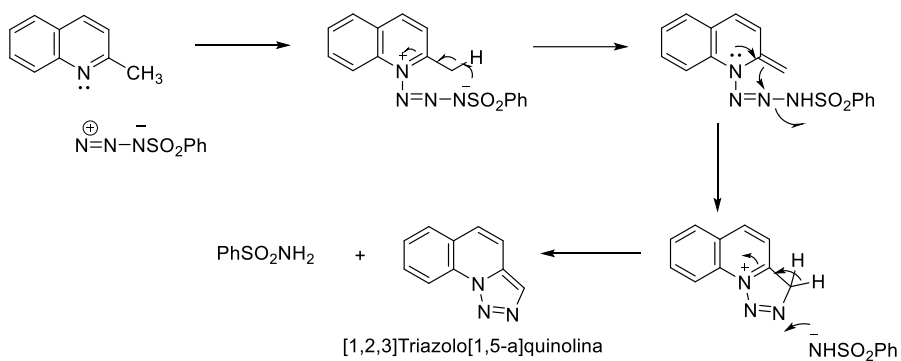
Abramovitch y Takaya,<sup>2</sup> aplicaron una metodología diferente, sin usar agentes oxidantes, para la síntesis del mismo compuesto partiendo también de la 2-metilquinolina. Este procedimiento consiste en hacer reaccionar una disolución de bencenosulfonilazida en 2-metilquinolina, la cual actúa como reactivo y disolvente, a 110-115 °C durante 40h (Esquema II.2). De esta manera se obtiene la triazoloquinolina con un rendimiento del 72%.



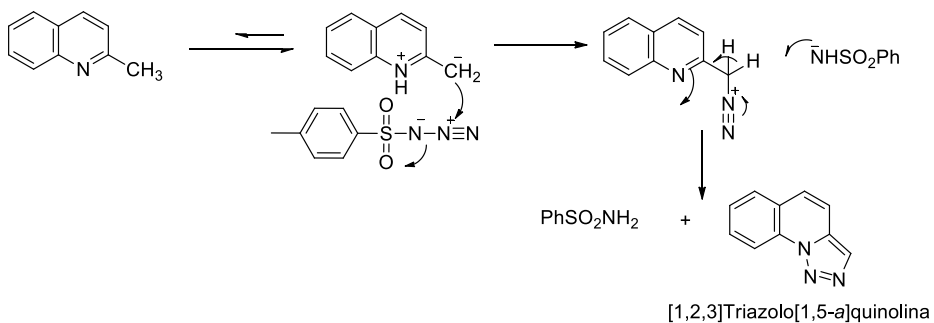
**Esquema II.2:** Síntesis de la triazoloquinolina según Abramovich

Para explicar esta transformación se propusieron 2 mecanismos diferentes (Esquema II.3).

1)

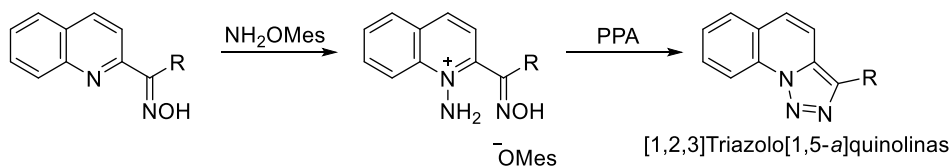


2)



**Esquema II.3:** Mecanismos propuestos por Abramovich para la síntesis de la triazoloquinolina

En 1975, Tamura, Kim y Miki,<sup>3</sup> idearon una nueva ruta de síntesis para las [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinas. En ella, se partía de oximas de sales de *N*-aminoquinolinio. Estas sales se sintetizan a partir de la oxima correspondiente la cual reacciona con *O*-mesitilensulfonilhidroxilamina (MSH). Una vez formada la sal, ésta reacciona con ácido polifosfórico (PPA) a una temperatura de 80-110 °C para dar lugar finalmente a la triazoloquinolina deseada (Esquema II.4).



**Esquema II.4:** Síntesis de la triazoloquinolina según Tamura

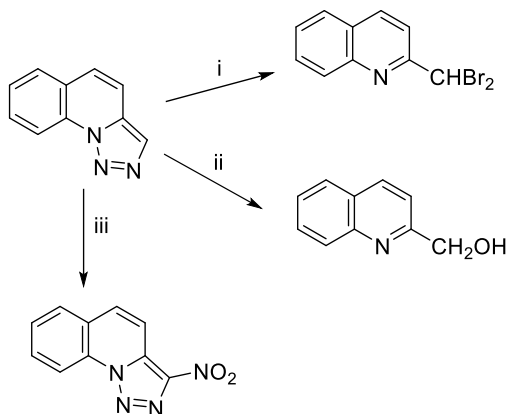
En 1997 en un estudio sobre complejos de cobre con diferentes heterociclos nitrogenados como ligandos, se utilizó la hidrazona de quinolin-2-carbaldehído como ligando potencial, formándose un aducto de Cobre(II), con interesantes propiedades magnéticas, conteniendo como ligando la [1,2,3]triazolo[1,5-*a*] quinolina.<sup>4a</sup> Este resultado constituyó un avance en la síntesis de triazolopiridinas y triazoloquinolinas a partir de hidrazonas por oxidación catalítica con acetato de cobre.<sup>4b</sup>

## 1.2. Reactividad de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinas

### 1.2.1. Reacciones con electrófilos no alquilantes

Las [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinas reaccionan con electrófilos de distintas formas.<sup>5,6</sup> El tratamiento de la triazoloquinolina con bromo da lugar a la apertura del anillo de triazol y pérdida de nitrógeno dando 2-dibromometilquinolina. En la reacción con ácidos minerales como el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se obtiene la 2-hidroximetilquinolina. Sin embargo, en la reacción con ácido nítrico en anhídrido acético se obtiene un producto de

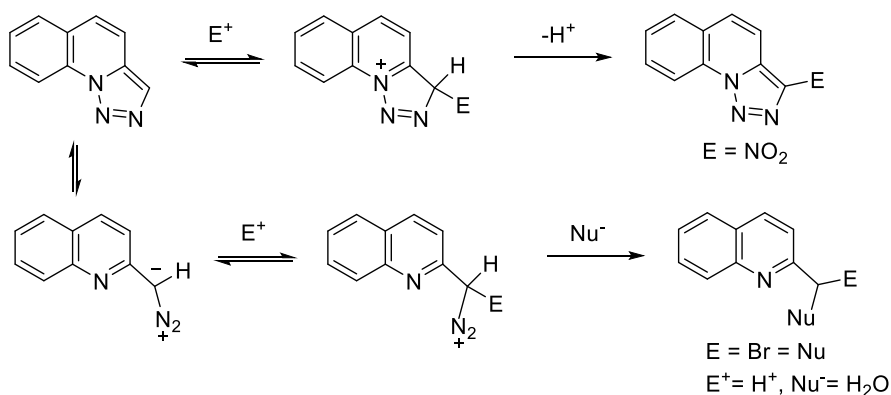
sustitución en la posición 3, que ha sido identificado como 3-nitro-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina (Esquema II.5).



**Esquema II.5.** Reactivos y condiciones de reacción: i)  $\text{Br}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 15-20 °C;

ii)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 100 °C; iii)  $\text{HNO}_3$ ,  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$

Los diferentes resultados obtenidos se pueden explicar por la distinta estabilización del intermedio, en forma triazólica o como diazocompuesto, que producen los electrófilos utilizados (Esquema II.6).

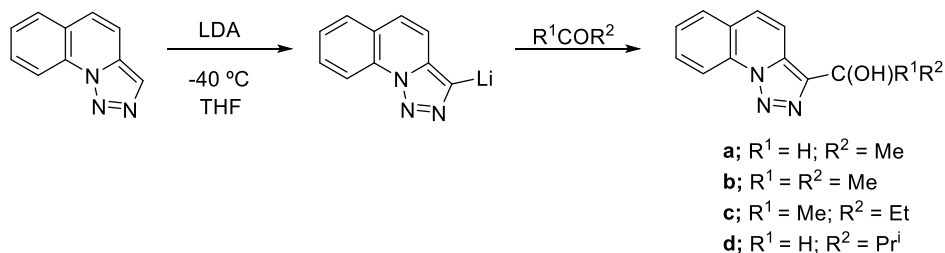


**Esquema II.6:** Explicación mecánica de la obtención de los distintos derivados



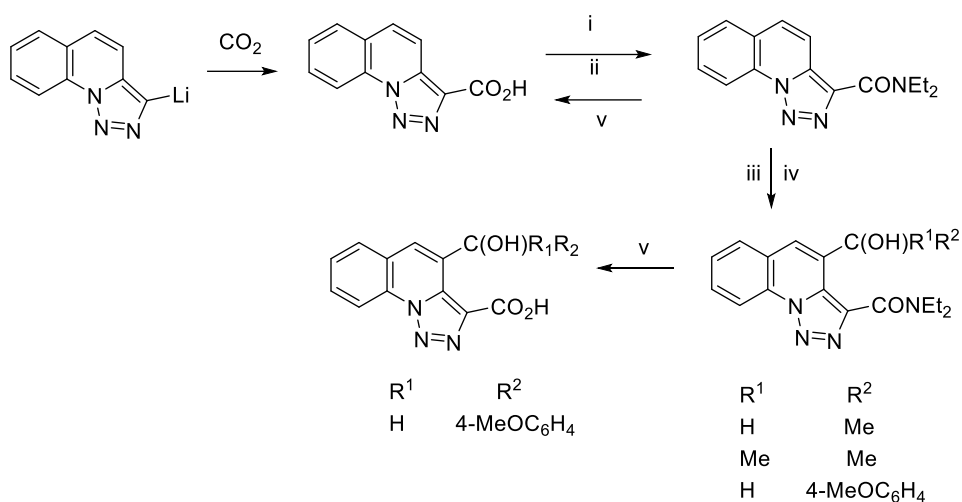
### 1.2.2. Reacciones de litiación

En 1984 Abarca y colaboradores<sup>5,6</sup> fueron los primeros en llevar a cabo reacciones de litiación en [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina. Para ello se utilizó litio diisopropilamida (LDA) como agente litiante obteniéndose el 3-litio derivado que reacciona con aldehídos o cetonas dando lugar a triazoloquinolinas 3-substituidas (Esquema II.7).



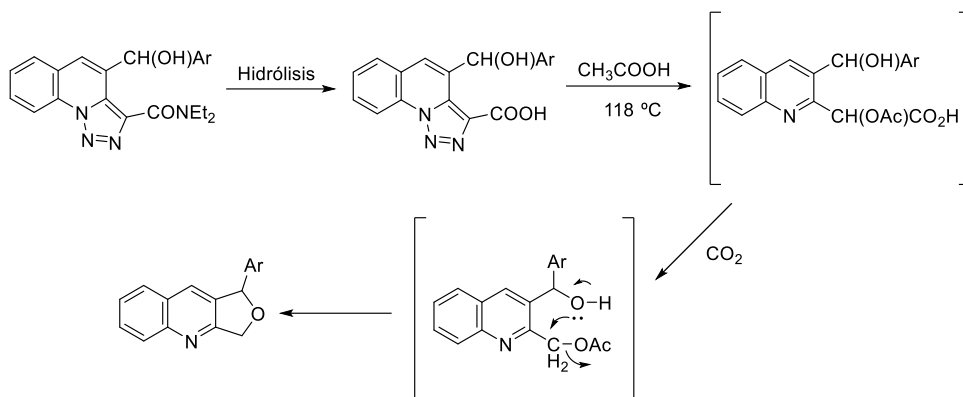
**Esquema II.7:** Obtención de triazoloquinolinas 3-substituidas por reacciones de litiación seguida de tratamiento con electrofilos

Cuando se sustituyó el H3 por un grupo fuertemente orientador, como las amidas terciarias,<sup>7,8</sup> la reacción de litiación se produjo en posición 4, se obtuvieron así triazoloquinolinas 3,4-disustituidas<sup>6</sup> (Esquema II.8).



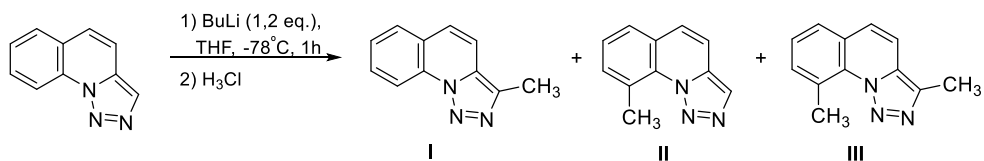
**Esquema II.8:** Síntesis de triazoloquinolinas 3,4-disustituidas. (i)  $\text{SOCl}_2$ , (ii)  $\text{Et}_2\text{NH}$ , (iii) LDA, (iv)  $\text{R}^1\text{COR}^2$ , (v)  $\text{KOH}$ , (vi)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{EtOH}$ , reflujo, (vii)  $\text{Cu}$ , quinolina,  $180^\circ\text{C}$

Estos mismos autores en 1985,<sup>9</sup> utilizaron ácido acético glaciar para las reacciones de apertura de estas triazoloquinolinas 3,4-disustituidas con grupos amida. Éstas se hidrolizaron a su correspondiente ácido, que reacciona con ácido acético glaciar ocurriendo así la apertura del anillo con la consiguiente pérdida de nitrógeno, generando un intermedio que sufre una ciclación intramolecular para dar lugar a la dihidrofuro[3,4-*b*]quinolina, formalmente una quinolina 2,3-disustituida (Esquema II.9).



**Esquema II.9:** Obtención de quinolinas 2,3-disustituidas a partir de triazoloquinolinas.

Como se ha expuesto, bases fuertes como el LDA dan lugar a una metalación únicamente en posición C3. Pero trabajos posteriores dentro de nuestro grupo de investigación,<sup>10</sup> dieron como resultado la obtención de triazoloquinolinas sustituidas en posición 9. Esto se consiguió utilizando otras bases organometálicas además del LDA. Se realizó un estudio en el que se ensayaron diversas bases líticas y condiciones de reacción con el fin de optimizar la reacción. En la mayoría de los casos se obtuvo una mezcla de derivados C3 y C9 mono- y di-sustituidos en diferentes proporciones (Esquema II.10, Tabla II.1).



**Esquema II.10:** Síntesis de triazoloquinolinas 3 y 9 sustituidas

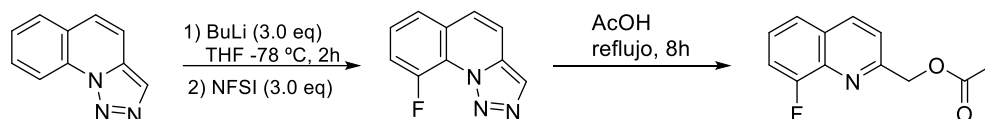
**Tabla II.1:** Diferentes condiciones y disolventes en las reacciones de metalación de triazoloquinolinas

Entrada	Base	Disolvente	t (h)	T (°C)	I	II	III	Conv.
1	LiTMP	THF	2	-78	91	0	9	100%
2	LDA	THF	4	-78	100	0	0	84%
3	t-BuLi	THF	2	-78	88	0	12	100%
4	BuLi (1.2 eq)	THF	1	-78	37	32	31	88%
5	BuLi/KO t-Bu	THF	2	-78	100	0	0	59%
6	BuLi/PMDTA	THF	2	-78	100	0	0	64%
7	BuLi	THF	2 min	-78	41	50	9	82%
8	BuLi	THF	1	-78	50	42	8	75%
9	BuLi	THF	2	-78	54	41	5	71%
10	BuLi	THF	2	0	100	0	0	83%
11	BuLi	Tolueno	2	0	90	3	7	33%
12	BuLi (3.0 eq)	THF	2	-78	0	0	82	100%

Como se puede observar en la tabla II.1, en ninguno de los casos se consiguió obtener selectivamente el derivado C9-monosustituido II. Sin embargo, si se consiguió la conversión completa de la triazolo quinolina en el derivado C3-

monosustituido con buenos rendimientos, al igual que se consiguió la conversión al derivado C9-C3-disustituido.

Cuando se utilizó como electrófilo 3 eq. de *N*-fluorobenzenosulfonimida (NFSI), dio lugar exclusivamente al compuesto monofluorado en posición 9.<sup>10</sup> Tras el tratamiento del compuesto fluorado con ácido acético a reflujo, se obtuvo una 8-fluoroquinolina (Esquema II.11).



**Esquema II.11:** Obtención de fluoro derivados de triazoloquinolina y quinolina

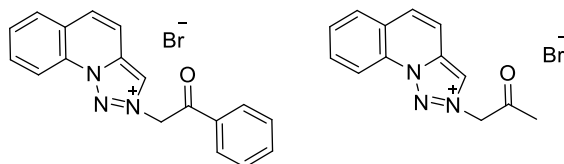
Esto supuso que por primera vez se sintetizaran triazoloquinolinas halogenadas que por reacciones de apertura del anillo de triazol dieron lugar a quinolinas halogenadas con un gran potencial en química farmacéutica.<sup>10</sup>

### 1.2.3. Reacciones de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinas con electrófilos alquilantes. sales de triazoloquinolinio

De los tres átomos de nitrógeno en las [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinas, solo dos son apropiados para la cuaternización.

En 1997, Abarca y colaboradores sintetizaron sales cuaternarias a partir de triazoloquinolinas.<sup>11</sup> Todas estas sales llevan el sustituyente cuaternario en el N2, como se ha comprobado por estudios de DIFNOE. También se hicieron cálculos de orbitales moleculares envolviendo optimizaciones totales de la geometría a niveles RHF/3-21G y RHF/6-31G\*. Se hicieron también cálculos de energía en RHF/6-31G\*

geometrías optimizadas utilizando el paquete GAUSSIAN 94,<sup>12</sup> a nivel de teoría MP2. (Figura II.1). La posición de alquilación está de acuerdo con los cálculos *ab initio*.

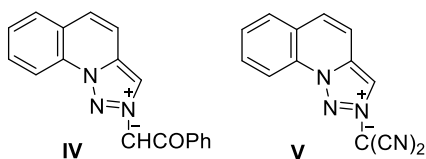


**Figura II.1:** Sales de triazoloquinolinio

Para la síntesis de estas sales se partió de la [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina y una cantidad equimolar de metil bromoacetato o bromuro de fenacilo en acetonitrilo seco durante 3 días. Finalmente se purificaron mediante recristalización.

#### 1.2.4. Síntesis de iluros de triazoloquinolina y su reactividad con dipolarófilos

El iluro **IV** se obtuvo *in situ* a partir de la sal correspondiente, utilizando acetonitrilo anhidro como disolvente y carbonato potásico anhidro,<sup>11</sup> y el iluro **V** se preparó por el método de Linn y colaboradores,<sup>13</sup> con óxido de tetracianoetileno (Figura II.2).

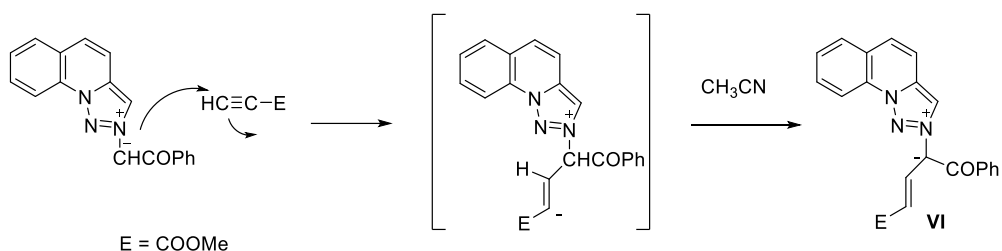


**Figura II.2:** Iluros de triazoloquinolinio

En el mismo trabajo,<sup>11</sup> se estudió la reactividad de los iluros **IV** y **V** con propiolato de metilo, dando diferentes resultados dependiendo del disolvente y del tipo de iluro.

En acetonitrilo, el iluro **IV** dió como resultado el compuesto **VI** con un 52% de rendimiento (Esquema **II.11**).

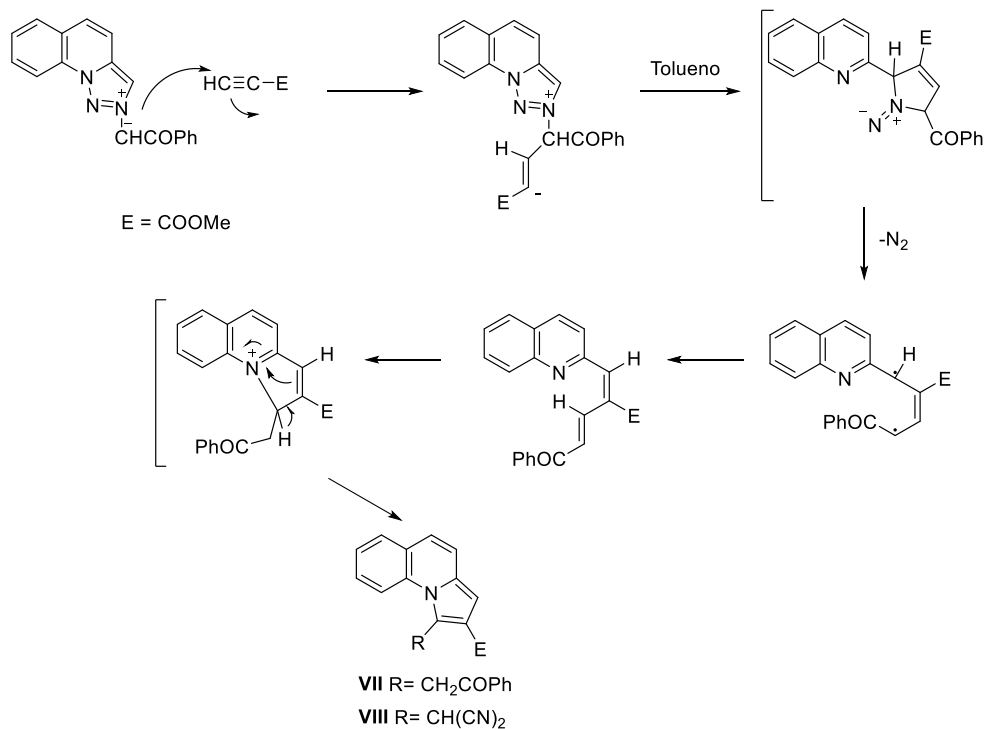
Esta reacción ocurre con un primer paso, una adición nucleofílica tipo Michael, dando lugar a una betaína como intermedio. Cuando el disolvente es polar tiene lugar una transferencia de hidrógeno que rápidamente estabiliza el sistema para dar lugar al compuesto **VI**.



**Esquema II.11:** Síntesis del compuesto **VI**

Utilizando tolueno como disolvente, la reacción con metil propiolato dio como resultado la síntesis de la 1-benzoilmetil-2-metoxicarbonilpirrolo[1,2-*a*]quinolina **VII** con buenos rendimientos (Esquema **II.12**).

En este medio no-polar el proceso es más lento y la reacción tiene lugar en el C<sub>3</sub>, lo que permite la ruptura del enlace N<sub>1</sub>-N<sub>10</sub> dando como resultado un diazeno. Este intermediario pierde nitrógeno para dar un 1,4-dirradical, el cual promueve la formación de un dieno, que sufre una reciclación para finalmente dar como resultado la pirroloquinolina **VII** (Esquema **II.12**).



**Esquema II.12:** Síntesis de los compuestos **VII** y **VIII**

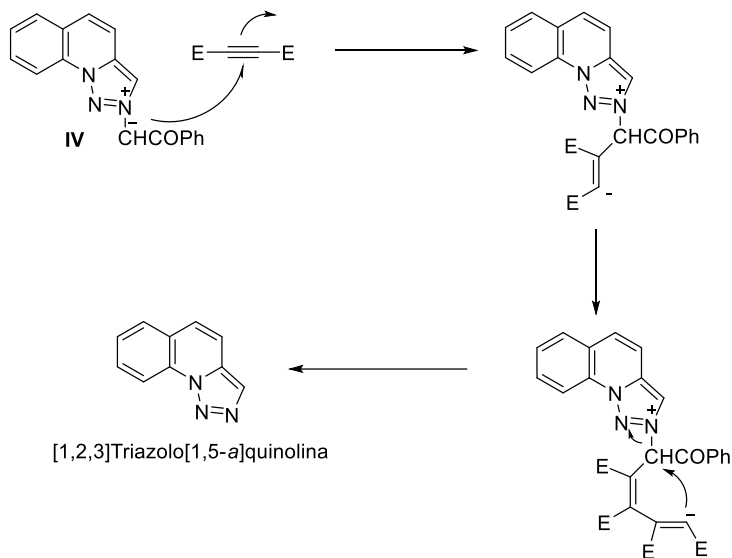
Se estudió también la reacción del iluro **V** con metil propiolato (MP). El resultado fue la síntesis del compuesto **VIII**, cuya formación se explica mediante el mismo mecanismo que para la formación del compuesto **VII**.

Posteriormente se estudió la reacción de los iluros de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinas con dimetil acetilendicarboxilato (DMAD).<sup>14</sup> Los resultados de estos experimentos fueron inesperados, ya que en la reacción del iluro **IV** con DMAD en CH<sub>3</sub>CN se obtuvo la [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina con un rendimiento del 54%.

El mecanismo de reacción, al igual que en la reacción con MP, empieza con una adición de Michael nucleofílica. El iluro **IV** reacciona con DMAD dando lugar a un intermedio de tipo betaína que reacciona con otra molécula de DMAD, dando lugar

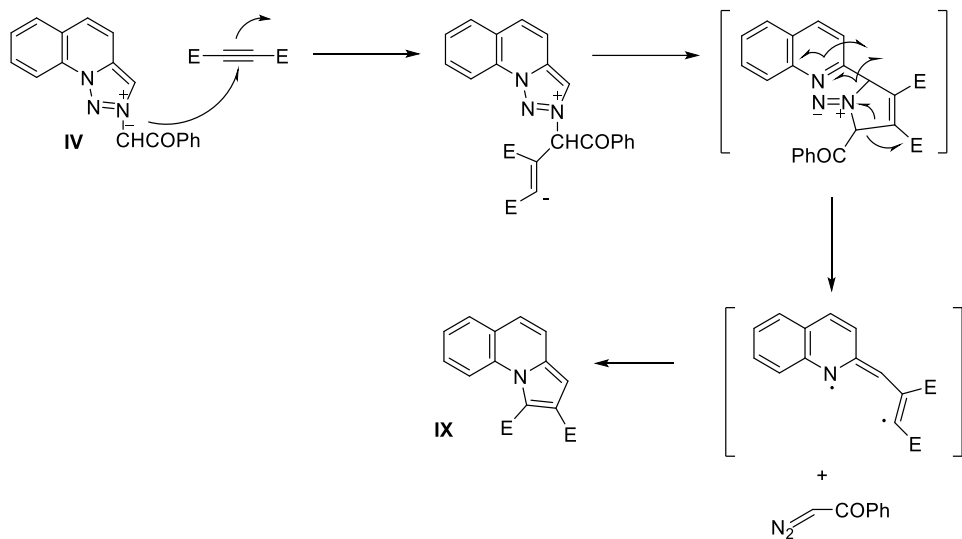


a un nuevo intermedio que por un ataque nucleofílico intramolecular da lugar a la triazoloquinolina (Esquema II.13).



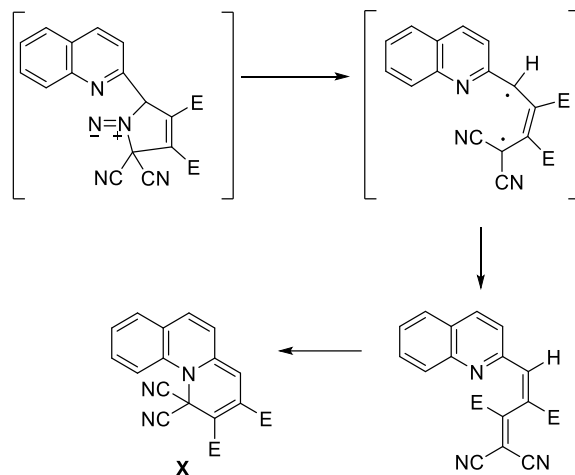
**Esquema II.13:** Reacción del compuesto IV con DMAD

Cuando se utiliza tolueno como disolvente, la reacción del iluro IV con DMAD da como producto mayoritario la triazoloquinolina con un rendimiento del 59%, además de la pirrolo[1,2-*a*]quinolina IX (9%). La formación de la pirroloquinolina se puede explicar mediante el siguiente mecanismo (Esquema II.14), donde un ataque intramolecular competitivo en la posición C3 da un diazeno intermedio. En este caso, la fragmentación del diazeno involucra la pérdida de 2-diazo-1-feniletanona seguida por la ciclación del dirradical formado, dando lugar finalmente al compuesto IX.



**Esquema II.14:** Formación de la pirroloquinolina IX

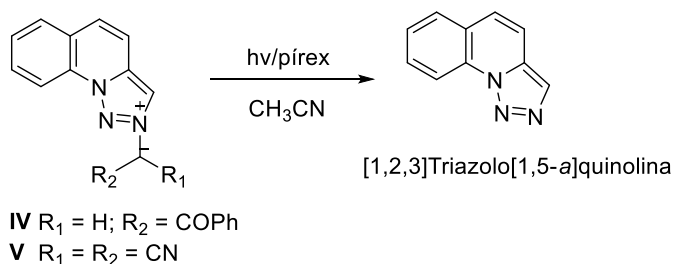
Cuando el iluro **V** reacciona con DMAD, el curso de la reacción es totalmente diferente. Se obtiene el compuesto **X** cuya obtención se puede explicar mediante la pérdida de N del diazeno intermedio dando lugar a un nuevo dieno mediante un 1,4-dirradical. Este dieno forma el sistema benzoquinolizino **X** por un proceso electrocíclico concertado o una adición intramolecular (Esquema II.15).



**Esquema II.15:** Obtención del compuesto **X**

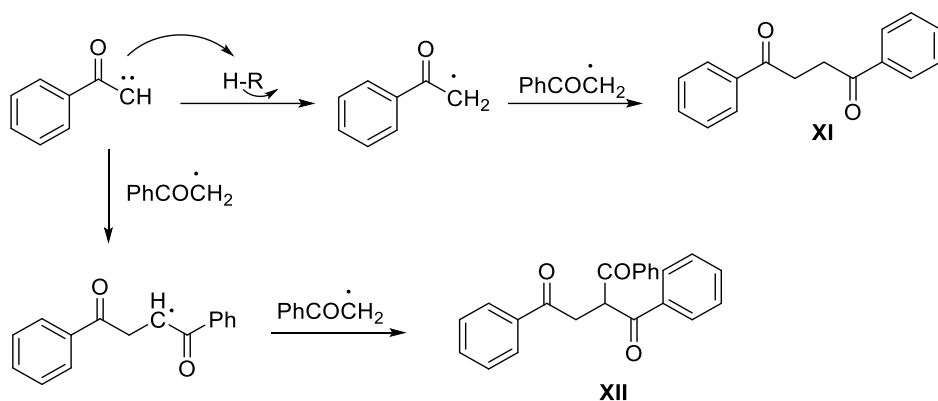
### 1.2.5. Fotoquímica de iluros de triazoloquinolinio

Abarca y colaboradores en el año 2000 estudiaron por primera vez las fotorreacciones de los iluros de triazoloquinolinio. Cuando los iluros de dicianometil y benzoilmetil triazoloquinolininas se someten a irradiación en atmósfera de argón, mediante una lámpara de media presión y en tubos de pírex, se obtiene la [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina mediante la ruptura del enlace iluro  $N^+-C^-$  (Esquema II.16).<sup>15</sup>



**Esquema II.16:** Fotorreacción de iluros de triazoloquinolinio

Cuando la reacción se llevó a cabo con el iluro de benzoilmetiltriazoloquinolina **IV**, se obtuvo también una mezcla de dos productos secundarios **XI** y **XII**, su formación se puede explicar mediante la formación del carbeno correspondiente<sup>15</sup> (Esquema **II.17**). Este carbeno sustrae hidrógeno del disolvente, formando un radical, que sufre una dimerización dando lugar al compuesto **XI**. El carbeno puede reaccionar también con este radical, en cuyo caso se formaría un nuevo radical que reaccionando con el radical inicial, da lugar al compuesto **XII**.

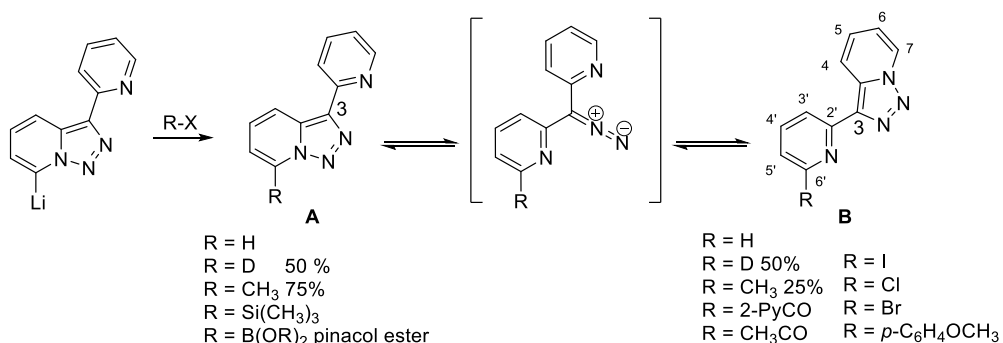


**Esquema II.17:** Productos secundarios en la fotorreacción de iluros de triazoloquinolinio

### 1.3. Equilibrio anillo-cadena-anillo en 3-(2-piridil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*] quinolinas

Las [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinas están relacionadas estructuralmente con las [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridinas. La química de estas últimas está parcialmente ligada a la existencia de una isomerización anillo-cadena entre la forma cerrada del anillo de triazol y la forma abierta del diazo compuesto.<sup>16</sup> Abarca y Ballesteros fueron los primeros en describir que el conocido equilibrio anillo-cadena propio de las triazolpiridinas, daba lugar a un equilibrio anillo-cadena-anillo en la 3-(2-piridil)-triazolopiridina.<sup>17</sup> En este trabajo se sintetizaron un conjunto heterogéneo de

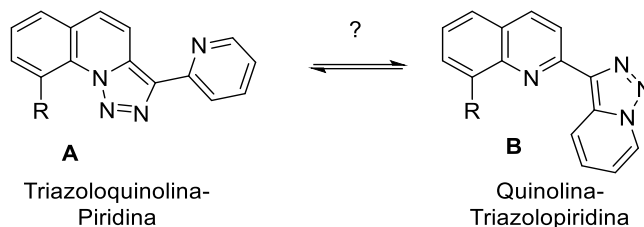
derivados de la triazolopiridina por litiación regioselectiva seguida por reacción con un electrófilo (Esquema II-18). Se utilizaron distintos electrófilos con grupos tanto electrón-atractores como electrón-dadores. Obteniéndose distintos resultados.



**Esquema II.18:** Síntesis de derivados de 3-(2-piridil)-triazolopiridina. Equilibrio anillo-cadena-anillo

Estos resultados llevaron a la conclusión de que los sustituyentes con carácter electrón-atractor, como los halógenos o las cetonas favorecen las estructuras tipo **B**. Sin embargo, los sustituyentes electrón-dadores, como TMS o B(OR)<sub>2</sub>, favorecen las estructuras tipo **A**. Solo se observaron mezclas en los casos de los sustituyentes metilo y deuterio. La influencia de las propiedades electrónicas de los sustituyentes en el equilibrio anillo-cadena-anillo se confirmó mediante un estudio teórico realizado por Elguero y Alkorta.<sup>17</sup>

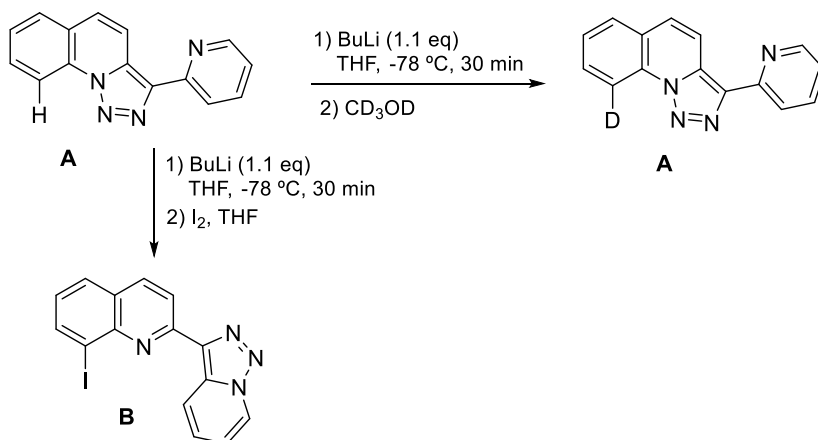
Nuestro grupo de investigación llevó a cabo un estudio para comprobar si las triazoloquinolinas presentaban la misma isomerización que las triazolopiridinas<sup>18</sup> (Esquema II.19).



**Esquema II.19:** Posible isomerización del sistema triazoloquinolina-piridina

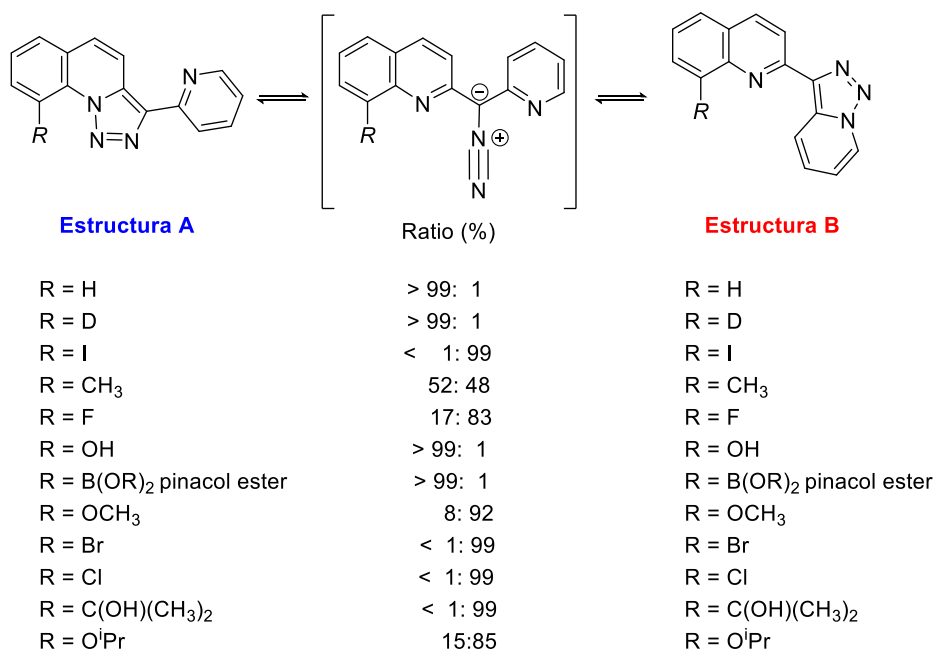
Para ello se sintetizaron nuevas triazoloquinolinas-piridina y se estudió la influencia de los sustituyentes en la isomerización anillo-cadena-anillo y la relativa posición del equilibrio.

La 3-(2-piridin-2-il)-triazoloquinolina (R=H), con estructura **A**, fue tratada con diferentes reactivos para estudiar su comportamiento. La desprotonación con BuLi en THF seguida de la captación del litioderivado con metanol- $d_4$  dio lugar al producto deuterado en posición 9 con estructura **A**. Sin embargo, cuando el mismo litioderivado fue tratado con iodo, se obtuvo un compuesto que resultó tener la estructura tipo **B** (Esquema II.20).



**Esquema II.20:** Equilibrio anillo-cadena-anillo en triazoloquinolinas

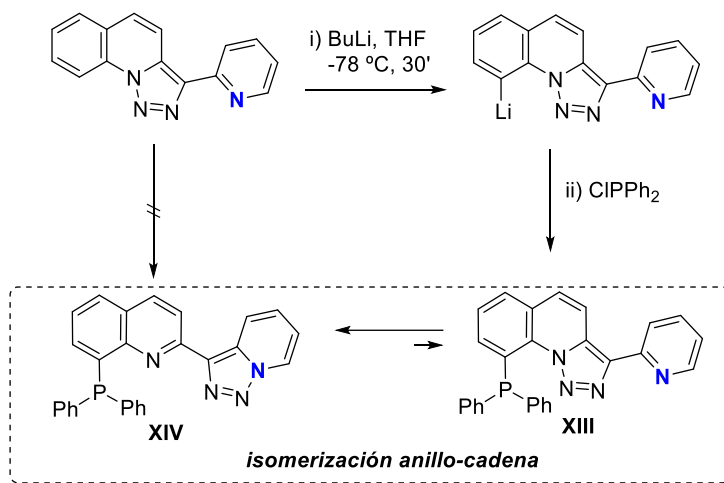
Se prepararon más derivados, con la misma metodología y con diferentes electrófilos para estudiar los efectos de los sustituyentes. Se hizo un estudio teórico (DFT) y experimental. Según los resultados que se obtuvieron, se concluyó que la estructura de los productos finales, tipo **A** o **B**, se puede explicar no sólo por las propiedades electrónicas de los sustituyentes, de manera análoga a lo expuesto para las piridiltriazolopiridinas, sino también en términos de enlaces de hidrógeno y efectos estéricos (Esquema II.21).



**Esquema II.21:** Isomerización del sistema triazoloquinolina-piridina

En estudios posteriores se prepararon derivados de fosfinas basados en piridiltriazoloquinolina como producto de partida con el objetivo de evaluar la influencia de las propiedades estéricas y electrónicas del fósforo en el equilibrio anillo-cadena.<sup>19</sup> El esquema II.22 muestra la propuesta para obtener la fosfina derivada de la piridiltriazoloquinolina. La litación regioselectiva seguida de

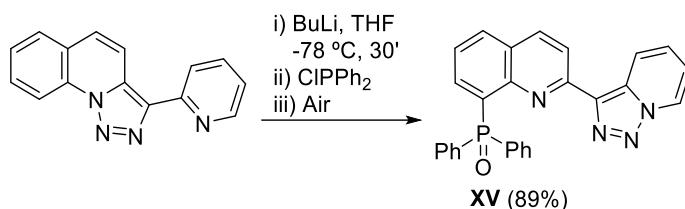
tratamiento con  $\text{ClPPh}_2$  debería dar la correspondiente fosfina **XIII**. Sin embargo, de acuerdo con estudios previos,<sup>18</sup> sustituyentes voluminosos como el grupo  $-\text{PPh}_2$  debería isomerizar a una estructura tridentada *vía* una isomerización anillo-cadena para dar el compuesto **XIV**.



**Esquema II.22:** Planteamiento de síntesis del compuesto **XIV**

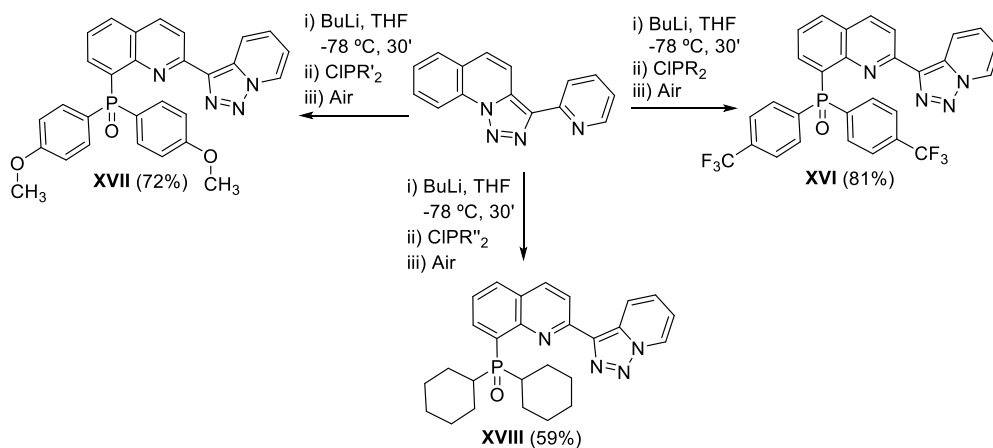
Sin embargo, cuando se llevó a cabo la reacción no se formó la fosfina **XIV**, se obtuvo un compuesto fluorescente, el óxido de fosfina **XV**, con muy buen rendimiento 89% (Esquema II.23). Es un resultado sorprendente ya que es bien conocido que las fosfinas terciarias aromáticas son estables al aire, y si tienen un anillo aromático deficiente, como es la triazoloquinolina deberían ser más estables frente a oxidación.<sup>20</sup>





**Esquema II.23:** Obtención del óxido de fosfina **XV**

Para comprobar el alcance de este comportamiento poco común de la oxidación de las fosfinas de triazoloquinolina, los autores llevaron a cabo un estudio modificando la naturaleza electrónica de los reactivos de fósforo. Cuando se utilizó (*p*-CF<sub>3</sub>-Ph)<sub>2</sub>PCL, electrón-deficiente, se obtuvo también un óxido de fosfina **XVI** con muy buen rendimiento (81%). Empleando condiciones similares, pero con fosfinas ricas en electrones, los correspondientes óxidos de fosfina **XVII**, **XVIII** fueron aislados en rendimientos moderados (Esquema II.24).<sup>19</sup>

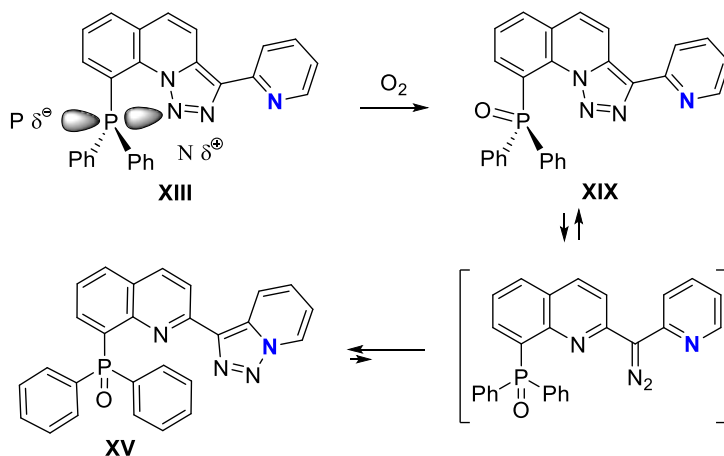


R = *p*-CF<sub>3</sub>-Ph, R' = *p*-CH<sub>3</sub>O-Ph, R'' = ciclohexil

**Esquema II.24:** Nuevos óxidos de fosfina derivados de triazoloquinolina

Para explicar por qué se produce una oxidación espontánea de las fosfinas se ha propuesto que los isómeros tipo **XIII** tienen una geometría particular con una

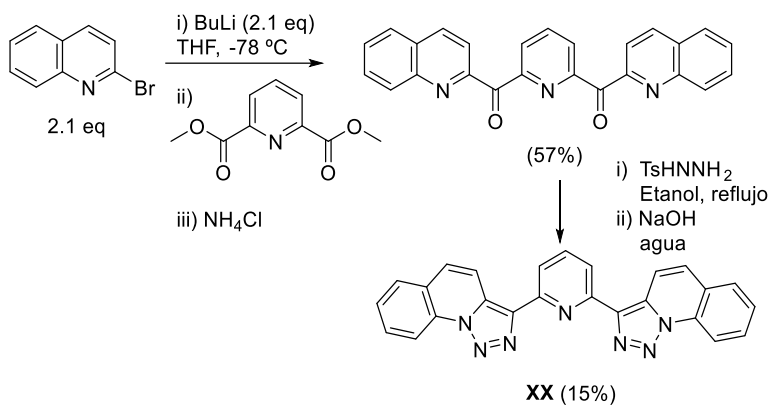
conformación preferente en la que el par electrónico del N1 puede dar una  $\beta$ -donación al fósforo. Esto proporciona un incremento de la densidad electrónica del fósforo y lo hace más susceptible a la oxidación dando el óxido **XIX**. Después se produce la isomerización anillo cadena obteniendo finalmente el compuesto **XV** (Esquema II.25).



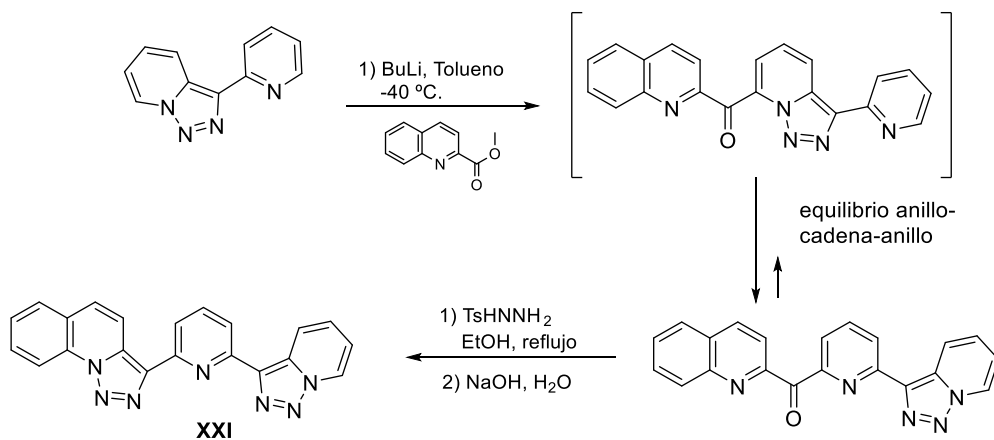
**Esquema II.25:** Mecanismo propuesto para la obtención de **XV**.

#### 1.4. Propiedades fluorescentes de derivados de triazoloquinolina

Los derivados de triazoloquinolina **XX** y **XXI** (Esquemas II.26 y II.27) se han revelado altamente fluorescentes y sensores de cobre.<sup>21</sup> En la tabla II.2 se recogen las características espectroscópicas de emisión de estos compuestos.



**Esquema II.26:** Síntesis de la 2,6-Bis-([1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolin)-piridina **XX**



**Esquema II.27:** Síntesis de la 3-{6-([1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)piridin-2-il}-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina **XXI**

**Tabla II.2:** Propiedades fluorescentes de los compuestos **XX**, **XXI**

Compuesto	$\lambda_{\text{exc}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emi}}$ (nm)	Stokes shift	Rto. cuántico
<b>XX</b>	351	400	49	0.24
<b>XXI</b>	355	406	51	0.19

Cuando un equivalente de cobre se añadió a los compuestos **XX**, **XXI** la emisión prácticamente desapareció. De acuerdo con la literatura,<sup>22</sup> el cambio de fluorescencia producido por  $\text{Cu}^{2+}$  puede ser atribuido a un proceso de transferencia electrónica fotoinducida desde el fluoróforo a orbitales *d* desocupados del centro metálico. La drástica desaparición de la fluorescencia cuando se añade  $\text{Cu}^{2+}$  al compuesto **XX**, y el sencillo proceso para su preparación, hace de este compuesto un interesante quimiosensor *switch-off*.

Las fosfinas heterocíclicas (P-N) y sus correspondientes óxidos tienen aplicaciones significativas en catálisis y como quimiosensores.<sup>23</sup> Con estos antecedentes, Ballesteros-Garrido *et al.*,<sup>19</sup> consideraron interesante estudiar también las propiedades fluorescentes de los compuestos **XV-XVIII**. Todos ellos exhiben una emisión intensa tras la irradiación en su banda de mayor absorción y tienen rendimientos cuánticos altos.

Las correspondientes medidas de las propiedades de emisión de los compuestos **XV-XVIII** se dan en la tabla **II.3**. Sorprendentemente todos ellos exhiben una intensa emisión bajo irradiación a la banda de absorción más alta con altos rendimientos cuánticos.

**Tabla II.3:**  $\lambda_{\text{exc}}$  y  $\lambda_{\text{em}}$  en nm

Entrada	Compuesto	$\lambda_{\text{exc}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	Rto. cuántico
1	<b>XV</b>	376	423	0.54
2	<b>XVI</b>	380	427	0.60
3	<b>XVII</b>	375	419	0.48
4	<b>XVIII</b>	369	404	0.34

Los sustituyentes electrodonantes en la fosfina aromática inducen un desplazamiento hipsocrómico de 4 nm (comparando **XV**: 423 nm con **XVII**: 419 nm) y sistemas más ricos en electrones como **XVIII** presentan un mayor desplazamiento (19 nm). El grupo electrón atrayente trifluorometilo en **XVI** induce un efecto opuesto más significativo (desplazamiento batocrómico) de 4 nm.

Con el objetivo de analizar la viabilidad como sensores para metales, se ha estudiado también el comportamiento luminiscente de los compuestos **XV-XVIII** en presencia de Zn(II) y Cu(II). No se observaron cambios con Zn(II), sin embargo, el Cu(II) induce un cambio de fluorescencia de todos los compuestos. Entre ellos los compuestos **XVII** y **XVIII** tienen las constantes de enlace más altas (Tabla II.4), experimentando un *quenching* total después de la adición de 2 equivalentes de una solución de cobre. Con el compuesto **XVIII** se hizo también un estudio con más metales, con soluciones etanólicas de Zn(II), Co(II), Ni(II), Mn(II), Pb(II), Cd(II), Ag(I), Fe(II) y Fe(III). El *quenching* completo sólo fue observado con Cu(II). Es interesante destacar que la presencia de otros metales no impide el *quenching* con cobre, sólo con Fe(III) se presentan interferencias.<sup>19</sup>

**Tabla II.4:** Constantes de enlace con cobre

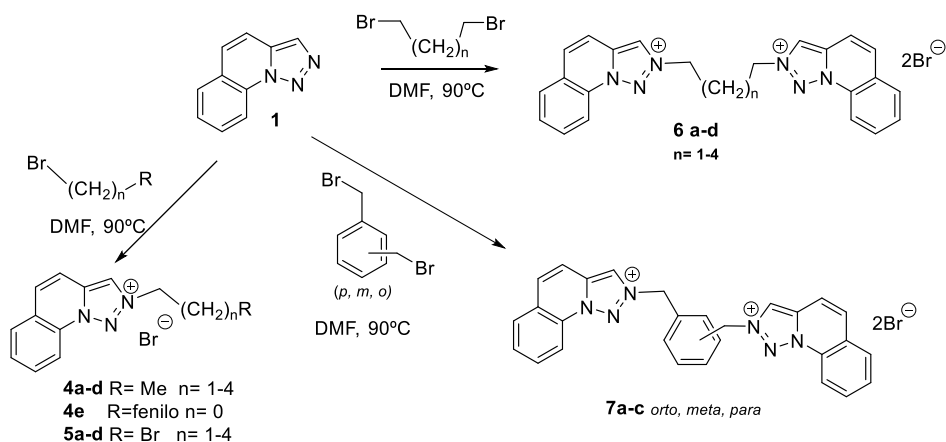
	<b>XV</b>	<b>XVI</b>	<b>XVII</b>	<b>XVIII</b>
log K	4,05(1)	4,56(8)	4,836(8)	5,016(8)

## 2. RESULTADOS Y DISCUSION

El primer objetivo de los planteados en la Introducción, la síntesis y la caracterización espectroscópica de los compuestos monocatiónicos y dicatiónicos derivados de la [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina **1**, se describen en este capítulo.

### 2.1. Síntesis

Se han preparado los compuestos monocatiónicos **4a-4e** y **5a-5d**, en rendimientos de moderados a excelentes según los casos, a partir de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina **1** por reacción con bromuros de alquilo  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{Br}$  en exceso ( $n=1,2,3,4$ ), con bromobencilo o con dibromoalcanos  $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{Br}$  ( $n=1,2,3,4$ ) en DMF a 80 °C. También se han preparado los compuestos dicatiónicos **6a-d** y **7a-c** (Esquema II.28) usando exceso de triazoloquinolina en DMF a 90 °C obteniéndose en estos casos rendimientos de buenos a excelentes.



**Esquema II.28:** Síntesis de monosales y disales de triazoloquinolinio.

Una particularidad a tener en cuenta es la solubilidad de los productos obtenidos, en el caso de las monosales, precipitan al añadir acetato de etilo y generalmente por lavado sucesivo con AcOEt y sonicación las monosales quedan puras ya que los productos de partida son solubles en el disolvente de lavado. En el caso de los compuestos derivados de triazoloquinolina no siempre se han obtenido las monosales puras por este procedimiento y han sido purificadas por cromatografía en columna de sílice usando AcOEt/metanol como eluyente. En el caso de las disales su polaridad permite una purificación fácil solo mediante lavado con AcOEt y sonicación posterior a la filtración a vacío.

## 2.2. Caracterización espectroscópica

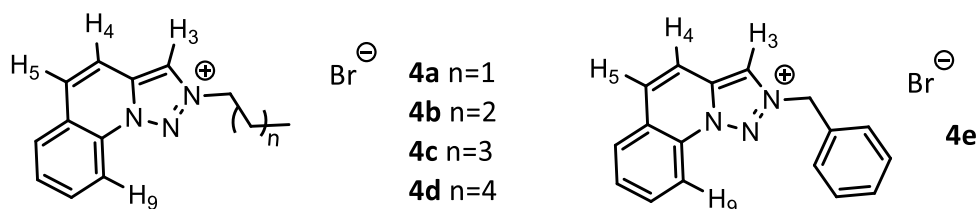
### 2.2.1. Propiedades espectroscópicas de las monosales de triazoloquinolinio

En esta sección se estudiarán las propiedades espectroscópicas, especialmente masas y resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para la caracterización de las

monosales **4,5**. También se analizan las diferencias existentes al aumentar el tamaño de la cadena carbonada en la posición de alquilación N2. Para su estudio los compuestos obtenidos se clasifican en las series **A** y **B**.

**Serie A. Compuestos 4a-4e.**

Los bromuros **4a-4e** son sólidos de color blanco que oscurecen al aire (Figura II.3)

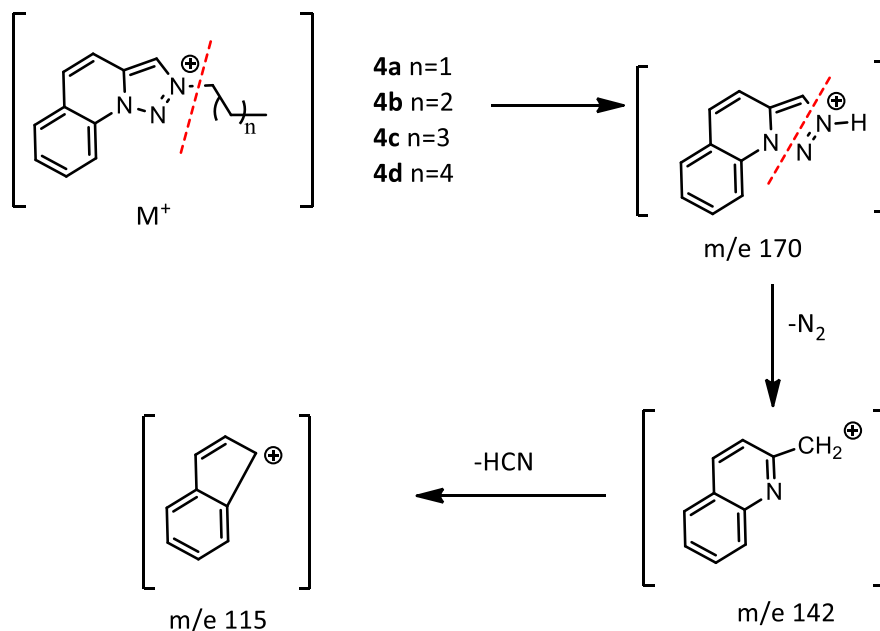


**Figura II.3:** Compuestos de la **Serie A**

En masas de alta resolución presentan el ion molecular correspondiente en la forma catiónica ( $M^+$ ) a 212, 226, 240 y 255 m/e respectivamente. Un estudio de fragmentación por ESI muestra señales a 170, 142 y 115 m/z con diferentes intensidades.

El ión a 170 corresponde a la triazoloquinolina protonada tras la ruptura de enlace N2-C. El ión a 142m/e corresponde a la pérdida de nitrógeno molecular del ión a 170, este tipo de pérdida es característica de las triazolopiridinas y benzoanálogos.<sup>24</sup> Por último, el fragmento a 115 corresponde a una pérdida de ácido cianhídrico (HCN) que, aunque compleja de explicar, es característica de fragmentos quinolínicos para dar el ion indeno que como es muy estable suele ser el pico base<sup>24</sup> (Esquema II.29).





**Esquema II.29:** Esquema de fragmentación de monosales de triazoloquinolinio de **4a-d**

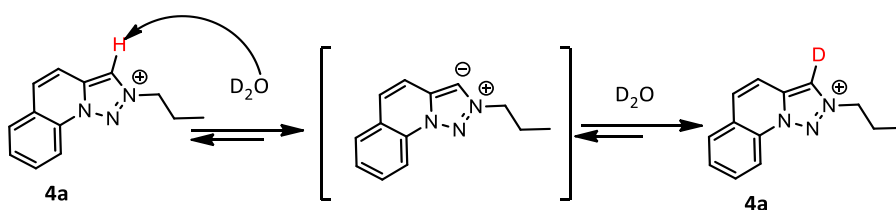
En el espectro <sup>1</sup>H-NMR en metanol-d<sub>4</sub> de los derivados **4a-4c** y en D<sub>2</sub>O para el derivado **4d** (Tabla II.5) no se observan cambios importantes en relación al desplazamiento químico de los protones aromáticos en la triazoloquinolina de partida. La alquilación se produce en el N2 tal como estableció en trabajos anteriores de Abarca *et al.*<sup>25</sup> en triazolopiridinas (como se ha expuesto en los antecedentes bibliográficos). El protón H3 es el más desapantallado a valores de 9.32 ppm para **4a**, 9.48 y 9.46 ppm para **4b** y **4c**. En D<sub>2</sub>O se observa una deuteración parcial del H3 en todos los compuestos dependiendo del tiempo, siendo total en el compuesto **4d**. El metileno unido al nitrógeno positivo (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>) se encuentra muy desapantallado en todas las monosales con valores entre 4.93 y 5.05 ppm, como consecuencia del fuerte efecto inductivo ejercido por este nitrógeno positivo.

**Tabla II.5:** Desplazamiento químico en  $^1\text{HRMN}$  (metanol- $d_4$ ) de las señales más representativas de los compuestos de **4a-d**

Compuesto	H <sub>3</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>9</sub>	NCH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>4a</b>	9.32	8.26	8.78	4.93	1.12
<b>4b</b>	9.48	8.12-7.86	8.77-8.55	5.05	1.08
<b>4c</b>	9.46	8.14-7.85	8.80-8.62	5.0	1.10
<b>4d*</b>	**	8.11	8.60	4.94	0.88

\*Registrado en  $\text{D}_2\text{O}$ . \*\* No se observa, intercambiado por deuterio

La deuteración parcial del H3 se puede explicar teniendo en cuenta que su acidez está directamente relacionada con el carácter catiónico del N2, y que en presencia de un disolvente como el agua deuterada o metanol deuterado, se produce un equilibrio para dar lugar a un iluro que rápidamente captura un deuterio del disolvente (Esquema II.30). Este proceso es similar al de la Tiamina en su función de coenzima.<sup>26</sup>



**Esquema II.30:** Mecanismo de deuteración del compuesto **4a**.

Al igual que en los espectros  $^1\text{H-NMR}$ , en los espectros de  $^{13}\text{C-NMR}$  tampoco se observaron cambios significativos (Tabla II.6). Cabe destacar el fuerte desapantallamiento del metileno unido al nitrógeno N2 quinolínico que presenta

valores de 57.45 a 55.04 ppm de **4a** a **4d**. Estas variaciones están justificadas por la presencia de metilenos en posiciones  $\gamma$  y  $\delta$ .<sup>27</sup>

**Tabla II.6:** Desplazamiento químico en <sup>13</sup>C RMN (metanol-d<sub>4</sub>) de las señales más representativas de los compuestos de los compuestos **4a-d**

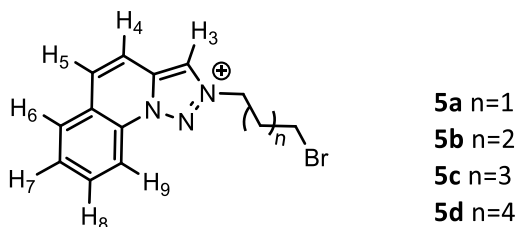
Compuesto	CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> Calcd**
<b>4a</b>	57.45	11.05	56.0
<b>4b</b>	55.79	13.80	53.5
<b>4c</b>	56.02	14.18	53.8
<b>4d*</b>	55.04	13.59	53.8

\*Registrado en D<sub>2</sub>O. \*\*Calculado con Chemdraw

El compuesto **4e** se preparó por reacción de la triazoloquinolina con bromuro de bencilo en dimetilformamida en las mismas condiciones que las demás sales **4a-4d**. Es un sólido blanco que cristaliza en una mezcla metanol/agua. El espectro de masas de alta resolución dio una masa de 260.1171 correspondiente a una fórmula C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub><sup>+</sup>. El espectro de <sup>1</sup>H RMN mostró el protón H3 a 9.08 ppm este protón se intercambia rápidamente con deuterio tras unas horas en el mismo tubo de resonancia. El protón H9 está desapantallado a 8.2 ppm y aparece como un doblete con una constante de 8.2 Hz. Uno de los protones del sistema AB del núcleo de la triazoloquinolina, el H5 se identifica a 7.85 ppm y tiene una constante de acoplamiento ligeramente mayor 9.2 Hz. El metileno unido directamente al N2 de la triazoloquinolina aparece a 6.02 ppm como consecuencia del efecto electrón atractor del nitrógeno positivo y el efecto desapantallante del grupo fenilo. En el espectro de <sup>13</sup>C RMN destaca este metileno a 58.97 ppm.

## Serie B. Compuestos 5a-5d

Paralelamente se estudiaron los compuestos derivados de la Serie **B 5a-5d**. Estos compuestos son también sólidos blancos que se oscurecen en presencia de luz (Figura II.4).



**Figura II.4:** Compuestos de la Serie B

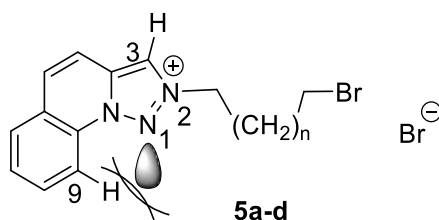
Los espectros de masas de alta resolución, muestran un comportamiento similar tanto con la serie **A** como dentro de la propia serie (ver parte experimental). Obviamente el ion molecular  $M^+$  aparece acompañado de un pico a  $(M+2)^+$ , como corresponde a la presencia de bromo ( $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ ).

En esta serie **B**, (ver tabla II.7) las fragmentaciones son similares a las de la serie **A** apareciendo fragmentos a 170, 142 y 115 m/z. Estas fragmentaciones corresponden a la pérdida de la cadena (170 m/e) seguida de la pérdida de  $\text{N}_2$  (142 m/e) y finalmente la pérdida de ácido cianhídrico para dar lugar al ion indeno (115 m/e) que es el pico base (PB).

**Tabla II.7:** Iones moleculares y fragmentaciones obtenidas en Espectrometría de Masas de baja resolución la serie **B**

Compuesto	[M+2] <sup>+</sup>	[M] <sup>+</sup>	PB (100%)	Otros
<b>5a</b>	292	290	115	142
<b>5b</b>	306	304	115	-
<b>5c</b>	320	318	115	170-142
<b>5d</b>	334	332	115	170-142

Respecto a los espectros <sup>1</sup>H-NMR, en la zona aromática presenta características muy similares a la serie **A** (Tabla II.8), ya que estructuralmente solo se diferencian por un bromo terminal en la cadena alquílica. El H3 también se encuentra parcialmente deuterado en **5a** y en **5b** cuando se utiliza D<sub>2</sub>O como disolvente, siendo los desplazamientos entre 9.11 y 9.06 ppm. Es interesante destacar que los H9 están desapantallados, presentándose a valores entre 8.41 y 8.65 ppm, lo que puede ser debido a que el carácter electrón aceptor del bromo en la cadena carbonada ejerce una mayor atracción electrónica sobre el anillo por lo que el N1 tiene una menor densidad electrónica y produce el desapantallamiento de los H9 (Figura II.5).



**Figura II.5:** Efectos anisotrópicos sobre el H9

En relación al H5, éste forma parte de un sistema AB y aparece como un doblete entre 8.09-8.13 ppm con una constante de acoplamiento de 9.2 Hz.

**Tabla II.8:** Desplazamiento químico (ppm) en  $^1\text{HRMN}$  de las señales más representativas de los compuestos de la serie **B**

Compuesto	H3	H5	H9	NCH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> Br
<b>5a</b>	9.11	8.13	8.65	5.10	3.55
<b>5b</b>	9.07	8.09	8.61	4.96	3.55
<b>5c</b>	9.06	8.09	8.60	4.93	3.50
<b>5d</b>	9.11	8.04-7.99	8.41	4.93	3.45

Los metilenos unidos al N2 triazolínico, se desapantallan más en cadenas cortas, siendo de 5.10 ppm para **5a** y 4.93 ppm para **5c** y **5d**. Este hecho es coherente con el efecto inductivo del átomo de bromo, el cual disminuye con la longitud de la cadena.

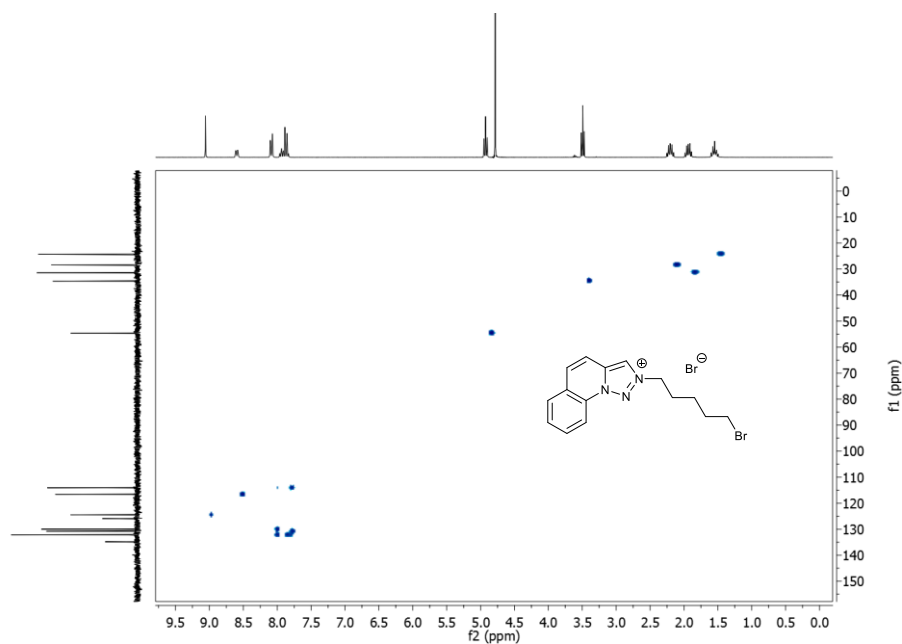
Respecto a los espectros  $^{13}\text{C}$  NMR, todos los compuestos de esta serie, presentan las señales correspondientes tanto en la zona aromática como en la alifática (Tabla II.9) Aunque cabe destacar que los C3 se encuentran entre 124 y 128 ppm y se han podido asignar gracias al espectro HSQC (heteronuclear single quantum correlation) del compuesto **5c** en D<sub>2</sub>O (Figura II.6).

Los metilenos unidos al N2 están en el intervalo 52-54 ppm mientras que los metilenos unidos al bromo se encuentran entre 31-35 ppm.

**Tabla II.9:** Desplazamiento químico  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de las señales más representativas de los compuestos de la serie B

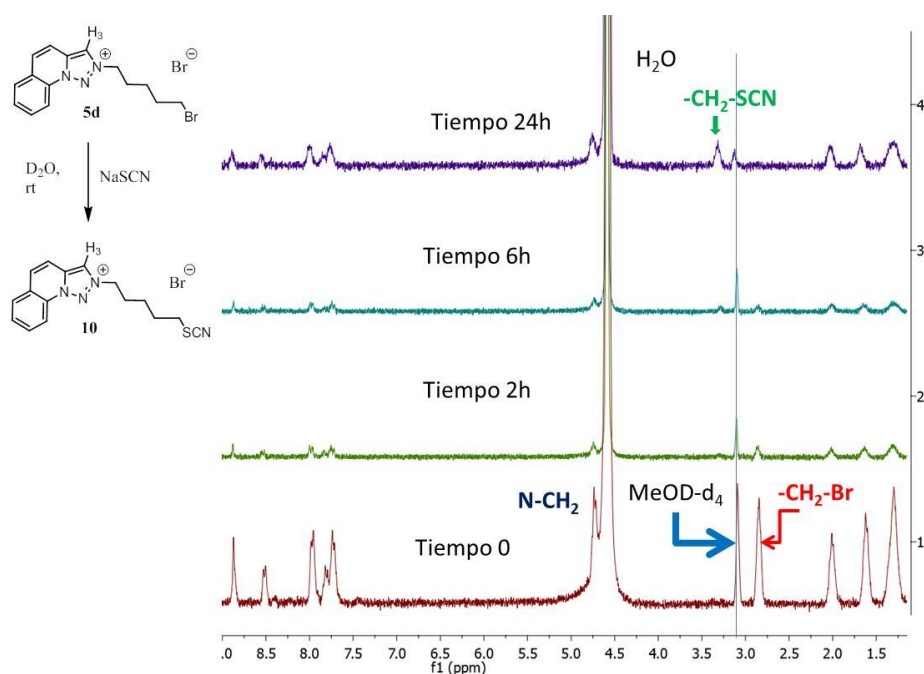
Compuesto	$\text{CH}_2\text{-N}^+$	$\text{CH}_2\text{-Br}$	$\text{CH}_2\text{-N}^+\text{Calcd}^*$	$\text{CH}_2\text{-Br Calcd}^*$
5a	52.78	31.57	52.2	31.7
5b	53.74	33.12	52.8	33.4
5c	54.71	34.64	53.8	33.7
5d	54.97	35.40	53.8	33.7

\*Calculado con Chemdraw



**Figura II.6:** HMQC del compuesto 5c

Un aspecto interesante en esta serie era comprobar la capacidad de sufrir una reacción de sustitución nucleofílica en el metileno unido al bromo en presencia de agua o con otros nucleófilos presentes. Este metileno está desapantallado como corresponde a un haluro de alquilo primario presentando señales entre 3.45-3.55 ppm en el espectro de protón y en consecuencia podría sufrir una reacción SN<sub>2</sub>. No hemos observado reacción con el agua como disolvente y nucleófilo. Sin embargo, cuando en la disolución de **5d** en D<sub>2</sub>O se añade tiocianato sódico se produce la sustitución del bromuro por el grupo tiocianato y a las 24h a temperatura ambiente la reacción es completa como se observa por RMN (Figura II.7). Este sencillo experimento, muestra que este metileno es sensible a los nucleófilos en medio acuoso.<sup>28</sup>



**Figura II.7:** Control por RMN de la reacción del compuesto **5d** con tiocianato sódico



## 2.2.2. Propiedades espectroscópicas de las disales de triazoloquinolinio

### Serie C. Compuestos **6a-d** y **7a-c**

Las disales de triazoloquinolinio **6** y **7** son sólidos de alto punto de fusión, higroscópicos y muy insolubles en disolventes orgánicos como corresponde a sistemas dicatiónicos.

Los espectros de masas de alta resolución mostraron que el ion molecular se presenta a  $m/2$  como se observa en la tabla **II.10**, al ser compuestos dicatiónicos. No se presentan fragmentaciones significativas.

**Tabla II.10:** Iones moleculares obtenidos en Espectrometría de Masas de las disales **6a-6d** y **7a-7c**

Compuesto	PM	HRMS calc. PM/2	HRMS exp.
<b>6a</b>	380.1738	190.0869	190.874 C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> <sup>2+</sup>
<b>6b</b>	394.1894	197.0947	197.0948 C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> <sup>2+</sup>
<b>6c</b>	408.2056	204.1028	204.1027 C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> <sup>2+</sup>
<b>6d</b>	422.2208	211.1104	211.1104 C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> <sup>2+</sup>
<b>7a</b>	446.2200	221.0947	221.0957 C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> <sup>2+</sup>
<b>7b</b>	446.2200	221.0947	221.0952 C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> <sup>2+</sup>
<b>7c</b>	446.2200	221.0947	221.0949 C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> <sup>2+</sup>

En  $^1\text{H}$  RMN (Figura II.8) usando óxido de deuterio como disolvente se observa que el H3 del compuesto **6a** es más ácido que en el resto de compuestos de la misma familia. Por ello, se deuteria parcialmente de manera rápida con  $\text{D}_2\text{O}$ , de forma análoga al efecto descrito para los compuestos **4a** y **5a**, este efecto es consecuencia de la baja densidad de carga en el  $\text{N}2$  provocada por la cuaternización y el efecto inductivo del otro  $\text{N}2$  también cuaternizado. El desplazamiento de los  $\text{CH}_2\text{-N}^+$ , está sobre 5 ppm dependiendo de la longitud de la cadena.

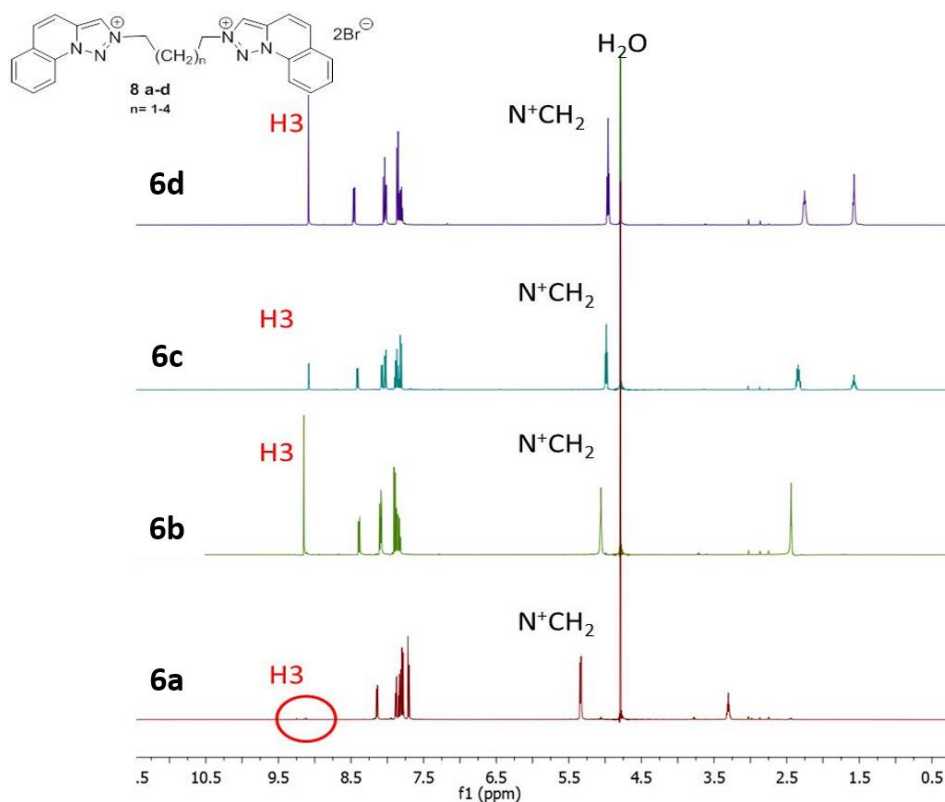
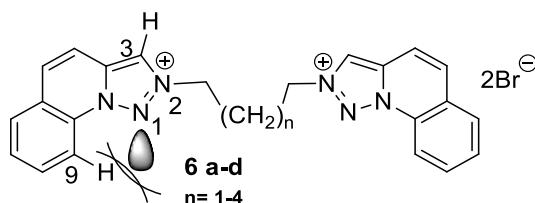


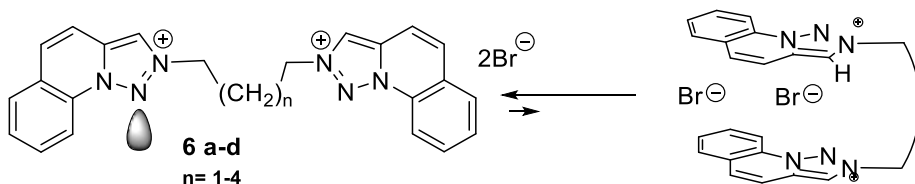
Figura II.8: Espectros de  $^1\text{H}$  RMN de las disales **6a-6d**

Otro punto a destacar, es que el H9 se desapantalla desde ( $\delta = 8.1$ ) para el compuesto **6a** hasta ( $\delta = 8.46$ ) para el compuesto **6d**. Como se ha visto que ocurría en la serie B para los compuestos **5**, y de manera similar se produce una disminución de la densidad electrónica en los anillos, en este caso por ser dicaciones, y la interacción con el N1 produce el desapantallamiento de los H9 (figuras **II.8** y **II.9**), naturalmente en el compuesto **6a** es mucho más visible que en los demás compuestos **6b-6d**. Además, se produce un cambio en los protones del sistema AB (protones H4 y H5) y en el H6.



**Figura II.9:** Efectos anisotrópicos sobre el protón H9

En ningún caso se observan efectos anisotrópicos asociados a una conformación plegada<sup>29</sup> (Figura **II.10**) como en los casos estudiados por Fossey y colaboradores,<sup>30</sup> básicamente porque al ser sistemas solubles solo en agua, la solvatación y la repulsión electrostática dominan sobre cualquier otro factor que pudiese inducir interacciones enlazantes débiles (catión- $\pi$ , anión- $\pi$ , apilamiento...).



**Figura II.10:** Equilibrios conformacionales en las disales **6a-6d**

Respecto a los espectros RMN de  $^{13}\text{C}$ , en éstos no se aprecia ningún cambio significativo que aporte datos interesantes a los datos ya comentados sobre los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

Por último y con respecto a los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de las sales **7a-7c**, disales que poseen como puente anillos bencénicos disustituídos, son difícilmente interpretables como se observa en la figura II.11. En el caso de **7a** y **7c**, el protón H3 es más ácido y se deutera completamente. Sin embargo, en el compuesto meta sustituido **7b** el protón H3 no se deutera tan rápidamente. Para estos compuestos el  $\text{CH}_2\text{-N}^+$  se presenta a 6-6.5 ppm. Los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  están de acuerdo con la estructura propuesta y los metilenos unidos al N2 están en el rango de 56.14 ppm para el compuesto *meta* y 56.84 y 58.56 ppm para los compuestos *orto* y *para* respectivamente.

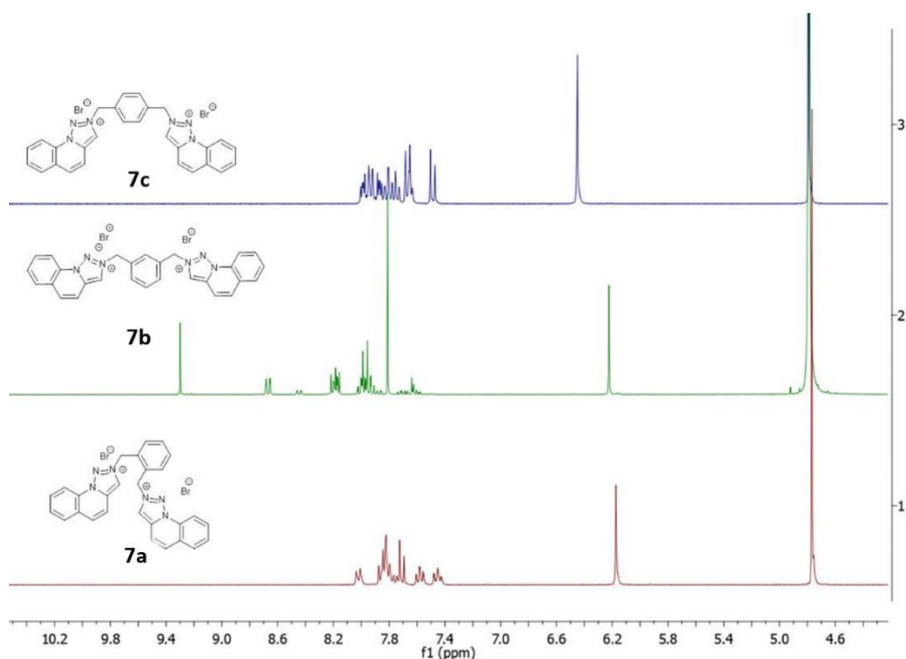


Figura II.11: Espectros de  $^1\text{H}$  RMN de las disales **7a-7c**

### 3. CONCLUSIONES

1. Se han podido sintetizar monosales de triazoloquinolinio **4a-e** y **5a-d** mediante una reacción de sustitución nucleofílica tipo 2 con bromuros de alquilo (bromopropano, bromobutano, bromopentano, bromohexano y bromuro de bencilo).
2. Los mismos tipos de reacción a partir de triazoloquinolina con dibromuros de alquilo, han dado lugar a las disales de triazoloquinolinio **6a-c** y **7a-c**.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Síntesis del producto de partida

#### [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina **1**

Se disolvió SeO<sub>2</sub> recién sublimado (4.63 g) en dioxano conteniendo un 4% de agua (47 mL) calentando a 45 °C. Se añadió lentamente una solución de quinaldina (5.0 g, 34.96 mmoles) en dioxano (20ml). La mezcla se calentó lentamente hasta llegar a la temperatura de reflujo y se continuó durante una hora. Se enfrió y se evaporó el dioxano, el crudo de reacción se purificó por cromatografía de columna utilizando como soporte alúmina y eluyendo con AcOEt/hexano (1:1) obteniéndose 2-quinolincarbaldhído (3.35 g, 61%), que se mezcló con hidrazina hidratada (15 mL, 98%) y se calentó a reflujo durante una hora. Después se trató con una solución acuosa de NaOH (25 mL, 30%) y se extrajo con éter, los extractos orgánicos se secaron y se concentraron obteniéndose la hidrazona de 2-quinolincarbaldhído (2.28 g, 68%). La hidrazona sin purificar se disolvió en CHCl<sub>3</sub> (60 mL) y se adicionó MnO<sub>2</sub> (2.33 g), se calentó a reflujo durante 1 hora y media. Se filtró y se evaporó el disolvente obteniéndose la [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina **1** (1.96 g, 80%).

**Sólido blanco p.f:** 79 – 80 °C (hexano), Lit. 81 °C (éter de petróleo)<sup>31</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.76 (dd, *J* = 7.9, 1.1Hz, 1H), 7.68 (ddd, *J* = 8.5, 7.3, 1.4 Hz, 1H), 7.53 (t, *J* = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H)

**RMN <sup>13</sup>C (75MHz CDCl<sub>3</sub>)** δ 131.7 (C), 131.7 (C), 130.0 (CH), 128.5 (CH), 127.5 (C), 127.0 (CH), 126.6 (CH), 123.8 (C), 116.2 (CH), 114.6 (CH).

## 4.2. Síntesis de monosales de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinio

### Procedimiento general

A 25 °C se mezcló [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina **1** (1-2 mmol), disuelta en DMF (1 mL) con el correspondiente haluro de alquilo (1-2 mL) en un vial cerrado y se calentó a 80 °C sin agitación durante 5 h. Se enfrió a temperatura ambiente y se eliminó el disolvente por decantación, el sólido resultante se lavó tres veces con DMF y tres veces más con acetato de etilo, utilizando para estas operaciones ultrasonidos para eliminar el exceso de los haluros de alquilo. El sólido obtenido, se secó a vacío durante 24h. Cuando después de este proceso las sales no están puras se purifican por cromatografía en columna de sílice usando AcOEt/metanol como eluyente.

### SERIE A

TQ		Agente alquilante		Producto (mg)	Rto
<b>1</b>	150 mg	Bromopropano	2mL	<b>4a</b> (200)	77%
<b>1*</b>	100 mg	Bromobutano	2mL	<b>4b</b> (130)	72%
<b>1*</b>	60 mg	Bromopentano	2mL	<b>4c</b> (79)	70%
<b>1</b>	150 mg	Bromohexano	2mL	<b>4d</b> (175)	53%
<b>1</b>	150 mg	Bromuro de bencilo	2 ml	<b>4e</b> (195 )	65%

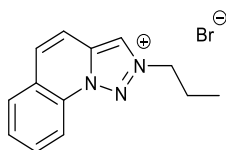
\*La reacción se llevó a cabo en acetonitrilo

## SERIE B

TQ		Agente alquilante		Producto (mg)	Rto
1	300 mg	1,3-dibromopropano	2mL	5a (529)	81%
1	300 mg	1,4-dibromobutano	2mL	5b (368)	54%
1	300 mg	1,5-dibromopentano	2mL	5c (120)	18%
1	300 mg	1,6-dibromohexano	2mL	5d (300)	40%

## SERIE A

### Bromuro de 2-(2-propil)-[1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]quinolinio (4a)



Sólido Blanco, p.f: 185-188 °C

HRMS ESI-[TOF] para  $C_{13}H_{14}N_3^+$  calculado. 212.1182; Encontrado 212.1183

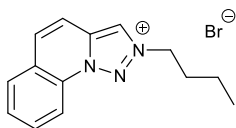
MS (m/z) (%) 170 (36), 142 (16), 115 (100).

$^1H$  RMN (300 MHz, Metanol- $d_4$ )  $\delta$  9.32 (s, 1H, parcialmente deuterado), 8.78 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 8.26 (d,  $J$  = 9.3 Hz, 2H), 8.18 – 7.92 (m, 3H), 4.93 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 2.25 (dd,  $J_1 = J_2 = 7.3$  Hz, 2H), 1.12 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H).

$^{13}C$  RMN (75 MHz, Metanol- $d_4$ )  $\delta$  136.23 (C), 133.30 (CH), 133.05 (CH), 131.90 (CH), 131.13 (CH), 127.46 (C), 125.90 (CH), 117.72 (CH), 115.36 (CH), 57.45 (CH<sub>2</sub>), 24.32 (CH<sub>2</sub>), 11.05 (CH<sub>3</sub>).



### Bromuro de 2-(2-butil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*] quinolinio (4b)



Sólido Blanco, p.f: 77-79 °C

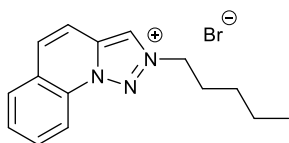
HRMS ESI-[TOF] para  $C_{14}H_{16}N_3^+$  calculado. 226,1339; Encontrado 226.1339

MS (m/z) (%) 170 (79), 142 (29), 115 (100).

$^1H$  RMN (300 MHz, Metanol- $d_4$ )  $\delta$  9.48 (s, 1H), 8.77 – 8.55 (m, 1H), 8.33 – 8.15 (m, 2H), 8.12 – 7.86 (m, 3H), 5.05 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.38 – 2.07 (m, 2H), 1.71 – 1.44 (m, 2H), 1.08 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H).

$^{13}C$  RMN (75 MHz, Metanol- $d_4$ )  $\delta$  135.75 (C), 133.14 (CH), 132.78 (CH), 131.70 (CH), 130.96 (CH), 127.05 (C), 126.10 (CH), 117.52 (CH), 115.47 (CH), 55.79 (CH<sub>2</sub>), 32.64 (CH<sub>2</sub>), 20.52 (CH<sub>2</sub>), 13.80 (CH<sub>3</sub>).

### Bromuro de 2-(2-pentil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinio (4c)



Sólido Blanco, p.f: 89-90 °C

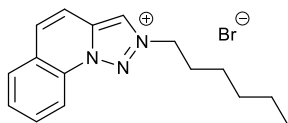
**HRMS ESI-[TOF]** para  $C_{15}H_{18}N_3^+$  Calculado 240.1495; Encontrado 240.1496

**MS (m/z) (%)** 170 (100), 142 (53), 115 (63).

**$^1H$  RMN (300 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  9.46 (s, 1H), 8.80 – 8.62 (m, 1H), 8.36 – 8.14 (m, 2H), 8.14 – 7.85 (m, 3H), 5.15 – 4.93 (m, 2H), 2.42 – 2.11 (m, 2H), 1.66 – 1.31 (m, 4H), 1.10 – 0.80 (m, 3H).

**$^{13}C$  RMN (75 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  135.83 (C), 133.17 (CH), 132.83 (CH), 131.74 (C), 131.08 (CH), 131.00 (CH), 127.14 (C), 126.07 (CH), 117.57 (CH), 115.48 (CH), 56.02 (CH<sub>2</sub>), 30.45 (CH<sub>2</sub>), 29.37 (CH<sub>2</sub>), 23.06 (CH<sub>2</sub>), 14.18 (CH<sub>3</sub>).

#### **Bromuro de 2-(2-hexil)-[1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ] quinolinio (4d)**



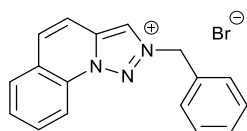
**Sólido Blanco, p.f:** 120 °C

**HRMS ESI-[TOF]** para  $C_{16}H_{21}N_3^+$  Calculado 255.1730; Encontrado 255.1725

**$^1H$  RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  9.24 (s, 1H), 8.60 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 8.11 (d,  $J$  = 9.3 Hz, 2H), 8.03 – 7.75 (m, 3H), 4.94 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 2.19 (m, 2H), 1.59 – 1.22 (m, 6H), 0.88 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).

**$^{13}C$  RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  134.69 (C), 132.20 (CH), 132.13(CH), 130.80(C), 130.01(CH), 125.90 (CH), 116.58 (CH), 114.12 (CH), 55.04 (CH<sub>2</sub>), 30.62 (CH<sub>2</sub>), 29.38 (CH<sub>2</sub>), 25.43 (CH<sub>2</sub>), 22.11 (CH<sub>2</sub>), 13.59 (CH<sub>3</sub>)

### Bromuro de 2-bencil-[1,2,3]triazolo[1,5-a]quinolinio (4e)



Sólido Blanco, p.f: 65 °C

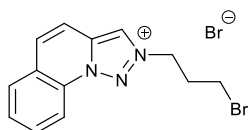
HRMS ESI-[TOF] para  $C_{17}H_{14}N_3^+$  Calculado 260.1182; Encontrado 260.1171

$^1H$  NMR (300 MHz,  $D_2O$ + Metanol- $d_4$ )  $\delta$  9.08 (s, 1H, se deuteria rápidamente), 8.20 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.85 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 7.79 – 7.41 (m, 9H), 6.02 (s, 2H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $D_2O$ + Metanol- $d_4$ )  $\delta$  135.17 (C), 133.15 (C), 132.78 (CH), 132.75 (CH), 131.45 (CH), 131.02 (CH), 130.47 (C), 130.43 (C), 130.05 (C), 126.28 (CH), 125.08 (CH), 116.83 (CH), 114.71 (CH), 58.97 ( $CH_2$ )

### SERIE B

### Bromuro de 2-(3-bromopropil)-[1,2,3]triazolo[1,5-a]quinolinio (5a)



Sólido Blanco p.f: 47 °C

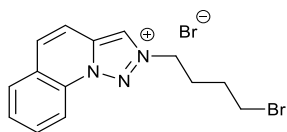
HRMS ESI-[TOF] para  $C_{13}H_{13}N_3Br^+$  Calculado. 290.0287; Encontrado 290.0289.

**MS (m/z) (%)** 170 (9), 167 (11), 142 (8), 140 (10), 129 (10), 115 (100).

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 9.11 (s, 1H, parcialmente deuterado), 8.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 7.97 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.92 – 7.85 (m, 2H), 5.10 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.55 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.76 – 2.68 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 134.46 (C), 131.96 (CH), 131.89 (CH), 130.56 (CH), 129.68 (CH), 125.68 (CH), 124.64 (C), 116.35 (CH), 113.70 (CH), 52.78 (CH<sub>2</sub>), 31.57 (CH<sub>2</sub>), 29.07 (CH<sub>2</sub>).

### Bromuro de 2-(4-bromobutil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinio (5b)



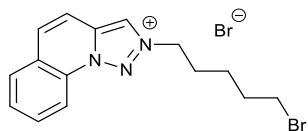
**Sólido Blanco p. f:** 101-102 °C

**HRMS ESI-[TOF]** para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>Br<sup>+</sup> Calculado 304.0444; Encontrado 304.0449

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 9.07 (s, 1H, parcialmente deuterado), 8.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 8.00 – 7.89 (m, 1H), 7.92-7.85(m, 2H), 4.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.55 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.49 – 2.22 (m, 2H), 2.00-1.95 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 134.41 (C), 131.84 (2CH), 130.47 (CH), 129.64 (CH), 125.58 (CH), 124.45 (C), 116.27 (CH), 113.71 (CH), 53.74 (CH<sub>2</sub>), 33.12 (CH<sub>2</sub>), 28.60 (CH<sub>2</sub>), 27.77 (CH<sub>2</sub>).

### Bromuro de 2-(5-bromopentil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinio (5c)



Sólido Blanco p. f: 90-91°C

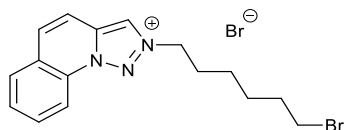
HRMS ESI-[TOF] para  $C_{15}H_{17}N_3Br^+$  Calculado 318,0600; Encontrado 318.0608.

MS (m/z) (%) 170 (35), 142 (20), 115 (100).

$^1H$  RMN (300 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  9.06 (s, 1H), 8.60 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.09 (d,  $J = 9.3$  Hz, 2H), 8.02 – 7.76 (m, 3H), 4.93 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.50 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 2.34 – 2.08 (m, 2H), 2.07 – 1.73 (m, 2H), 1.56 (m, 2H).

$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  134.82 (C), 132.18 (2CH), 130.79 (CH), 129.98 (CH), 125.91 (C), 124.49 (CH), 116.61 (CH), 114.09 (CH), 54.71 ( $CH_2$ ), 34.64 ( $CH_2$ ), 31.42 ( $CH_2$ ), 28.46 ( $CH_2$ ), 24.35 ( $CH_2$ ).

### Bromuro de 2-(6-bromohexil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinio (5d)



Sólido Blanco p. f: 73-74 °C

HRMS ESI-[TOF] para  $C_{16}H_{19}N_3Br^+$  Calculado 332.0757; Encontrado 332.0762

MS (m/z) (%) 170 (35), 142 (27), 140 (10), 116 (9), 115 (100).

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 9.11 (s, 1H), 8.41 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.04-7.99 (m, 2H), 7.95 – 7.68 (m, 3H), 4.94 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.45 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.23-2.16 (m, 2H), 1.84-1.77 (m, 2H), 1.64 – 1.30 (m, 4H).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 134.66 (C), 132.12 (2CH), 130.82 (CH), 129.99 (CH), 129.63 (C), 125.75 (C), 124.72 (CH), 116.34 (CH), 114.24 (CH), 54.97 (CH<sub>2</sub>), 35.40 (CH<sub>2</sub>), 32.10 (CH<sub>2</sub>), 29.26 (CH<sub>2</sub>), 26.98 (CH<sub>2</sub>), 24.97 (CH<sub>2</sub>).

### 4.3. Síntesis de disales de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinio

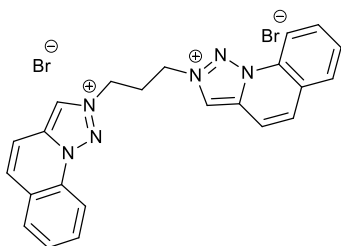
#### Procedimiento general

A 25 °C se mezcló [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina **1** (2 mmol, 4 eq.) con el correspondiente haluro de alquilo (0.5mmol, 1eq.) en un vial cerrado y se calentó a 80 °C sin agitación durante 9h (ver tabla). Se enfrió a temperatura ambiente y se eliminó el disolvente por decantación, el sólido resultante se lavó tres veces con DMF y tres veces más con acetato de etilo, utilizando para estas operaciones ultrasonidos para eliminar el exceso de los haluros de alquilo. El sólido obtenido, se secó a presión reducida durante 24 h. En la tabla siguiente se dan los rendimientos de las disales.

## SERIE C

TQ	Agente alquilante		Producto (mg)	Rto
1	340 mg	1,3-dibromopropano	101 mg <b>6a</b> (245)	90%
1	340 mg	1,4-dibromobutano	109 mg <b>6b</b> (212)	76 %
1	340 mg	1,5-dibromopentano	115 mg <b>6c</b> (200)	70 %
1	340 mg	1,6-dibromohexano	123 mg <b>6d</b> (280)	96 %
1	340 mg	1,4-bis(bromometil)benceno	133 mg <b>7a</b> (295)	98%
1	340 mg	1,3-bis(bromometil)benceno	133 mg <b>7b</b> (260)	86%
1	340 mg	1,2-bis(bromometil)benceno	133 mg <b>7c</b> (253)	84%

### Dibromuro de 2,2'-(1,3-propanodii)bis([1,2,3]triazolo[1,5-a]quinolinio) (6a)



Solido Blanco P. f: >260 °C (desc.)

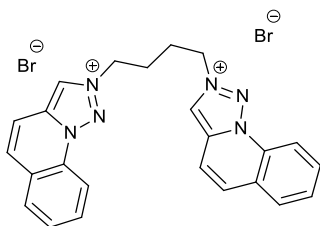
HRMS ESI-[TOF] para  $C_{23}H_{20}N_6^{2+}$  Calculado 190.0869; Encontrado 190.0874.

$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  9.15 (s, 2H/D parcialmente deuterado), 8.14 (dd,  $J = 8.1, 0.8$  Hz, 2H), 7.90 – 7.86 (m, 2H), 7.85 – 7.78 (m, 6H), 7.71 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 5.34 (t,  $J = 5.9$  Hz, 4H), 3.30 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  134.01 (2C), 132.32 (2CH), 131.92 (2CH), 130.89 (2CH), 129.78 (2CH), 128.32 (2C), 125.06 (2C), 115.63 (2CH), 113.42 (2CH), 53.06 (2CH<sub>2</sub>), 27.85(CH<sub>2</sub>).

IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3441 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 3370 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 3099, 3002, 1629, 1559, 1476, 1287, 1221, 1169, 1104, 1156, 1137, 973, 836, 809, 766, 750, 682.

### Dibromuro de 2,2'-(1,4-butanediil)bis([1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]quinolinio) (6b)



Sólido Blanco P. f: >260 °C (desc.)

HRMS ESI-[TOF] para  $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_6^{2+}$  Calculado 197.0947; Encontrado 197.0948.

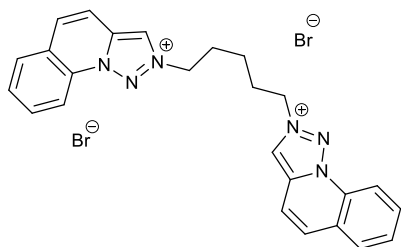
$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  9.15 (s, 2H), 8.39 (dd,  $J = 8.2, 0.7$  Hz, 2H), 8.11 – 8.07 (m, 4H), 7.90 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 7.88 – 7.82 (m, 4H), 5.06 (t,  $J = 2.9$  Hz, 4H), 2.44 (t,  $J = 2.9$  Hz, 4H).

$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  134.39 (2C), 132.02 (2CH), 131.94 (2CH), 130.63 (2CH), 129.78 (2CH), 129.35 (2C), 125.50 (2C), 124.72 (2CH), 115.91 (2CH), 113.70 (2CH), 53.86 (2CH<sub>2</sub>), 25.61 (2CH<sub>2</sub>).

IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3448 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 3373 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 3094, 3016, 1626, 1608, 1558, 1473, 1412, 1299, 1222, 1164, 1147, 1103, 1041, 974, 887, 840, 766, 751, 684.



**Dibromuro de 2,2'-(1,5-pentanedil)bis([1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolinio) (6c)**



**Sólido Blanco P. f:** >260 °C (desc.)

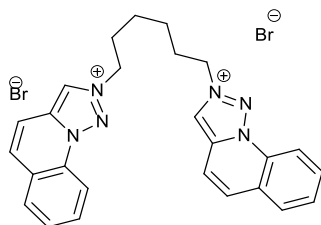
**HRMS ESI-[TOF]** para  $C_{25}H_{24}N_6^{2+}$  Calculado 204.1026; Encontrado 204.1027.

**$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  9.08 (s, 2H/D parcialmente deuterado), 8.41 (dd,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 2H), 8.07 (dd,  $J = 7.9, 1.4$  Hz, 2H), 8.03 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 7.87-7.82 (m, 4H), 7.81 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 4.98 (t,  $J = 6.7$  Hz, 4H), 2.37 – 2.32 (m, 4H), 1.60-1.56 (m, 2H).

**$^{13}C$  RMN (126 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  134.19 (2C), 131.96 (2CH), 131.87 (2CH), 130.58 (2CH), 129.79 (2CH), 129.27 (2C), 125.36 (2C), 124.27 (2CH/CD), 115.75 (2CH), 113.50 (2CH), 54.10 (2CH<sub>2</sub>), 27.87 (2CH<sub>2</sub>), 21.99 (CH<sub>2</sub>).

**IR (ATR,  $cm^{-1}$ )** 3418 (H<sub>2</sub>O), 3015, 2948, 1629, 1561, 1470, 1392, 1291, 1228, 1164, 1103, 1035, 855, 799, 774, 678.

**Dibromuro de 2,2'-(1,6-hexanedil)bis([1,2,3]triazolo[1,5-a]quinolinio) (6d)**



**Sólido Blanco P. f:** >260 °C (desc.)

**HRMS ESI-[TOF]** para  $C_{26}H_{26}N_6^{2+}$  Calculado 211.1104; Encontrado 211.1104.

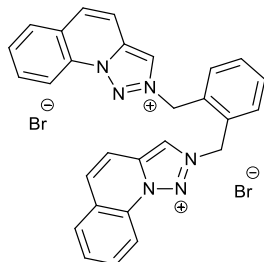
**$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  9.09 (s, 2H), 8.46 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 8.47-8.43 (m, 4H), 7.87(d,  $J=9.5$ , 2H)7.87 – 7.78 (m, 4H), 4.96 (t,  $J = 6.9$  Hz, 4H), 2.29 – 2.22 (m, 4H), 1.61 – 1.54 (m, 4H).

**$^{13}C$  RMN (126 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  134.31 (2C), 131.76 (2CH), 131.72 (2CH), 130.37 (2CH), 129.56 (2CH), 129.36 (2C), 125.39 (2C), 124.26 (2CH), 116.00 (2CH), 113.71 (2CH), 54.57 (2CH<sub>2</sub>), 28.81 (2CH<sub>2</sub>), 24.94 (2CH<sub>2</sub>).

**IR (ATR,  $cm^{-1}$ )** 3427 (H<sub>2</sub>O), 3369 (H<sub>2</sub>O), 3017, 2937, 1629, 1562, 1473, 1292, 1258, 1163, 1140, 1102, 1136, 814, 799, 775, 761, 678.

**Dibromuro de 2,2'-(1,2-fenilbis(metilen))bis([1,2,3]triazolo[1,5- $\sigma$ ]quinolin-2-ium)**

**7a**



**Sólido blanco p.f:** 224-225 °C

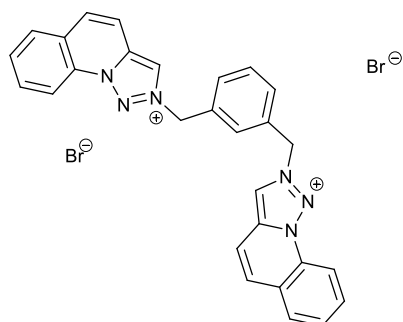
**HRMS ESI-[TOF]** para  $C_{28}H_{22}N_6^{2+}$  Calculado 221.0947; Encontrado 221.0957.

**$^1H$  RMN (300 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  8.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.89 – 7.70 (m, 10H), 7.64 – 7.57 (m, 4H), 7.49 (dd,  $J = 8.5, 1.3$  Hz, 2H), 6.19 (s, 4H).

**$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  134.57 (2C), 133.99 (2CH), 132.22 (2CH), 131.73 (2CH), 131.48 (2CH), 130.84 (2CH), 129.89 (2CH), 129.24 (2C), 125.60 (2C), 115.76 (2CH), 113.98 (2CH), 57.84 (2CH<sub>2</sub>).

**IR (ATR,  $cm^{-1}$ )** 3415 ( $H_2O$ ), 3366 ( $H_2O$ ), 3045, 1630, 1560, 1473, 1414, 1338, 1298, 1224, 1135, 1143, 890, 881, 837, 813, 768, 684.

**Dibromuro de 2,2'-(1,3-fenilbis(metil))bis([1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolin-2-ium) 7b**



**Sólido blanco p.f:** 151-152 °C

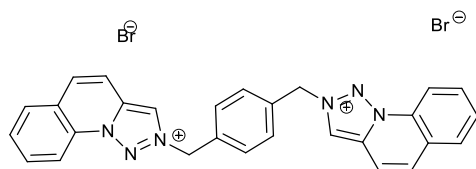
**HRMS ESI-[TOF]** para  $C_{28}H_{22}N_6^{2+}$  Calculado 221.0947; Encontrado 221.0952.

**$^1H$  RMN (300 MHz,  $D_2O$ - MeOD- $d_4$ )**  $\delta$  8.04 – 7.60 (m, 10H), 7.68-7.65(m, 4H), 7.49 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 2H), 6.45 (s, 4H).

**$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  134.27 (2C), 134.16 (2CH) 132.71 (2CH), 132.38 (2CH), 132.35 (2CH), 131.33 (2CH), 131.18 (2C), 130.11 (2CH), 128.46 (2C), 125.30 (2C), 115.80 (2CH), 113.39 (2CH), 56.14 (2CH $_2$ ).

**IR (ATR,  $cm^{-1}$ )** 3377 ( $H_2O$ ), 3062, 3018, 1626, 1558, 1472, 1411, 1293, 1226, 1142, 1103, 1039, 883, 826, 768, 752, 683.

**Dibromuro de 2,2'-(1,4-fenilbis(metil))bis([1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolin-2-ium) 7c**



**Sólido blanco p.f:** >260 °C (desc.)

**HRMS ESI-[TOF]** para C<sub>28</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub><sup>2+</sup> Calculado 221.0947; Encontrado 221.0949.

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, MeOH)** δ 9.38 (s, 2H), 8.74(d, *J*=8.3Hz, 2H), 8.30-8.24 (m, 4H), 8.08 – 8.00 (m, 6H), 7.89 (s, 4H), 6.30 (s, 4H).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, MeOH)** δ 136.01 (2C), 135.24 (2C), 133.29 (2CH), 133.27 (2CH), 132.03 (2CH), 131.55 (2CH), 131.01 (2CH), 130.97 (2C), 127.16 (2C), 125.79 (2CH), 117.53 (2CH), 115.16 (2CH), 58.56 (2CH<sub>2</sub>).

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** 3432 (H<sub>2</sub>O), 3374 (H<sub>2</sub>O), 3061, 3017, 2937, 1627, 1558, 1472, 1471, 1292, 1141, 1111, 1103, 1038, 880, 838, 813, 767, 752, 680.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. J. H. Boyer, R. Borgers, L. T. Wolford, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 678
2. R. A. Abramovich, T. Takaya, *J. Org. Chem.*, **1972**, *37*, 2022
3. Y. Tamura, J.H. Kim, Y. Miki, H. Hayashi, M. Ikeda, *J. Het. Chem.*, **1975**, *12*, 481
4. a) E. Escrivá, J. J. Server-Carrió, L. Lezama, J. V. Salgado, J. L. Pizarro, R. Ballesteros, B. Abarca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 2033. b) T. Hirayama, S. Meta, T. Okada, N. Tsurve, K. Okuda, H. Nagasawa, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 1
5. E. Gómez-Aldaraví, *Tesis Doctoral*, La Síntesis y Propiedades de 1,2,3-triazolo[1,5-*a*]quinolina y 1,2,3-teiazolo[5,1-*a*]isoquinolina, Universitat de València, **1984**
6. B. Abarca, E. Gómez-Aldaraví, G. Jones, *J. Chem. Res., (S)* **1984**, 140, *J. Chem. Res.,(M)* **1984**, 1430
7. P. Beak, R. Brown, *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 34
8. G. Jones, D. R. Sliskovic, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1982**, 967
9. B. Abarca, R. Ballesteros, E. Gómez-Aldaraví, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1985**, 1897
10. R. Ballesteros-Garrido, F. R. Leroux, R. Ballesteros, B. Abarca, F. Colobert, *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 4410
11. B. Abarca, R. Ballesteros, N. Houari, *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 12765
12. M. J. Frisch, H. B. Schelegel, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, T. Keith, G. A. Peterson, J. A. Montgomery, K. Raghavachari, M. A. Al-Laham, V. G. Zakrewski, J. V. Ortiz, J. B. Foresman, B. B. Ciolowski, B. B. Stefanov, A. Nanayakkara, N. Challacombe, C. Y. Peng, P. Y. Ayala, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andrés, E. S. Replogle, R. Gomperts, R. L. Martín, D. J. Fox, J. S. Binkley, D. J. DeFrees, J. J. P. Stewart, M. Head-Gordon, C. González, J. A. Pople. *GAUSSIAN 94*, Revision C.3, Gaussian Inc. Putsburg, PA, **1995**
13. W.J. Linn, O. W. Webster, R. E. Benson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2032. *Ibid*, **1965**, *87*, 3651.

14. B. Abarca, R. Ballesteros, N. Houari, A. Samadi, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 3913
15. B. Abarca, R. Ballesteros, N. Houari, *Arkivoc*, **2000**, *1*, 282
16. B. Abarca, R. Ballesteros, M. Chadlaoui, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 5785
17. B. Abarca, I. Alkorta, R. Ballesteros, F. Blanco, M. Chadlaoui, J. Elguero, F. Mojarrad, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3905
18. R. Ballesteros-Garrido, F. Blanco, R. Ballesteros, F. R. Leroux, B. Abarca, F. Colobert, I. Alkorta, J. Elguero, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5765.
19. R. Ballesteros-Garrido, B. Abarca, R. Ballesteros, F. Colobert, F. R. Leroux, E. García-España, *RSC Advances*, **2015**, *5*, 29809.
20. B. Stewart, A. Harriman, L. J. Higham, *Organometallics*, **2011**, *30*, 5338.
21. R. Ballesteros-Garrido, E. Delgado-Pinar, B. Abarca, R. Ballesteros, F. R. Leroux, F. Colobert, R. J. Zaragoza, E. García-España, *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 3701.
22. Y. Xiang, A. Tong, P. Jin, Y. Ju, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2863.
23. W. Sun, Q. Zhang, L. Qin, Y. Cheng, Z. Xie, C. Lu and L. Wang, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2010**, 4009-4017.
24. M. Elmasnaoui, *Tesis doctoral, Universitat de València* **1999**.
25. B. Abarca, R. Ballesteros, N. Houari, *Tetrahedron*, **1997**, *37*, 12765
26. J. A. Joule, K. Mills. *Heterocyclic Chemistry*. **2000**, Blackwell Pub. 4Ed. pp 415.
27. M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica* 2<sup>a</sup> Ed, **2005** Ed. Síntesis.
28. Reacciones similares se han descrito con sales de imidazolio. A. Kamal, G. Chouham, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 1489 y referencias allí citadas.
29. J-H. Fuhrop, T. Wang, *Chem Rev.*, **2004**, *104*, 2901.
30. a) J. S. Fossey et al., *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 253; b) J. S. Fossey et al., *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 8180; c) J. S. Fossey et al., *Chem.Asian J.*, **2009**, *4*, 194; d), J. S. Fossey et al., *Chem. Commun*, **2008**, 1082.

31. R. A. Abramovich, T. Takaya, *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 2022.

32. J. H. Boyer, R. Borges, L. T. Wolford, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 678.



## **CAPÍTULO III**

### **ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON ADN DE MONOSALES Y DISALES DE TRIAZOLOQUINOLINIO**



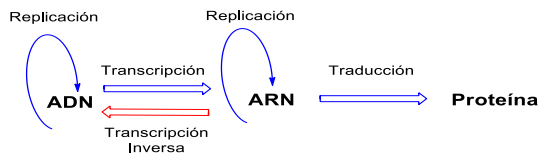
# 1. METODOLOGÍAS DE ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE MOLÉCULAS CON ADN

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) son las moléculas que constituyen el material genético, el cual contiene la información básica y necesaria para las funciones vitales de los organismos tal como la reproducción o los procesos celulares. El ácido desoxirribonucleico (ADN) contiene la información genética en los organismos celulares, mientras que el ácido ribonucleico (ARN) es el material genético de los virus.<sup>1</sup>

En los sistemas biológicos el flujo de información genética sigue lo que se conoce como el **dogma central de la biología molecular**, que fue propuesto por Crick en 1958.<sup>2,3</sup> Este dogma dice que la secuencia de nucleobases del ADN codifica la estructura primaria de las proteínas mediante un proceso secuencial. En este proceso, la transmisión de la información contenida en una secuencia de ADN pasa a las células hijas u organismo mediante *replicación*. Esta información se transfiere a ARN por *transcripción* y parte de esta información es *traducida* para la síntesis de proteínas.

Este proceso no implica un cambio de ADN en ARN o ARN en proteínas, pero sí una transferencia de la información en un proceso donde el ADN actúa como una plantilla para la síntesis de ARN en la *transcripción*, y el ARN actúa como plantilla para la síntesis de las proteínas en la *traducción* (Figura III.1).



**Figura III.1:** Dogma central de la biología molecular

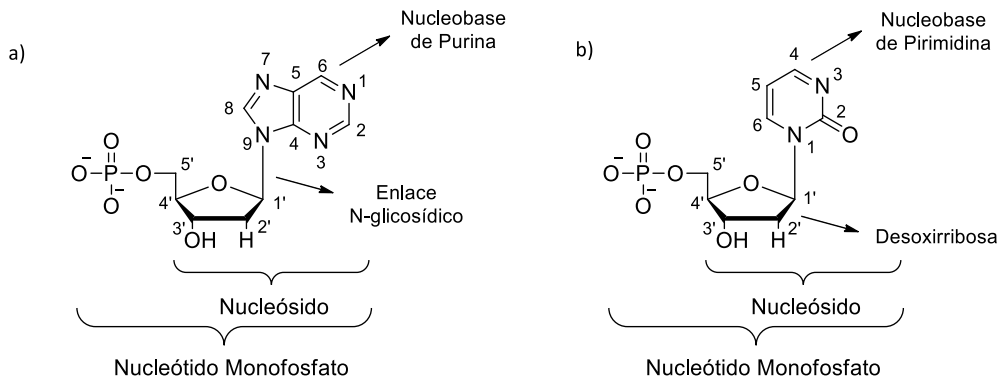
## 1. 1. Estructura del ADN

Miescher fue el primero en aislar el ADN en 1869,<sup>4</sup> y fue identificado como material genético por Avery, McLeod y McCarthy en 1944.<sup>5</sup> La estructura fue propuesta por Watson y Crick en 1953.<sup>6</sup> Esta propuesta se basaba en los resultados de difracción de rayos X obtenidos por Wilkins y Franklin.<sup>6</sup> Los resultados obtenidos mediante la difracción de rayos X mostraron que la forma B del ADN es una doble hélice con un diámetro de 20 Å en la que las bases están apiladas y separadas por una distancia de 3.4 Å. Las reglas de Chargaf establecieron que la cantidad de bases púricas (A+G) en el ADN es la misma que la de pirimidínicas (T+C).<sup>7</sup>

La estructura del ADN se divide en tres niveles: primario, secundario y terciario.<sup>7</sup>

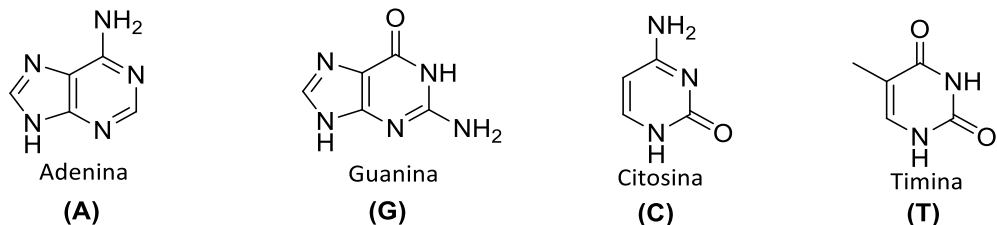
Respecto a la estructura primaria, el ADN es un polímero de polinucleótidos, es decir, una secuencia de nucleósidos unidos por enlaces covalente 3'-5'-fosfodiéster.

Los nucleósidos están compuestos por una pentosa, la 2-desoxirribosa en el caso del ADN, y una base nitrogenada (pirimidínica o púrica), unida por un enlace N-glicosídico entre el carbono anomérico del azúcar (C1') y el N9 de la purina o nitrógeno N1 de la pirimidina. Los nucleótidos están formados por nucleósidos unidos a grupos fosfato mediante enlace fosfodiéster a través de los grupos hidroxilo del carbono 5' y carbono 3' (Figura III.2).



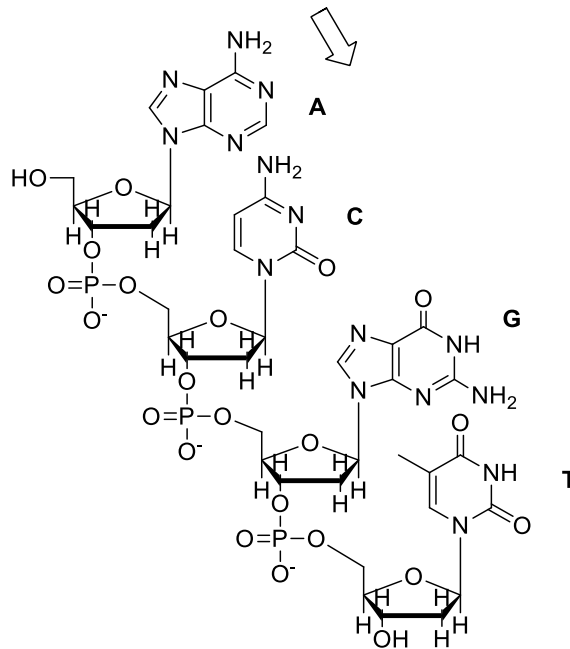
**Figura III.2:** a) Nucleósido de Purina/ Nucleótido monofosfato; b) Nucleósido de Pirimidina/ Nucleótido monofosfato

Las nucleobases se clasifican según su estructura en púricas (adenina A y guanina G) y pirimidínicas (timina T y citosina C) (Figura III.3).



**Figura III.3:** Nucleobases del ADN.

La cadena del ADN se forma por una secuencia de nucleósidos unidos mediante un enlace fosfodiéster en la posición C3' de un nucleósido y el carbono 5' del siguiente. El ADN, por tanto, es un polímero de nucleótidos con un esqueleto lineal formado por unidades alternas de fosfato y pentosa unidos mediante enlaces fosfodiéster del que sobresalen lateralmente las bases unidas al azúcar mediante enlace N-glicosídico (Figura III.4).



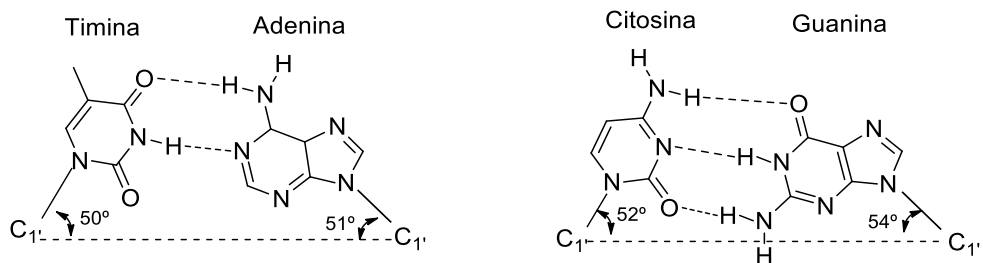
**Figura III.4:** Representación de la hebra del ADN (Por convenio se representa del extremo 5' al 3')

En la hebra del ADN, el esqueleto-azúcar fosfato es el mismo a lo largo de todo el polímero, la única variación está en las nucleobases. Por tanto, la información genética se encuentra en la secuencia de nucleobases.

La forma más común del ADN en condiciones fisiológicas es la forma B, constituida por una doble hélice en la cual las dos hebras se disponen en direcciones opuestas una respecto de la otra, siendo así antiparalelas. Una de las hebras empieza en el carbono 5' del azúcar y la otra en el 3'. El antiparalelismo de las hebras permite que sus secuencias sean complementarias y, por tanto, el apareamiento de las bases.

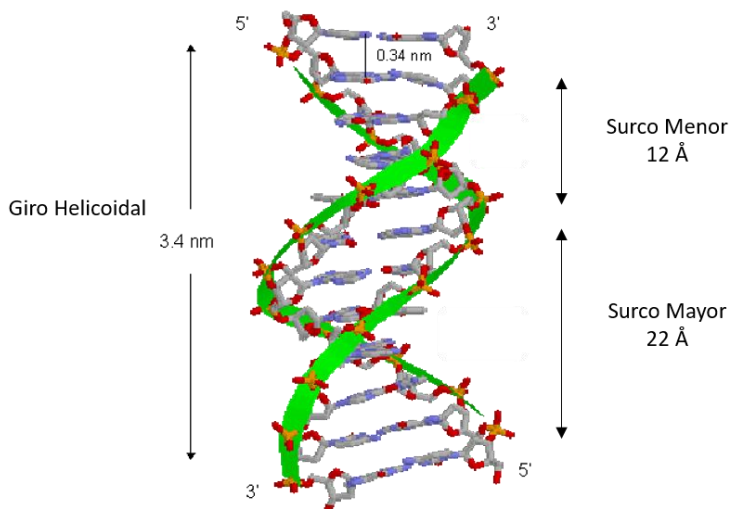
La estructura secundaria del ADN está determinada, fundamentalmente, por enlaces de hidrógeno entre las nucleobases de una y otra hebra. Estas interacciones se dan

específicamente entre adenina-timina y guanina-citosina (Figura III.5). La adenina forma dos enlaces de hidrógeno con la timina mientras que la guanina forma tres con la citosina.



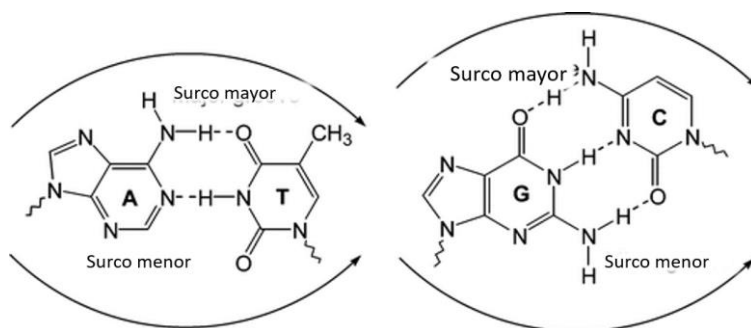
**Figura III.5:** Enlaces de hidrógeno entre las nucleobases del ADN.

La formación del enlace de hidrógeno entre las nucleobases necesita que los tres átomos implicados estén alineados. Solo será posible si los enlaces N-glicosídicos de los nucleósidos complementarios forman un ángulo menor a  $90^\circ$  con la línea imaginaria que une los carbonos 1' de las pentosas. Solo se puede llegar al apareamiento completo de las dos hebras si los pares de bases están girados unos respecto a los otros. Esta geometría causa que la doble hebra del ADN adopte una conformación de doble hélice (Figura III.6), que es dextrógira en el caso de la forma B. En esta doble hélice el esqueleto azúcar-fosfato se encuentra en el exterior y las bases en el interior.



**Figura III.6:** Forma B del ADN (Figura modificada de <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch3B3.htm>).

A lo largo de la doble hélice se forma un surco mayor y un surco menor. En estos surcos, las nucleobases están más expuestas al medio, por tanto, las proteínas y las moléculas pequeñas que interactúan con el ADN pueden llegar a las nucleobases a través de los surcos (Figura III.7).



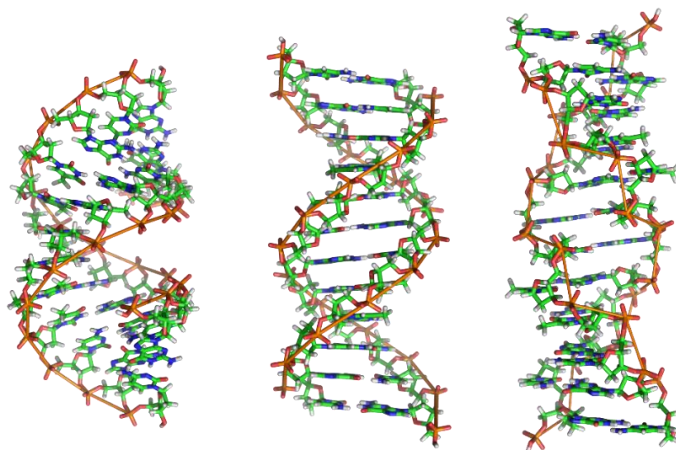
**Figura III.7:** Estructura de los surcos del ADN.



En la forma B del ADN (Figura III.6) las bases giran unas respecto a otras  $34.6^\circ$  por lo que cada 10.4 pb (pares de bases) ( $35.4 \text{ \AA}$  o  $3.54 \text{ nm}$ ) hay un giro completo en el ADN.

Además de los enlaces de hidrógeno, la conformación B del ADN también está estabilizada por el apilamiento  $\pi$ - $\pi$  entre las nucleobases y por las interacciones del esqueleto de azúcar-fosfato con el medio acuoso. Las cargas negativas de los grupos fosfato se estabilizan en las células por los cationes  $\text{Mg}^{2+}$  o por histonas (proteínas básicas). Las histonas son proteínas ricas en arginina y lisina que a pH fisiológico están protonadas.

El ADN es una estructura flexible y dinámica con capacidad de adoptar otras formas diferentes, como A- o Z-ADN. La conformación A no se encuentra en condiciones fisiológicas, aparece en las muestras deshidratadas del ADN y es más compacta, mientras que la conformación Z es levógira y se ha encontrado en organismos eucariotas, en particular, en los telómeros (Figura III.8).



**Figura III.8:** Conformaciones A, B y Z del ADN (Fuente: <https://es.wikipedia.org/wiki/ADN-B>)

Por último, el ADN en las células se encuentra en una conformación más compacta típica del tercer orden estructural. En las células el ADN se almacena en forma superenrollada, en la cual la doble hélice está asociada a proteínas.

## **1. 2. Interacción del B-ADN con moléculas pequeñas**

La información genética codificada en las secuencias del ADN es, principalmente, puesta en práctica mediante las proteínas. La unión de las proteínas al ADN, normalmente es reversible y no covalente y es este proceso el que permite que la información se exprese para responder al ambiente.

Hoy en día, ya se conoce la secuencia genética de muchos organismos, sobre todo el genoma humano, por tanto, hay muchos estudios centrados en establecer la manera de controlar la expresión de genes específicos. Este objetivo se alcanzaría mediante la creación de agentes que pueden unirse selectivamente a ciertos genes y promover su expresión o inhibiéndola.

Las proteínas pueden ser causantes de numerosas enfermedades, pero el origen de estas enfermedades se encuentra a nivel del ADN. La amplificación de la información de ADN a proteínas hace del ADN una diana para la medicina, ya que en principio una sola molécula de un fármaco por célula podría cambiar la expresión de un gen en el ADN; por el contrario, numerosas moléculas de fármaco por célula son requeridas para actuar en las múltiples copias de proteínas.

Las moléculas pequeñas que se unen al ADN de manera artificial, alteran y/o inhiben la funcionalidad del ADN. Estas moléculas actúan como fármacos cuando la alteración o la inhibición de la función del ADN se necesita para la cura o el control de una enfermedad, como es el caso del cáncer. Si se consiguiera entender el

mecanismo de interacción de estas moléculas, el diseño de nuevos fármacos que tuvieran el ADN como diana y la búsqueda de éstos *in vitro*, sería posible.

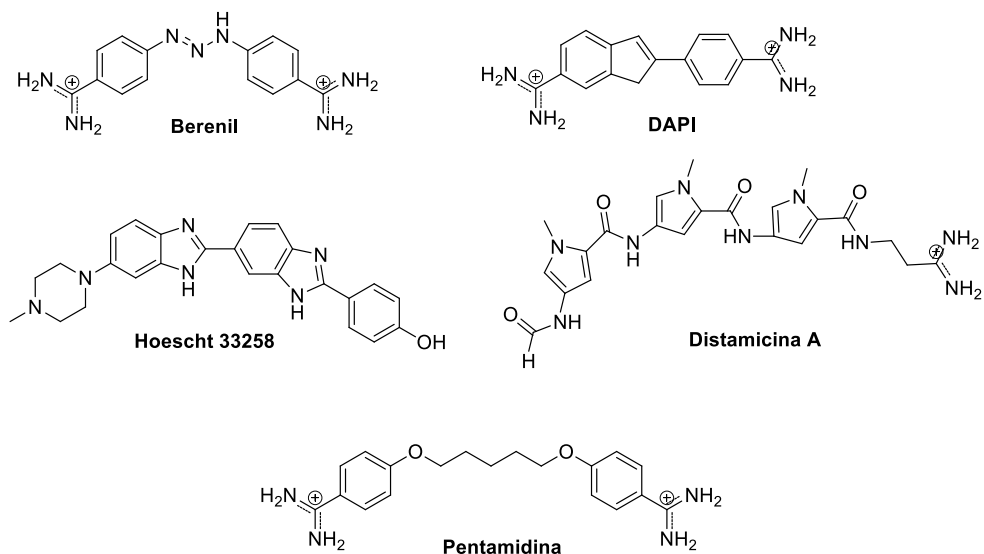
Además, las moléculas que se unen al ADN pueden ser utilizadas como herramientas en biología molecular para llevar a cabo el reconocimiento, escisión o marcaje del ADN.

A continuación, se explican los tipos de interacción con el ADN, descritos en la literatura.<sup>8-12</sup>

### **1. 2. 1. Unión a los surcos**

Como ya se ha explicado anteriormente, el surco menor y el surco mayor son regiones de la doble hélice del B-ADN donde las nucleobases están sometidas a una mayor exposición, lo que facilita una mayor interacción de las moléculas en los surcos. Las fuerzas intermoleculares implicadas en este tipo de interacción son fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno entre las bases.<sup>11-12</sup>

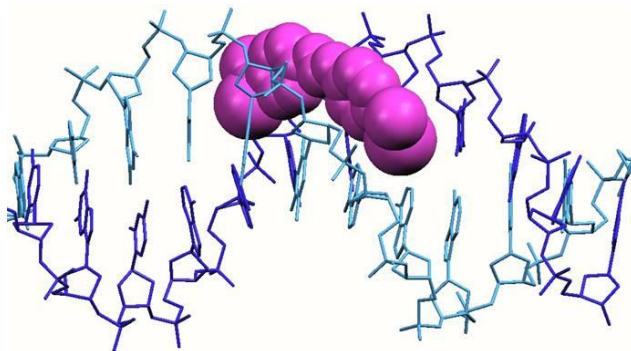
En los últimos años han sido muchos los grupos de investigación que han focalizado su trabajo en el diseño de moléculas sintéticas con capacidad para unirse al surco menor y dichos agentes tienen aplicaciones clínicas en el tratamiento del cáncer y enfermedades parasitarias, bacterianas y virales.<sup>13</sup> Normalmente, los fármacos que se unen al surco menor tienen en su estructura anillos aromáticos conectados por enlaces los cuales permiten una rotación libre (Figura III.9).<sup>12</sup>



**Figura III.9:** Ejemplos de moléculas que se unen al surco menor

Estas moléculas interactúan de forma no específica con diferentes pares de bases en el ADN, aunque en algunos casos pueden unirse de manera selectiva a determinadas secuencias del ADN. Este tipo de reconocimiento del ADN es más difícil en otras formas de unión al ADN, como la intercalación.

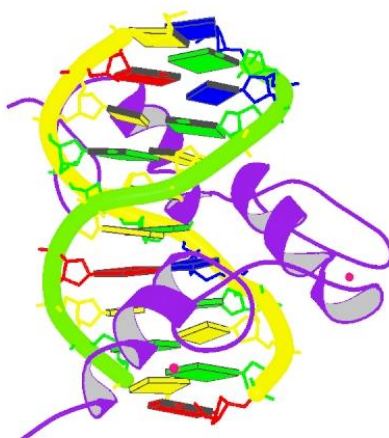
En la figura **III.10** se muestra la interacción del DAPI al surco menor del ADN.<sup>14</sup> El DAPI, al igual que otras moléculas que se unen al surco menor, interactúa preferentemente con las regiones ricas en A-T.



**Figura III.10:** DAPI (lila) unido al surco menor del ADN (PDB 1D30)

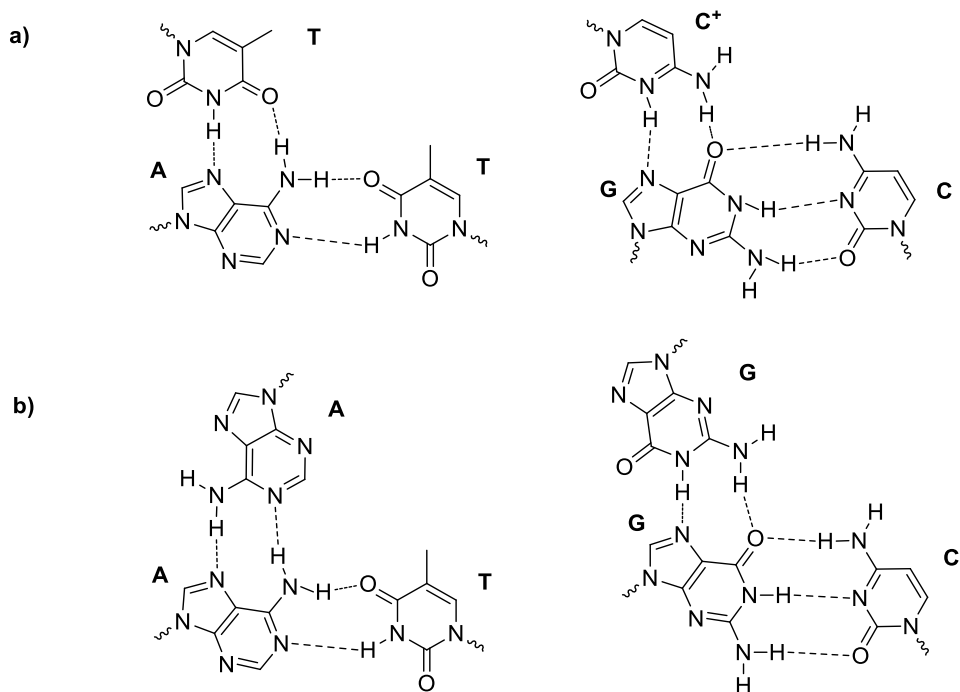
Las moléculas sintéticas, debido a que tienen un menor tamaño, tienden a interactuar en el surco menor. La mayoría de las moléculas que se unen al surco mayor son de origen natural o semisintético, proteínas u oligonucleótidos.

Normalmente, las proteínas interactúan en el surco mayor donde se pueden dar más interacciones tipo enlaces de hidrógeno. Por ejemplo, en la figura III.11 puede observarse la interacción de una unidad de un dedo de zinc con el ADN.<sup>15</sup>



**Figura III.11:** Dedo de Zinc unido al surco mayor del ADN (PDB 1A1L).

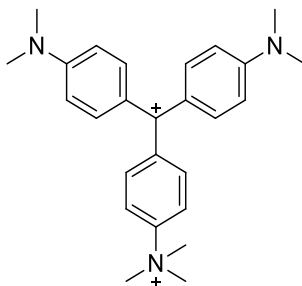
En el caso de los oligonucleótidos, pueden interactuar con el surco mayor formando enlaces de hidrógeno específicos con las nucleobases de purina dando lugar a apareamientos conocidos como Hoogsteen<sup>16</sup> o Hoogsteen inverso.<sup>17</sup> La timina o adenina pueden reconocer a la adenina, mientras que la guanina o citosina protonada pueden reconocer a la guanina. Dichos reconocimientos conducen al ADN de triple hélice, el cual solo se puede formar cuando el ADN de doble hélice tiene una extensa e ininterrumpida secuencia de púricas (A o G) (Figura III.12).



**Figura III.12:** a) Apareamientos Hoogsteen; b) Apareamientos Hoogsteen inverso.

Aunque las proteínas y oligonucleótidos son las moléculas que se unen al surco mayor, también existen otros tipos de moléculas, como el verde de metilo<sup>18-20</sup> (Figura

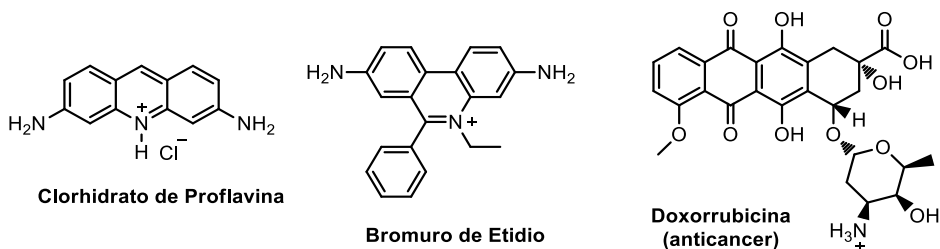
**III.13)** y algunos productos naturales<sup>21</sup> que se ha demostrado que también se unen al ADN por el surco mayor.



**Figura III.13:** Verde de Metilo

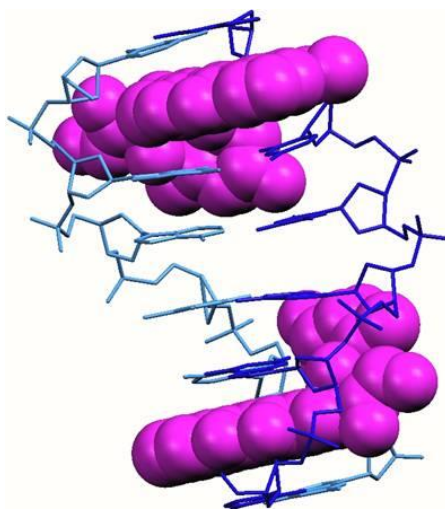
### 1. 2. 2. Intercalación

La intercalación fue descrita por Lerman en los años 60 para moléculas tales como acridina y proflavina.<sup>22</sup> Los intercalantes clásicos son moléculas con anillos aromáticos fusionados con una superficie óptima de 32 Å<sup>2</sup> y generalmente, con cargas positivas en la cadena lateral o en el mismo anillo.<sup>9</sup> Los intercalantes, normalmente, están formados por un sistema aromático  $\pi$ -deficiente de dos o más anillos de seis miembros (Figura III.14).



**Figura III.14:** Intercalantes típicos

Estas moléculas tienen la capacidad de insertarse entre los pares de bases formando interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  o  $\pi$ -stacking con las nucleobases (Figura III.15). Los intercalantes pueden acceder a los pares de bases a través del surco mayor o menor.<sup>8</sup> Al igual que las moléculas que se unen al surco menor, las fuerzas electrostáticas y los enlaces de hidrógeno, contribuyen de manera importante a la estabilización de la interacción.



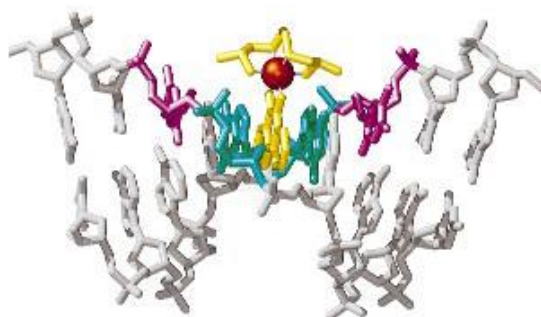
**Figura III.15:** Dos doxorubicinas (lila) intercaladas entre pares de bases del ADN (PDB 1D12).

Cuando se da la intercalación en el ADN, los pares de bases se separan 3.4 Å para formar una cavidad para la molécula planar entrante. Esta separación produce un desenrollamiento hacia la izquierda de la doble hélice del ADN y como consecuencia, una elongación del mismo. También, tras la intercalación se da una reducción del giro normal del B-ADN, que normalmente es de 36 Å.<sup>9</sup>

La intercalación se rige por el principio de exclusión de vecinos,<sup>8,23</sup> el cual se basa en el hecho de que el esqueleto del ADN no es suficientemente flexible para permitir al compuesto insertarse entre pares de bases consecutivas.



Otro grupo de intercalantes muy importantes son los complejos de metales de transición. Lippard y colaboradores<sup>24-26</sup> mostraron el primer ejemplo de un complejo plano de terpiridina platino (II) capaz de intercalar, en la que el metal era el que aportaba la carga positiva. Posteriormente se han descrito numerosos complejos que interaccionan con el ADN. El estudio de estos compuestos ha puesto de manifiesto las grandes posibilidades que la esfera de coordinación del metal puede aportar a la interacción con el ADN.<sup>27</sup> En la figura III.16 se muestra la interacción de  $[\text{Rh}(\text{phi})(\text{Me}_2\text{trien})]^{3+}$  con el ADN. En esta estructura el ligando aromático se inserta entre las pares de bases y, el metal y el co-ligando se posicionan en el surco mayor del ADN.<sup>28</sup>



**Figura III.16:** Unión de  $[\text{Rh}(\text{phi})(\text{Me}_2\text{trien})]^{3+}$  al ADN mediante intercalación. (Fuente: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=4ef5ef01-34dc-4495-90bd-31ff2cfa985a%40sessionmgr4003&vid=1&hid=4201>)

Normalmente un ligando no solo presente una única forma de interacción con el ADN, en muchos casos se da una competición entre intercalación vs unión a los surcos, o incluso uniones más complejas.<sup>8,9</sup>

Se han descrito compuestos aromáticos con dos sustituyentes catiónicos, en los que el sistema aromático se inserta entre los pares de bases, mientras que un

sustituyente se une al surco mayor, el otro sustituyente se une al surco menor, como es el caso del Naftaleno Diimida, representado en la figura III.17.<sup>29</sup>

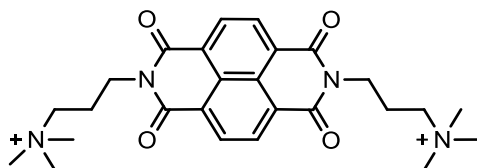


Figura III.17: Naftaleno Diimida.

### 1. 2. 3. Interacción electrostática con el esqueleto azúcar-fosfato

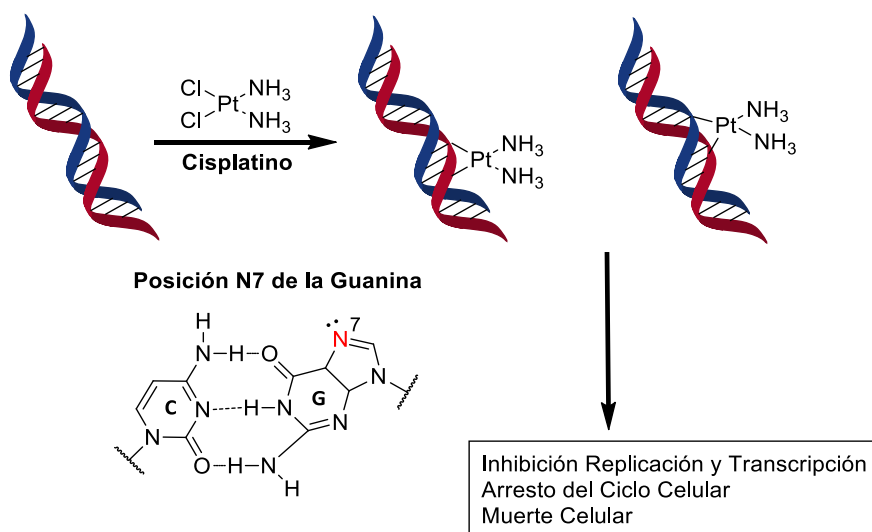
El ADN es un polianión debido a las cargas negativas de los grupos fosfato, lo que hace posible su interacción con metales cationes como el  $\text{Na}^+$  o el  $\text{Mg}^{2+}$ . La interacción de las proteínas con el esqueleto del ADN es muy común, normalmente por los residuos catiónicos, como arginina, que interacciona con los grupos fosfato además de formar enlaces de hidrógeno. Aunque, se ha demostrado que hay agentes sintéticos que tienen como diana específica esta región del ADN,<sup>30-31</sup> para moléculas pequeñas que interaccionan con el ADN, este tipo de interacción es frecuentemente un paso previo para la unión al surco o la intercalación.

### 1. 2. 4. Unión covalente

Este tipo de interacción implica la formación de un enlace covalente, normalmente con el  $\text{N}_7$  de una purina (adenina o guanina). Por tanto, es un modo de interacción irreversible que causa la completa inhibición de los procesos del ADN y la subsecuente muerte celular.<sup>12</sup>

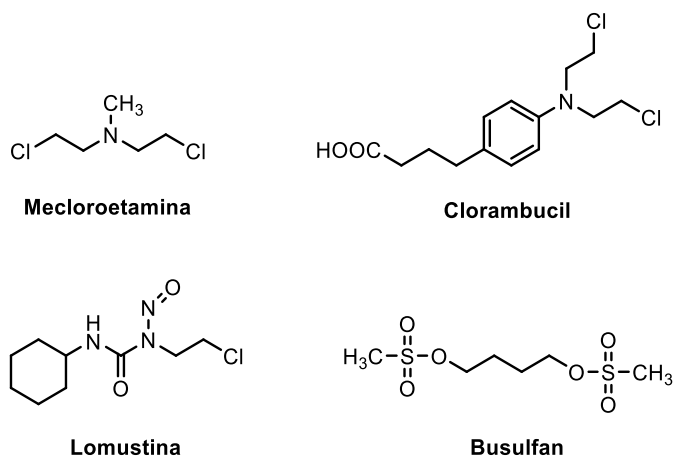
El *cis*-platino y derivados de éste, constituyen una de las familias de agentes anti-tumorales más efectivas e importantes que actúan mediante este mecanismo. La

unión del *cis*-platino al ADN ocurre a través del desplazamiento de dos ligandos cloruro y la formación de dos enlaces metal-purina con las bases. Esta unión puede ser a bases de la misma hebra o de hebras diferentes (Figura III.18).<sup>32,33</sup>



**Figura III.18:** Unión Covalente intra- e interhebra del Cisplatino al ADN

Otro grupo de compuestos con capacidad para formar uniones covalentes con el ADN son los *agentes alquilantes*, cuyo carácter electrofílico posibilita la reacción de estas moléculas con los nucleófilos del ADN.<sup>34-35</sup> Aunque esta es la clase de agentes anti-tumorales más antigua, son los más utilizados. Los agentes alquilantes se dividen en tres familias: las mostazas nitrogenadas entre las que se encuentran la mecloroetamina o musina y clorambucil; las nitrosoureas como la lomustina y los alquil sulfonatos como el busulfan (Figura III.19).



**Figura III.19:** Agentes alquilantes.

### 1. 3. Técnicas para el estudio de la interacción de compuestos con el ADN

Existen numerosas técnicas útiles para el estudio de la interacción de pequeñas moléculas con el ADN. En este apartado nos centraremos en las bases teóricas de las técnicas que han sido utilizadas para el estudio de la interacción con el ADN de las sales de triazoloquinolinio, descritas en esta tesis.

#### 1. 3. 1. Espectroscopia UV-Visible

La monitorización de la interacción ADN-fármaco utilizando espectroscopía UV-visible, depende de si el espectro de absorción de los compuestos libres se altera tras la interacción con el ácido nucleico.<sup>12,36</sup>

El máximo de absorción en el espectro UV-Visible del ADN unido a un fármaco, generalmente es desplazado a una mayor longitud de onda (efecto batocrómico) y su coeficiente de extinción molar,  $\epsilon_{\text{max}}$ , disminuye (efecto hipocrómico). Sin

embargo, es posible encontrar ejemplos en los cuales podemos observar un efecto hipercrómico después de la interacción entre el ADN y el fármaco.<sup>12</sup>

Los cambios en las propiedades espectroscópicas demuestran que existe una interacción, pero no dan información sobre el tipo de la misma, ya que la intercalación, unión al surco e interacción electrostática, pueden inducir efectos cualitativamente similares.

Para el estudio de la interacción de los compuestos con el ADN se registran los espectros UV de una alícuota de una disolución de concentración conocida de los mismos y se adicionan concentraciones crecientes de ADN. Los cambios ópticos se analizan para el fármaco, en términos de fármaco libre y de aducto fármaco-ADN.

Los datos experimentales se tratan con un modelo de *binding* que permite calcular la  $K_b$  (constante de unión). El valor de la  $K_b$  se obtiene, normalmente, a partir de la siguiente ecuación:<sup>37</sup>

$$[ADN]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [ADN]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)] \quad [1]$$

donde  $[ADN]$  es la concentración de ADN en moles de nucleótido por litro,  $\epsilon_a$  es el coeficiente de extinción calculado ( $\epsilon_a = A_{obsd}/[compuesto]$ ),  $\epsilon_f$  corresponde al coeficiente de extinción para el compuesto libre y  $\epsilon_b$  es el coeficiente de extinción para el compuesto totalmente unido al ADN. En la representación  $[ADN]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  vs  $[ADN]$ , la  $K_b$  corresponde a la relación entre la pendiente y la ordenada en el origen. Esta aproximación, que adopta el modelo de exclusión de vecinos, fue originalmente descrita por Benesi y Hildebrand<sup>38</sup> adaptada por Schmechel y Crothers<sup>39</sup> y finalmente modificada por Wolfe y colaboradores quien exitosamente aplicaron la ecuación para determinar la  $K_b$  intrínseca de moléculas hidrofóbicas como derivados del benzo[a]pireno.<sup>37</sup>

### 1. 3. 2. Fluorescencia: Ensayo de desplazamiento de bromuro de etidio

El bromuro de etidio (BE) es un fluoróforo que se une al ADN por intercalación entre los pares de bases. La emisión de fluorescencia de este compuesto aumenta significativamente en presencia del ADN, ya que su interacción con el ácido nucleico previene la desactivación del estado excitado del BE.<sup>40</sup>

El ensayo de desplazamiento del bromuro de etidio es un método indirecto para el estudio de interacción de pequeñas moléculas con el ADN. Fue descrito por primera vez por Morgan y colaboradores.<sup>41</sup> Este ensayo mide el *quenching* de la fluorescencia del BE, en presencia de ADN, cuando se añaden cantidades crecientes de la molécula objeto de estudio. La disminución de la intensidad de emisión puede estar causada por:<sup>42,43</sup>

- El desplazamiento del BE de la doble hélice del ADN a causa de la interacción de la molécula de estudio.
- Un cambio en la conformación del ADN causada por la molécula estudiada que provoca una mayor exposición del BE al medio.
- La oxidación del estado excitado del BE por la molécula a través de un mecanismo de transferencia fotoelectrónica.

Todas estas posibilidades implican que el fármaco estudiado esté próximo al complejo ADN/BE, y, por tanto, que interacciona con el ADN.

El *quenching* de la fluorescencia del sistema ADN-BE provocado por la segunda molécula, normalmente es dependiente de la concentración. Este proceso se rige por la ecuación de Stern-Volmer:<sup>44</sup>

$$I_0/I = 1 + K_{SV} [Q] \quad [2]$$

Donde  $I$  es la intensidad máxima de la emisión de fluorescencia del BE en cada una de las adiciones del compuesto,  $I_0$  es la intensidad máxima de la emisión de fluorescencia en ausencia del compuesto,  $[Q]$  es la concentración de compuesto y  $K_{SV}$  es la constante de Stern-Volmer, cuyo valor representa la capacidad de desactivación de los estados excitados del BE por parte de la molécula estudiada, lo que está relacionado con su afinidad por el ADN.

Otra posibilidad para cuantificar la afinidad del fármaco en estudio mediante este método, es el cálculo de la constante aparente ( $K_{app}$ ) que se lleva a cabo mediante la siguiente ecuación:

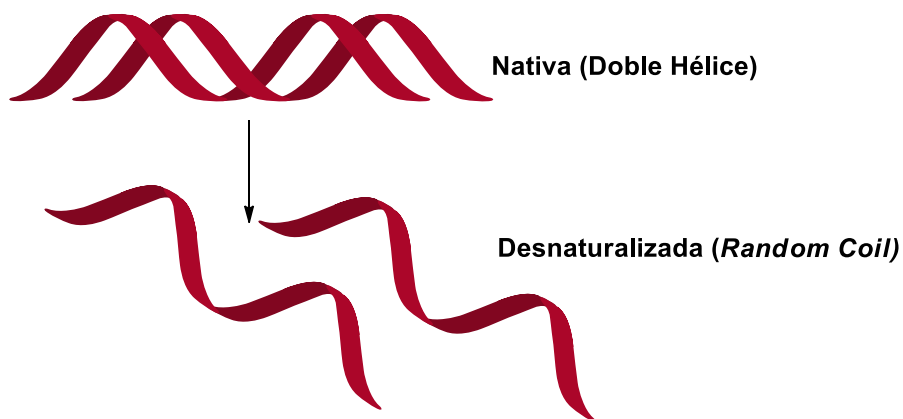
$$K_{BE} [BE] = K_{app} [\text{fármaco}] \quad [3]$$

Donde  $K_{EB} = 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ,<sup>45</sup>  $[BE]$  = Concentración de BE utilizada en el experimento;  $[\text{fármaco}]$  = concentración de fármaco a la cual  $I_0/I = 2$  (50% de reducción de la intensidad de fluorescencia).

El valor de la  $K_{app}$  da información sobre la afinidad del compuesto estudiado por el ADN en relación a la afinidad que presenta el BE.

### 1. 3. 3. Desnaturalización térmica del ADN

El proceso de separación de las dos hebras de la doble hélice del ADN por la ruptura de los enlaces de hidrógeno se conoce como desnaturalización del ADN o fusión (Figura III.20).<sup>46</sup> Este proceso tiene lugar al aumentar la temperatura del ADN en disolución.



**Figura III.20:** Desnaturalización de la doble hélice de ADN

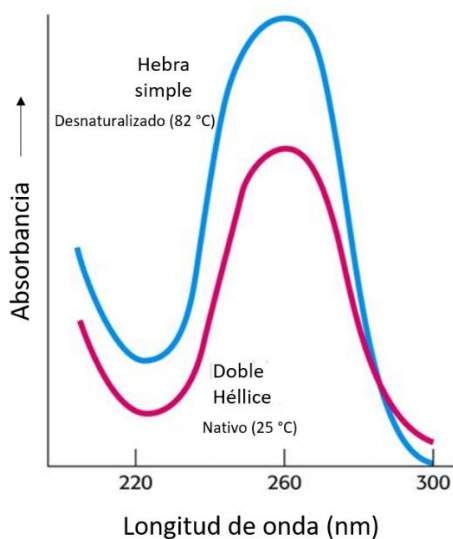
La temperatura que marca el punto medio del proceso de fusión se conoce como temperatura de fusión ( $T_m$ ). En la  $T_m$ , la mitad del ácido nucleico existe en forma de doble hélice, la otra mitad en forma de hebra simple y estas dos especies se encuentran en equilibrio.

Las interacciones de unión no covalente fármaco-ADN generalmente estabilizan la doble hélice de los ácidos nucleicos. Este hecho afecta directamente a la  $T_m$ . Por otro lado, la interacción covalente fármaco-ADN a través de los nitrógenos de las bases, normalmente desestabiliza la doble hélice. Por esta razón, los cambios producidos en la  $T_m$  en presencia de pequeñas moléculas nos dan información de la interacción compuesto-ADN.

El valor de la  $T_m$  puede detectarse por dicroísmo circular (DC), RMN, viscosidad, técnicas de electroforesis, colorimetría o espectroscopía UV, pero la técnica más común es la espectroscopía UV debido a su simplicidad, sensibilidad y reproducibilidad.<sup>46</sup>



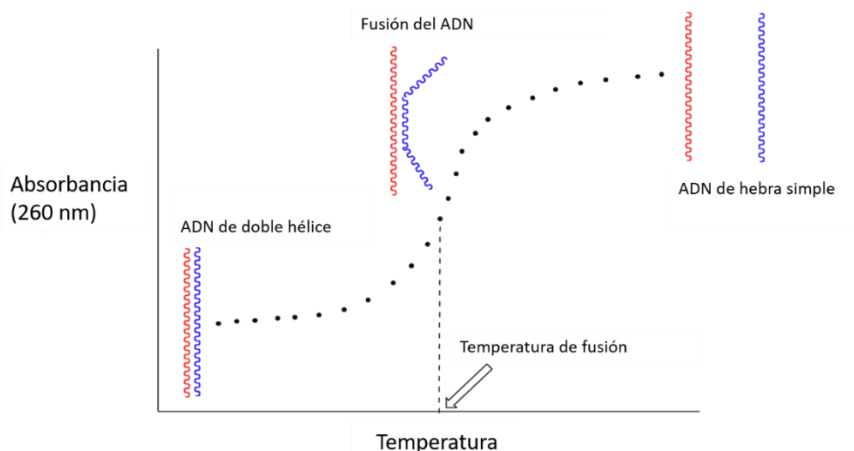
Las nucleobases son cromóforos de ADN que absorben en UV entre 250-280 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  de referencia es de 260 nm). La desnaturalización del ADN produce un incremento en la absorbancia a esta longitud de onda. Este efecto hipercrómico está causado por una reducción de las interacciones electrónicas entre las bases (Figura III.21).



**Figura III.21:** Efecto hipercrómico en la absorbancia UV del ADN tras el calentamiento una solución de ADN (Imagen modificada de <http://slideplayer.es/slide/3399985/>)

Para determinar la temperatura de fusión del ADN, se prepara una disolución de ADN en las condiciones adecuadas y se mide la absorbancia a 260 nm con el aumento de temperatura. A continuación, se representa la absorbancia vs temperatura. Se obtiene una gráfica donde las absorbancias más bajas corresponden al ADN de doble hélice, mientras que las absorbancias más altas corresponden al ADN de cadena simple. La temperatura de fusión está marcada por el punto de inflexión de la curva (Figura III.22). La diferencia entre la temperatura de fusión del ADN ( $T_{m0}$ ) y la del ADN en presencia de un fármaco o compuesto  $T_m$  se conoce como  $\Delta T_m$ . Además, se puede

establecer una relación entre  $\Delta T_m$  y la afinidad del fármaco por el ADN, mayor  $\Delta T_m$ , mayor afinidad.

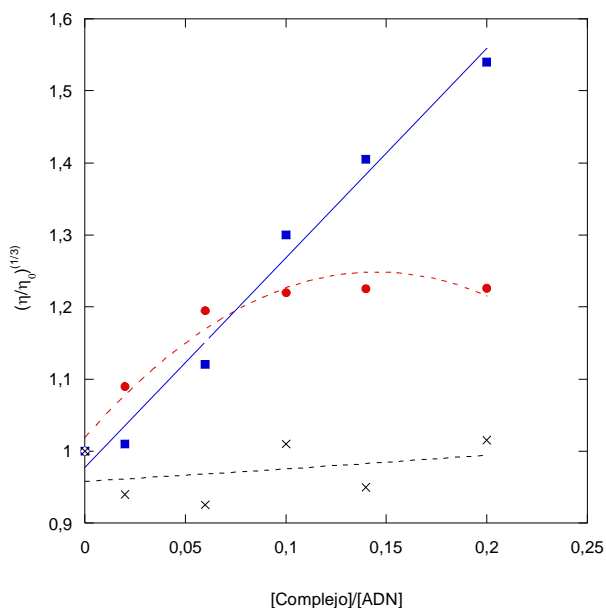


**Figura III.22:** Hiperromismo en la absorción UV del ADN tras el calentamiento de una disolución de ADN

### 1. 3. 4. Viscosimetría

Las medidas hidrodinámicas son sensibles a un aumento de la longitud en el ADN, por lo que la viscosimetría es uno de los métodos más fiables para estudiar el modo de interacción entre el ADN y las moléculas en disolución.<sup>47</sup>

Los intercalantes clásicos producen una elongación en la cadena del ADN por el desenrollamiento de la doble hélice, lo que causa un incremento en la viscosidad (Figura III.23). Por el contrario, los compuestos que se unen a los surcos o que interactúan electrostáticamente no modifican la viscosidad o inducen cambios poco significativos.<sup>48</sup> Los compuestos con capacidad de intercalar con el ADN de una manera parcial producen un aumento de la viscosidad a bajas concentraciones, pero ésta permanece constante a concentraciones más altas (Figura III.23).<sup>49</sup>



**Figura III.23:** Viscosidad de diferentes tipos de unión ADN-Compuesto

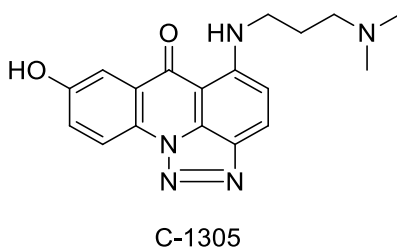
También podemos encontrar compuestos que inducen una disminución en la viscosidad del ADN, que puede explicarse por una reducción de la longitud del ADN como consecuencia de una interacción que provoca torsión en la doble hélice.<sup>50</sup>

#### 1.4. Objetivos

El estudio de la interacción de pequeñas moléculas con el ADN es clave para el desarrollo de compuestos antitumorales efectivos.

En la literatura hay pocos ejemplos de fármacos con capacidad para unirse al ADN que lleven en su estructura un anillo de triazol,<sup>36</sup> entre ellos se encuentran las triazoloquinolonas,<sup>51,52</sup> triazolnaftaliimidias,<sup>53</sup> triazoloacridonas,<sup>54,55</sup> 1-piridiltriazoles y sales de 1-piridilmetil-3-triazolium.<sup>56</sup>

La familia de las triazoloacridonas, sintetizadas en primer lugar por Cholody y colaboradores en 1990,<sup>57</sup> ha alcanzado gran notoriedad. En particular, la C-1305 (Figura III.24) es una triazoloacridona con actividad antitumoral.<sup>57-59</sup> La actividad anticancerígena de este compuesto viene dada por su capacidad para inhibir la topoisomerasa II, enzima que controla los cambios en la estructura del ADN catalizando la ruptura y la unión del esqueleto fosfodiéster del mismo. Esta actividad está relacionada con su capacidad para intercalarse entre las nucleobases del ADN.<sup>54,55</sup>



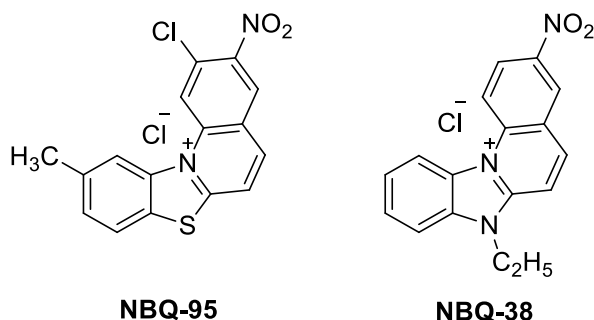
**Figura III.24:** Triazoloacridona C-1305

Los derivados de triazolopiridina<sup>60</sup> y sales de triazolopiridinio<sup>61</sup> han suscitado un gran interés por su capacidad para interactuar con el ADN y su potencial actividad biológica.

También se han obtenido derivados de triazolopiridina capaces de interactuar con el ADN a través de los surcos y con actividad fonucleasa muy relevante, que hace de estos compuestos prometedores agentes antitumorales.<sup>62</sup>

Dentro de los fármacos con un anillo de triazol en su estructura, los derivados de quinolinio también han mostrado tener capacidad para unirse al ADN, en particular, las sales de benzo[4,5]triazolo[3,2-*a*]quinolinio NBQ-95 y benzo[4,5]imidazolo[3,2-*a*]quinolinio NBQ-38 (Figura III.25).<sup>63</sup> Estos compuestos actúan por reducción

enzimática con hipoxantina/xantina oxidasa bajo condiciones anaeróbicas. Los compuestos activos son los derivados reducidos, ya que los NBQ's actúan como profármacos.



**Figura III.25:** Sales de Benzo[4,5]azolo[3,2-*a*]quinolinio

Recientemente en nuestro laboratorio se han obtenido nuevos diquats derivados de triazoloquinolina con capacidad para interactuar con el ADN.<sup>64</sup>

Estudios anteriores realizados por Mazzoli et al.<sup>65</sup> demostraron que el remplazo del grupo piridina por la quinolina, parecía favorecer la interacción del compuesto con el ADN, con un incremento de la constante de unión de hasta 5 veces más que el análogo de piridinio. Probablemente, la planaridad de la estructura de los derivados de quinolina provoca cambios en la interacción favoreciendo la intercalación.<sup>66</sup>

Por ello, uno de nuestros objetivos es el desarrollo de nuevos compuestos basados en triazoloquinolinas y estudiar su capacidad de interactuar con el ADN. En este contexto, las monosales y disales de triazoloquinolinio son una buena elección, ya que cumplen ciertos requerimientos para ser buenos agentes que interactúan con el ADN: son heterociclos nitrogenados con estructura planar<sup>67,68</sup> por lo que podrían

intercalar entre los pares de bases y, además, tienen carga positiva que daría lugar a una interacción electrostática favoreciendo, a su vez, el proceso de intercalación.

En concreto, en esta parte del trabajo se estudia la interacción de los compuestos **4d**, **4e**, **5a-d**, **6a-d** y **7a-c** con el ADN.

## 2. INTERACCIÓN DE MONOALES DE TRIAZOLOQUINOLINIO CON ADN

Se ha estudiado la interacción con el ADN de las monosales **4d**, **4e**, **5a**, **5b**, **5c** y **5d** (Figura III.26) previamente descritas en el capítulo II, mediante diferentes técnicas tales como desnaturalización térmica, espectroscopía UV-Visible, espectroscopía de fluorescencia y viscosimetría.

Los resultados obtenidos, en su conjunto, nos permitirán conocer las características y el tipo de interacción de estos compuestos con el ADN.

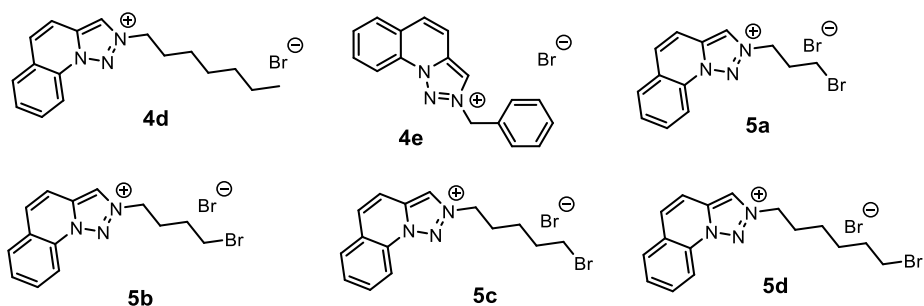


Figura III.26: Monosales utilizadas para el estudio con la interacción del ADN

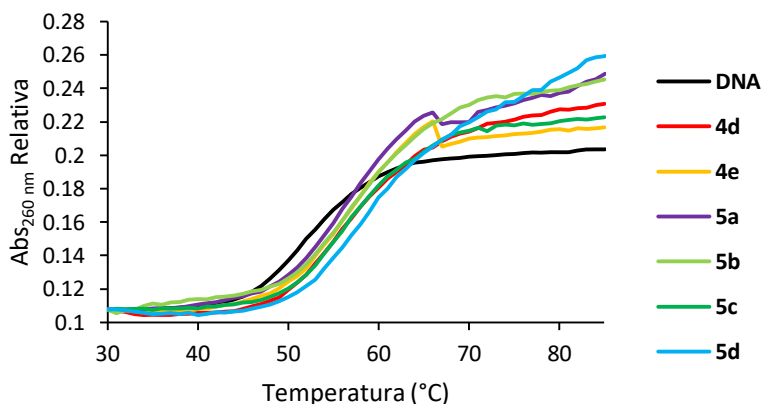
### 2. 1. Desnaturalización térmica

Para estudiar la interacción de las monosales con el ADN, en primer lugar, se han llevado a cabo ensayos de desnaturalización térmica. Para ello se registran los espectros de absorción del CT-ADN y CT-ADN en presencia de compuesto a diferentes relaciones ADN-compuesto en el rango de temperatura comprendido

entre 30 y 85 °C en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM. Se representa la absorbancia a 260 nm frente a la temperatura y a partir del punto de inflexión de la curva se determina la temperatura de fusión ( $T_m$ ) (Figura III.27). Se calcula el  $\Delta T_m$  que corresponde a la diferencia entre la temperatura de fusión del ADN-compuesto y la temperatura de fusión del ADN.

Las condiciones experimentales de cada uno de los ensayos se indican detalladamente en el apartado III.5.2.

Los resultados (Figura III.27 y Tabla III.1) muestran que todas las monosales producen un aumento moderado de la temperatura de fusión del ADN, hecho que indica que los compuestos interaccionan estabilizando la doble hélice del ADN. Este aumento moderado sugiere, además una posible interacción de estas moléculas a través de los grupos fosfato y/o surcos.



**Figura III.27:** Curvas de desnaturalización térmica CT-DNA 100  $\mu$ M (nucleótidos) en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM, pH = 7.2, en ausencia (negro) y presencia de compuestos **4d**, **4e**, **5a**, **5b**, **5c** y **5d** a 50  $\mu$ M ( $[\text{CT-ADN}]/[\text{Compuesto}] = 2$ ).



**Tabla III.1:** Datos de incremento de temperatura para las monosales.

<b>Monosal</b>	<b><math>\Delta T_m</math> (°C)</b>
<b>ADN-4d</b>	6.7
<b>ADN-4e</b>	4.2
<b>ADN-5a</b>	4.3
<b>ADN-5b</b>	5.3
<b>ADN-5c</b>	5.1
<b>ADN-5d</b>	7.1

Las monosales **4d** y **5d** son las que provocan un mayor cambio en la temperatura de fusión del ácido nucleico, que pone de manifiesto que la interacción del ADN con estos dos compuestos es más fuerte que en el resto de las monosales, esto, a su vez, sugiere que la interacción de los compuestos con el ADN podría estar relacionada con la longitud de la cadena.

Con la finalidad de determinar si estos compuestos presentan algún tipo de preferencia por determinadas secuencias del ADN, se realizaron estudios de desnaturalización térmica con el polinucleótido poly(dA-dT)<sub>2</sub>. Los resultados se muestran a continuación en la tabla **III.2**. Las condiciones de ensayo fueron las mismas utilizadas para los ensayos con CT-ADN.

**Tabla III.2:** Datos de incremento de la temperatura de fusión con poly(dA-dT)<sub>2</sub> para los compuestos **4d-e** y **5a-d**.

<b>Monosal</b>	<b><math>\Delta T_m</math> (°C)</b>
<b>ADN-4d</b>	4.0
<b>ADN-4e</b>	2.4
<b>ADN-5a</b>	1.5
<b>ADN-5b</b>	3.0
<b>ADN-5c</b>	1.0
<b>ADN-5d</b>	3.4

El aumento de la temperatura de fusión, en general, del poly(dA-dT)<sub>2</sub> producido por las monosales es menor que el aumento de la temperatura de fusión del CT-ADN en presencia de los mismos. En algunos casos este incremento no es significativo.

De igual manera a lo observado para CT-ADN son las monosales con la cadena más larga las que producen un mayor cambio de la temperatura de fusión. El hecho de que estos compuestos presenten una mayor afinidad por el CT-ADN, sugiere que no tienen una marcada preferencia por secuencias del ADN ricas en A-T y que su interacción con secuencias ricas en G-C probablemente estabiliza en mayor medida la doble hélice que su interacción con secuencias ricas en A-T.<sup>62</sup>

## **2.2. Valoraciones UV-Visible**

Una vez realizados los ensayos de desnaturalización térmica se procedió al estudio de la interacción de las monosales mediante valoración UV-Visible. Los compuestos **4d** y **4e** y **5a-d** presentan el mismo cromóforo en el UV y poseen dos bandas con

máximo a 318 nm ( $\epsilon = 15.9$ ) y 332 nm ( $\epsilon = 16.6$ ), atribuidas a transiciones  $\pi\text{-}\pi^*$ . Este tipo de compuestos presenta una banda alrededor de 250 nm debida al anión  $\text{Br}^-$ , como ya se ha visto en compuestos estructuralmente relacionados.<sup>69</sup>

A una disolución de concentración constante de compuesto, se añaden cantidades crecientes de ADN y se registran los espectros de absorción en el rango comprendido entre 300-500 nm. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado **III.5.3**.

Los resultados se presentan en las figuras **III.28-33**. Los espectros que se muestran son espectros en diferencia, obtenidos restando al espectro del compuesto-ADN el correspondiente espectro del ADN registrado en las mismas condiciones experimentales. De este modo, los espectros en las figuras **III.28-33** muestran únicamente el efecto que el ADN produce en el espectro de absorción del compuesto.

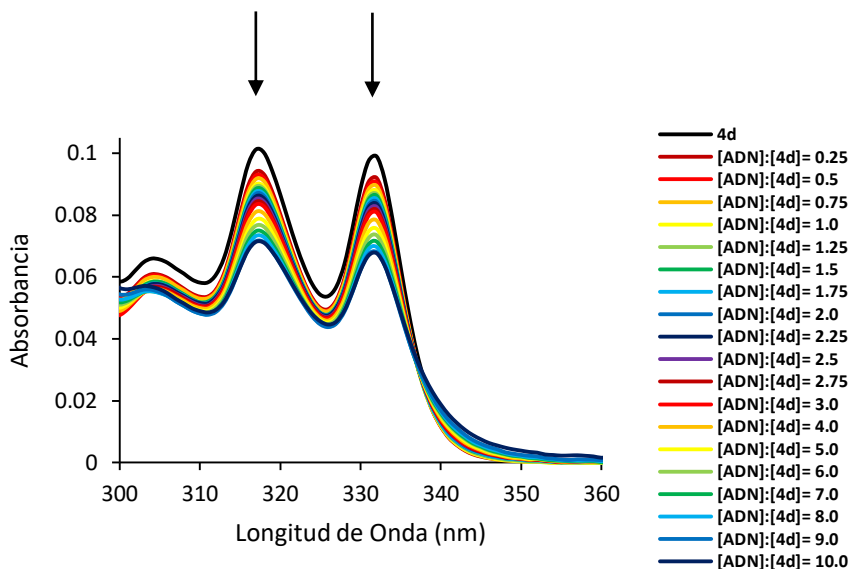
La adición de cantidades crecientes de ADN ( $[\text{ADN}]:[\text{compuesto}] = 0.0\text{-}10.0$ ) a la disolución de los compuestos, produce una disminución de la intensidad de absorción de las bandas características de las monosales (318 y 332 nm) (Tabla **III.3**). No se aprecia un desplazamiento significativo en los máximos de absorción. Además, se observa un punto isobéptico alrededor de 337 nm, lo que indica la formación de un aducto compuesto-ADN y que está en equilibrio con el compuesto libre.<sup>65,66</sup>

**Tabla III.3:** Hipocromismo (%) de las bandas a 318 y 332 nm tras la última adición de ADN  
(relación [ADN]:[Compuesto] = 10)

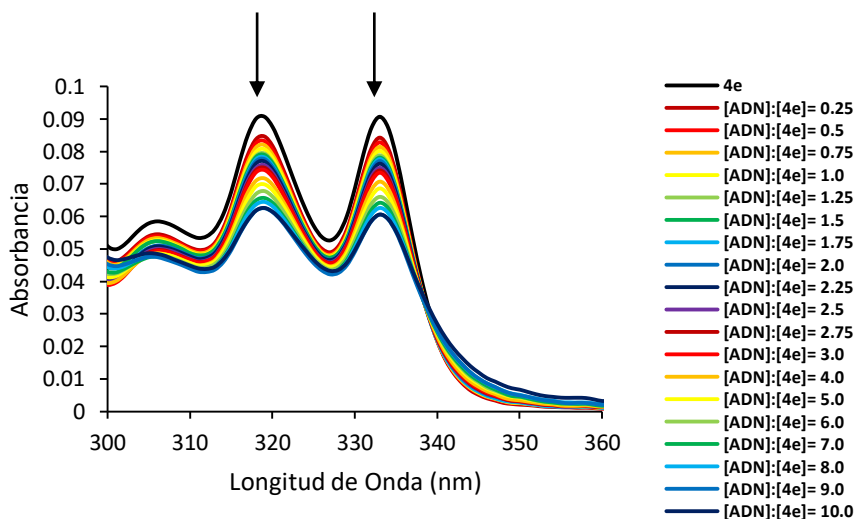
<b>Monosal</b>	<b>318 nm (%)</b>	<b>332 nm (%)</b>
<b>4d</b>	31	33
<b>4e</b>	30	31
<b>5a</b>	28	30
<b>5b</b>	32	33
<b>5c</b>	30	32
<b>5d</b>	26	29

El hipocromismo en la banda a 318 y 332 nm que presentan los espectros de los compuestos tras la adición de ADN es similar para todos los compuestos y está comprendido entre 26-33%.

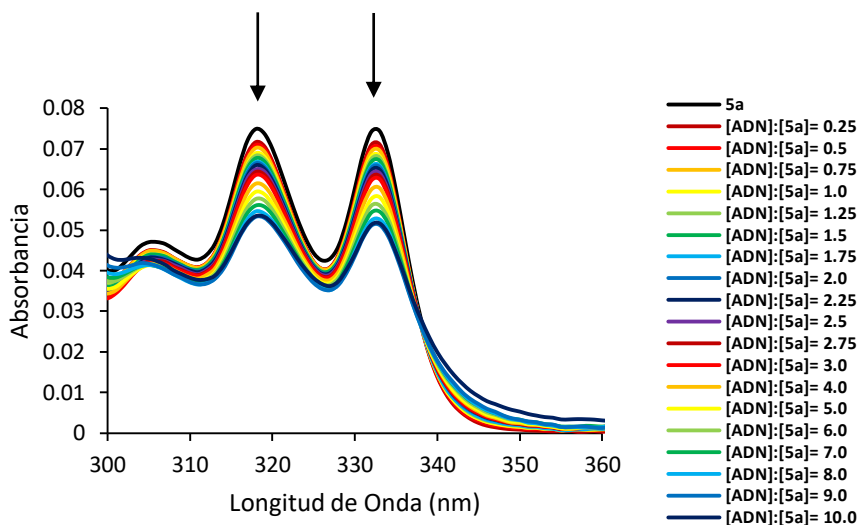
A continuación, se muestran los espectros de absorbancia para los compuestos **4d-e** y **5a-d**.



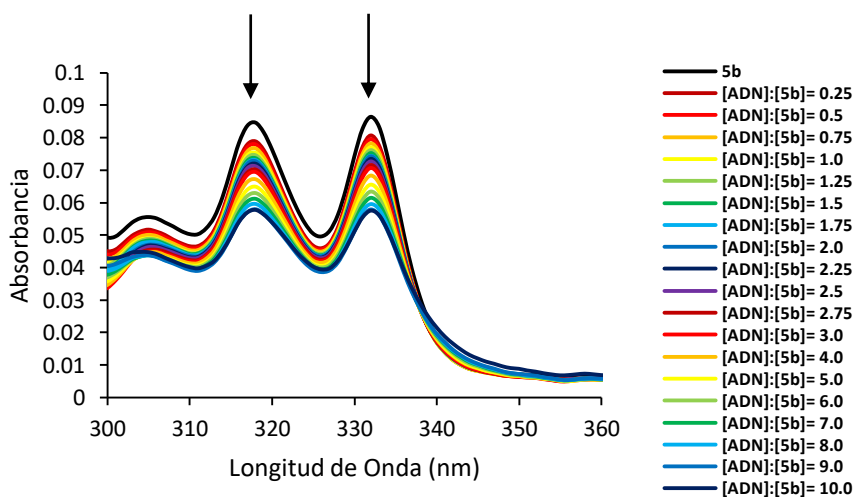
**Figura III.28:** Espectros UV del compuesto **4d** 20  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en presencia y ausencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto de la adición de CT-ADN en la absorbancia.



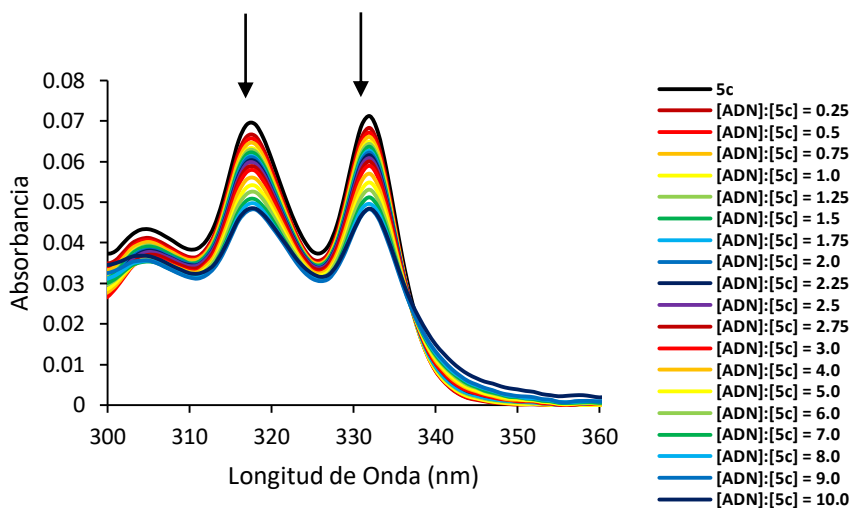
**Figura III.29:** Espectros UV del compuesto **4e** 20  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1mM (NaCl 2mM), pH = 7.2, en presencia y ausencia de concentraciones crecientes de [CT-DNA] de 5.0 a 200  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.



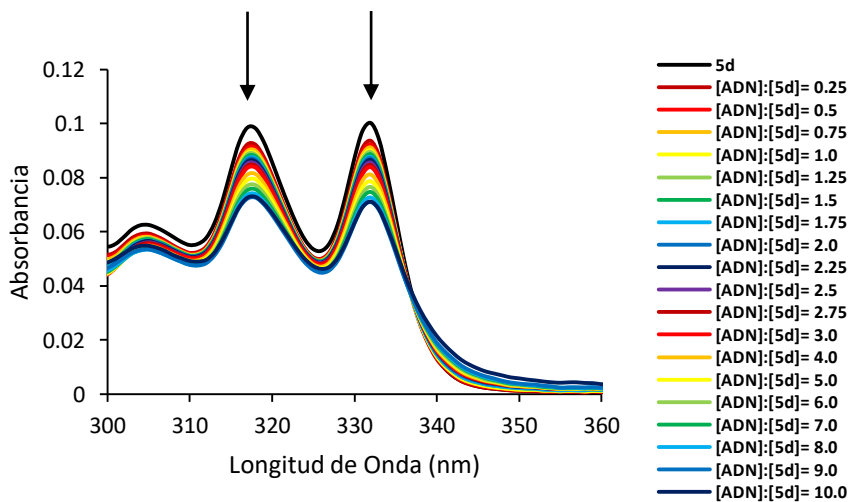
**Figura III.30:** Espectros UV del compuesto **5a** 20  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en presencia y ausencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.



**Figura III.31:** Espectros UV del compuesto **5b** 20  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.



**Figura III.32:** Espectros UV del compuesto **5c** 20 μM en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200 μM. Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.



**Figura III.33:** Espectros UV del compuesto **5d** 20 μM en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200 μM. Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.

Los cambios observados en los espectros de los compuestos tras la adición de ADN, indican claramente la existencia de una interacción fuerte de los compuestos con el ácido nucleico que, de acuerdo con los datos en la bibliografía, podría tener lugar por intercalación de los compuestos entre los pares de bases del ADN.<sup>70</sup> Cuando el compuesto se intercala entre los pares de bases del ADN, sus orbitales  $\pi^*$  podrían acoplarse con los orbitales  $\pi$  de los pares de bases, dando lugar a una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  responsable del hipocromismo observado.<sup>71</sup> Sin embargo, dado que el tipo de interacción no puede proponerse con exactitud mediante estos estudios, no podemos excluir para nuestros compuestos, una interacción por los surcos y, dado que son compuestos cargados, tampoco se puede excluir una interacción electrostática tal y como se demuestra a partir de los estudios de desnaturalización térmica.

El % de hipocromismo se relaciona habitualmente con la afinidad del compuesto con el ADN. En nuestro caso no se observan diferencias significativas que nos permitan establecer un orden de afinidad de las monosales por el ADN.

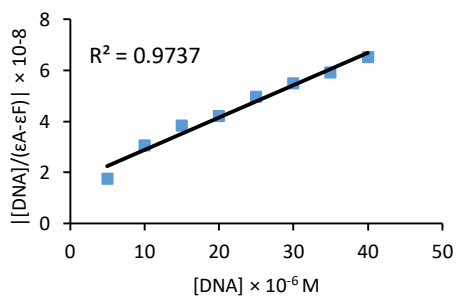
Para determinar cuantitativamente la interacción de los compuestos con el ADN, se calculó la constante de binding ( $K_b$ ) utilizando el método *Wolfe-Shimer*, monitorizando el cambio en la intensidad de absorción del espectro de la banda a 318 nm con la adición de concentraciones crecientes de ADN, utilizando la ecuación 1.<sup>37</sup>

$$[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{ADN}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)] \quad [1]$$

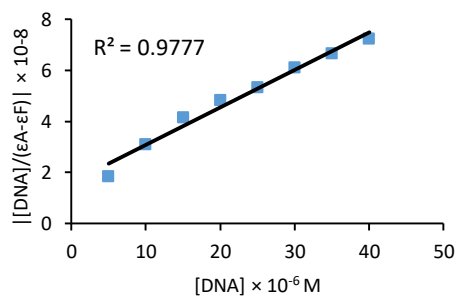
Cuando se representa  $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  frente a la  $[\text{ADN}]$ , se observa que la interacción de las monosales se regía por dos procesos claramente diferenciados que se ajustan, cada uno de ellos, a una recta (Figura III.34 y III.35).



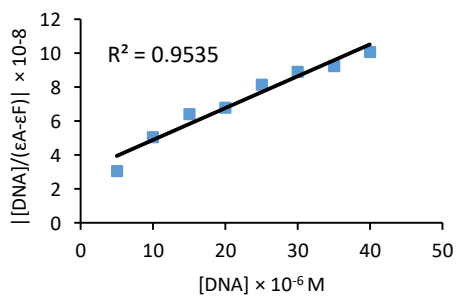
4d



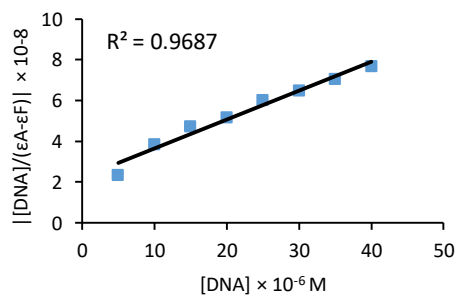
4e



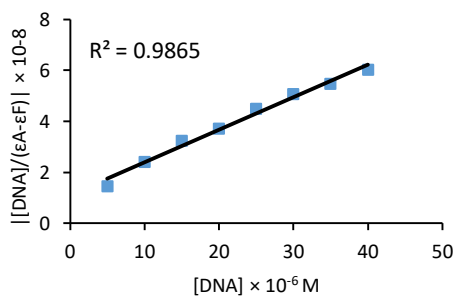
5a



5b



5c



5c

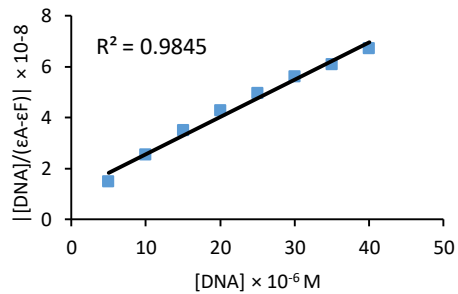
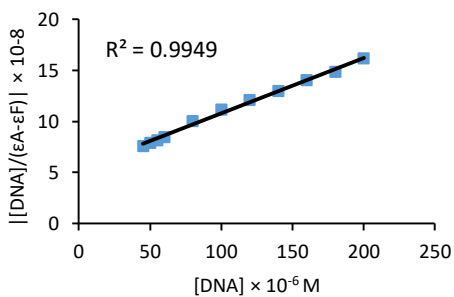
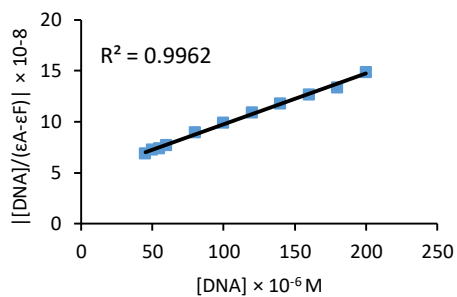


Figura III.34: Gráfica de Wolfe-Shimer de las valoraciones UV de las monosales para el primer proceso.  $[ADN]:[Compuesto] = 0.0-2.0$ .

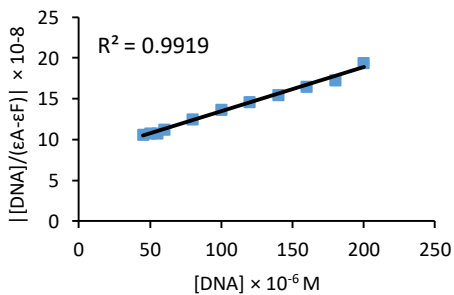
4d



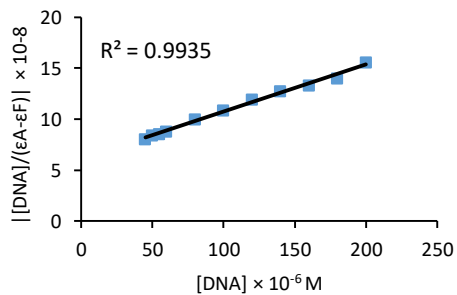
4e



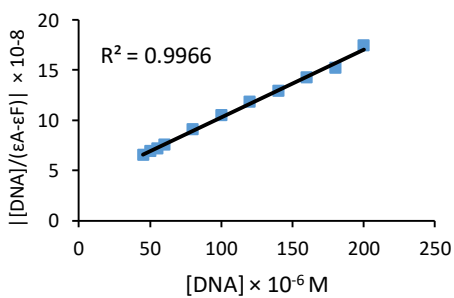
5a



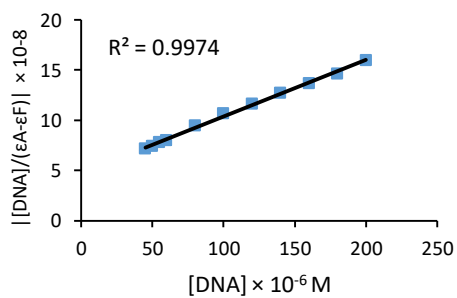
5b



5c



5d



**Figura III.35:** Gráfica de Wolfe-Shimer de las valoraciones UV de las monosales para el segundo proceso.  $[\text{ADN}]:[\text{Compuesto}] = 2.25-10$ .

El primero de los procesos tiene lugar a bajas concentraciones de ADN, entre las relaciones [ADN]:[Compuesto] = 0-2 y el segundo, a altas concentraciones, entre las relaciones [ADN]:[Compuesto] = 2.25-10. Este hecho sugiere que la interacción de estos compuestos es diferente en función de la concentración de ADN. Por ello, se calcula una constante de unión para cada uno de estos procesos,  $K_{b1}$  y  $K_{b2}$ , respectivamente (Tabla III.4).

**Tabla III.4:** Tabla para las  $K_{b1}$  y  $K_{b2}$  para las monosales estudiadas

<b>Monosal</b>	<b><math>K_{b1}</math></b>	<b><math>K_{b2}</math></b>
<b>4d</b>	$1.2 \times 10^5$	$1.25 \times 10^4$
<b>4e</b>	$1.1 \times 10^5$	$1.25 \times 10^4$
<b>5a</b>	$6.3 \times 10^4$	$5.0 \times 10^3$
<b>5b</b>	$5.5 \times 10^4$	$6.67 \times 10^3$
<b>5c</b>	$9.9 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$
<b>5d</b>	$1.6 \times 10^5$	$1.25 \times 10^4$

Como podemos observar, las constantes para **4e**, **4d**, **5c** y **5d** son similares y generalmente superior a la afinidad de **5a** y **5b**, que a su vez presentan afinidades comparables.

En general, la constante del primer proceso es 10 veces superior a la constante del segundo proceso. Lo que indica que la interacción a bajas concentraciones de compuesto es más fuerte que la interacción que tiene lugar a altas concentraciones.

Los mismos resultados se obtuvieron cuando se monitorizó el cambio de la banda a 332 nm.

El valor de las  $K_{b1}$  sugiere que estos compuestos interaccionan con el ADN mediante intercalación.<sup>71</sup> Además, estos valores concuerdan con las constantes de unión calculadas para compuestos que presentan, al menos, dos tipos de interacción dependiendo de la concentración.<sup>72</sup> Y al igual que en estos estudios, la  $K_{b1}$  muestra valores más altos que la  $K_{b2}$ . Un comportamiento bifásico, ha sido observado ocasionalmente, en la interacción de complejos metálicos que intercalan entre los pares de bases del ADN.<sup>73</sup> Sin embargo, en estos casos el hipocromismo es mucho menor que el observado para nuestros compuestos, lo cual indica que los cambios en el espectro de las monosales de triazoloquinolinio, no son debidos, simplemente, a efectos de apilamiento. Una interacción mixta se ha descrito también para algunas sales de piridinio.<sup>74</sup> Por otra parte, se han publicado complejos de Ru (II) que presentan dos tipos de interacción dependiendo de la concentración del ADN. El hipocromismo observado en el espectro UV para estos compuestos a concentraciones bajas de ADN se atribuye, principalmente, al apilamiento del compuesto consigo mismo a la vez que interacciona con el ADN. Y el hipocromismo que tiene lugar a concentraciones mayores se considera debido al apilamiento del compuesto entre los pares de bases del ADN.<sup>75</sup> De acuerdo con los datos de la bibliografía, podríamos proponer o bien una interacción mixta (intercalación e interacción mediante los surcos, además de la electrostática) o un modo de interacción semejante al descrito para los complejos de rutenio anteriormente mencionados, que implicaría un proceso de autoagregación de las monosales.

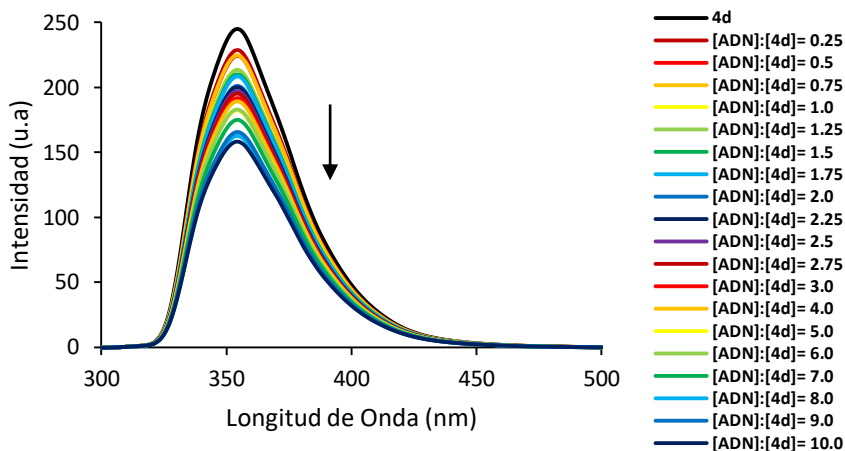
### 2. 3. Estudios por fluorescencia

Puesto que las monosales de triazoloquinolinio tienen propiedades fluorescentes, la interacción con el ADN también se estudió monitorizando los cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia en presencia de ADN.

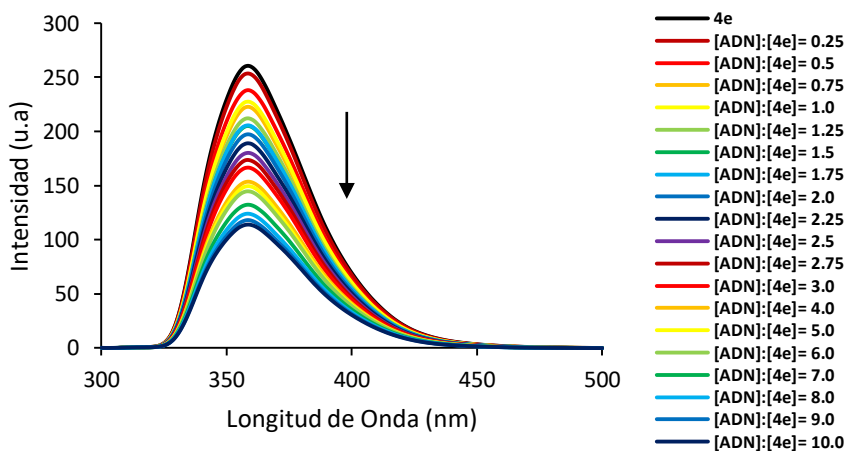
Para estos ensayos disoluciones de los compuestos en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM (pH = 7.2) se excitaron a 286 nm y los espectros se registraron entre 300 y 500 nm. Las condiciones experimentales para estos estudios se detallan en el apartado **III.5.4**. Los resultados se muestran en las figuras **III.36-41**.

Todas las monosales presentan un máximo de emisión entre 355-360 nm.

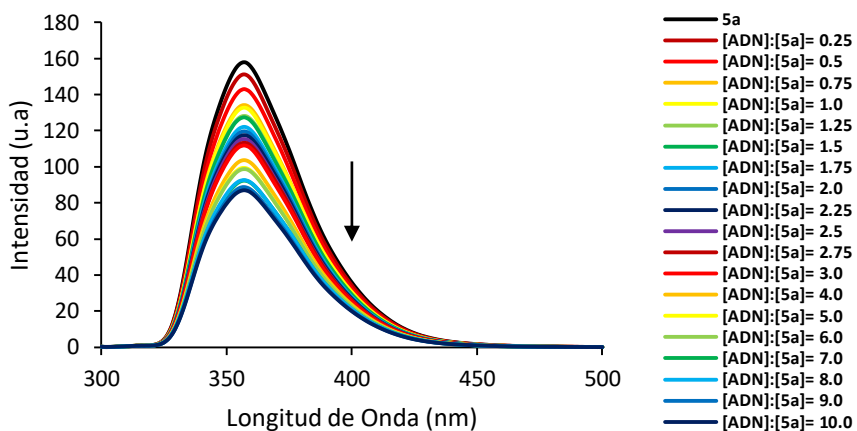
La adición de cantidades crecientes de ADN da lugar a una disminución significativa en la intensidad de emisión de las distintas monosales, que sugiere la interacción de estos compuestos con el ADN. El *quenching* de la intensidad de emisión probablemente sea debida a la transferencia de carga entre los compuestos y los pares de bases del ADN.<sup>65</sup>



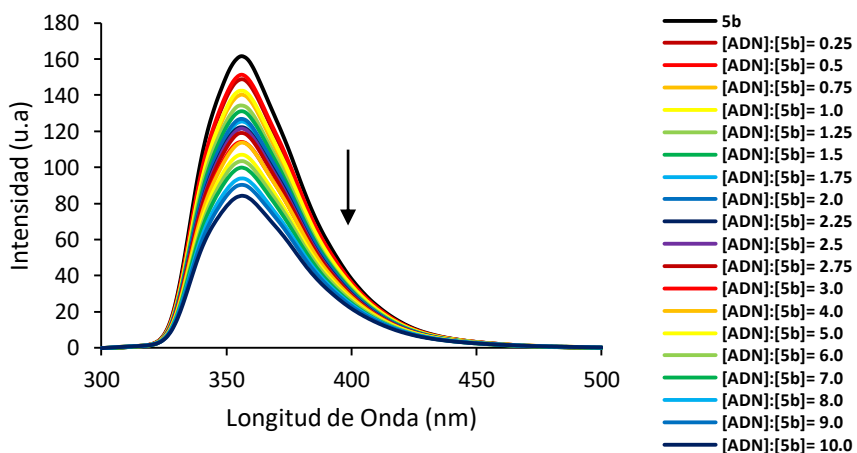
**Figura III.36:** Espectros de emisión de fluorescencia del compuesto **4d** 5  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM, pH = 7.2, en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [CT-DNA] de 1.25 a 50  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-ADN en la emisión de fluorescencia.



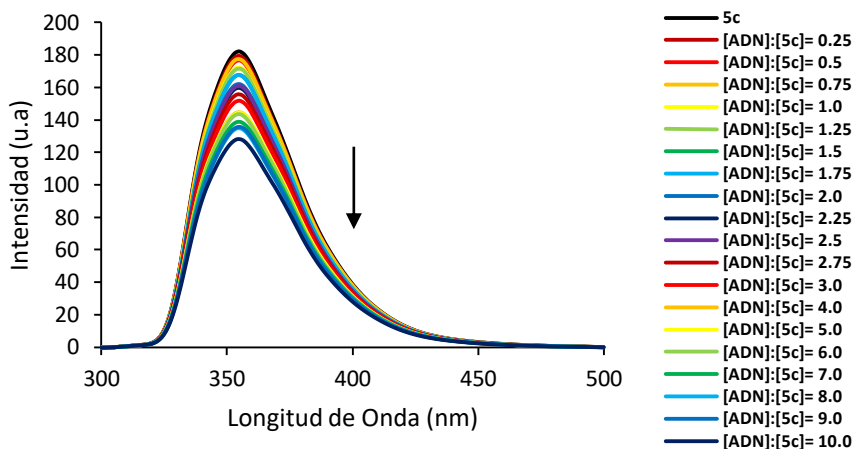
**Figura III.37:** Espectros de emisión de fluorescencia del compuesto **4e** 5  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM, pH = 7.2, en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [CT-DNA] de 1.25 a 50  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-ADN en la emisión de fluorescencia.



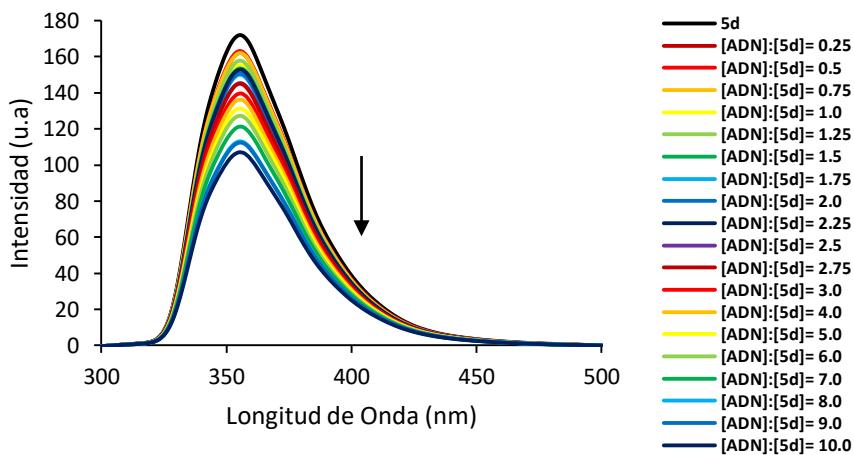
**Figura III.38:** Espectros de emisión de fluorescencia del compuesto **5a** 5  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [CT-DNA] de 1.25 a 50  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la emisión de fluorescencia.



**Figura III.39:** Espectros de emisión de fluorescencia del compuestos **5b** 5  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [CT-DNA] de 1.25 a 50  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la emisión de fluorescencia.



**Figura III.40:** Espectros de emisión de fluorescencia del compuesto **5c** 5  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [CT-DNA] de 1.25 a 50  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la emisión de fluorescencia.



**Figura III.41:** Espectros de emisión de fluorescencia de los compuestos **5d** 5  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [CT-DNA] de 1.25 a 50  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la emisión de fluorescencia.



El cambio en las propiedades fotofísicas de las monosales de triazoloquinolinio en presencia de ADN (Tabla III.6) confirma la interacción de éstas con el ácido nucleico y la consiguiente formación de un aducto monosal-ADN.

**Tabla III.6:** Hipocromismo de valoración de fluorescencia con ADN para las monosales

Monosal	Hipocromismo (%)
<b>4d</b>	35
<b>4e</b>	56
<b>5a</b>	45
<b>5b</b>	48
<b>5c</b>	30
<b>5d</b>	38

En la tabla podemos observar como el compuesto **4e** experimenta un mayor hipocromismo, lo que podría explicarse por una interacción más fuerte con el ADN. Este hecho concuerda con las constantes de unión de UV-Visible (Tabla III.4).

Como se ha indicado, el *quenching* de emisión se debe a la transferencia electrónica de las bases del ADN al compuesto.<sup>65</sup> Para un gran número de compuestos la extensión del *quenching* se relaciona directamente con la mayor afinidad del compuesto por el ADN.<sup>76</sup>

Además, se han descrito ejemplos donde el *quenching* en la emisión del compuesto se atribuye a un proceso de fotooxidación de las nucleobases del ADN.<sup>77-79</sup>

La eficiencia de *quenching* se evaluó mediante la constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), calculada a partir de la ecuación 2:

$$I_0/I = 1 + K_{SV} [ADN] \quad [2]$$

Donde  $I$  es la intensidad máxima de la emisión de fluorescencia del BE en cada una de las adiciones del compuesto,  $I_0$  es la intensidad máxima de la emisión de fluorescencia en ausencia del compuesto,  $[Q]$  es la concentración de compuesto y  $K_{SV}$  es la constante de Stern-Volmer,

Los gráficos de Stern-Volmer se representan en la figura **III.42**, y las constantes  $K_{SV}$  se indican en la tabla **III.7**.

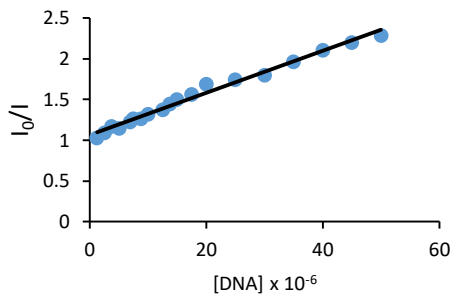
**Tabla III.7:** Tabla para las  $K_{SV}$  de las monosales de triazoloquinolinio

Monosal	$K_{SV}$
<b>4d</b>	$8.5 \times 10^3$
<b>4e</b>	$2.42 \times 10^4$
<b>5a</b>	$1.7 \times 10^4$
<b>5b</b>	$1.14 \times 10^4$
<b>5c</b>	$8.4 \times 10^3$
<b>5d</b>	$1.05 \times 10^4$

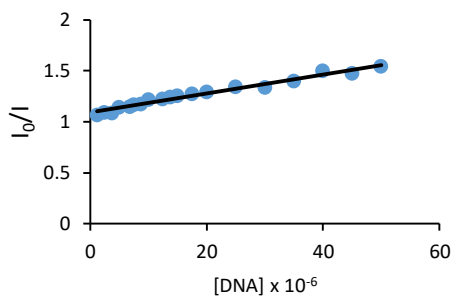
Se observa que los compuestos con valores mayores de  $K_{SV}$  son también los que tienen unas  $K_b$  superiores, por tanto, los datos de fluorescencia concuerdan con los datos obtenidos de las valoraciones UV.

Por otra parte, los valores de  $K_{sv}$  están en consonancia, aunque son ligeramente superiores, con los obtenidos para compuestos muy similares cargados positivamente sintetizados dentro de nuestro grupo de investigación.<sup>64</sup>

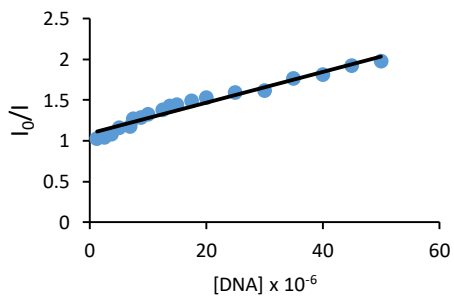
4d



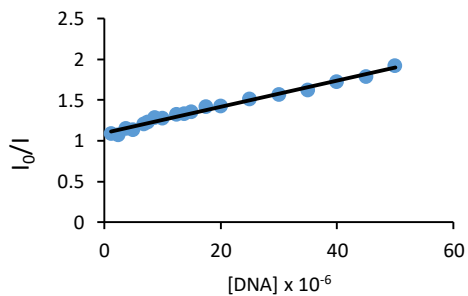
4e



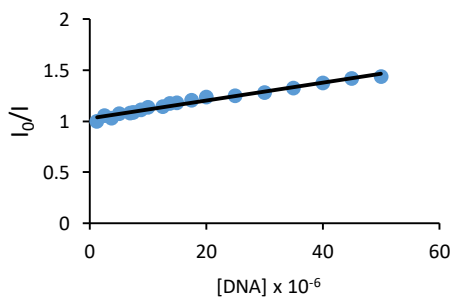
5a



5b



5c



5d

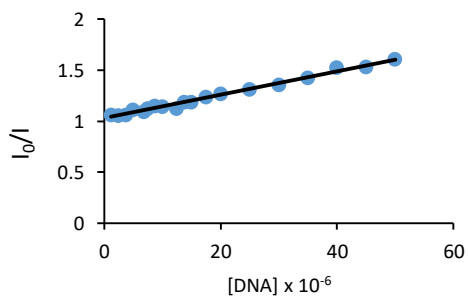


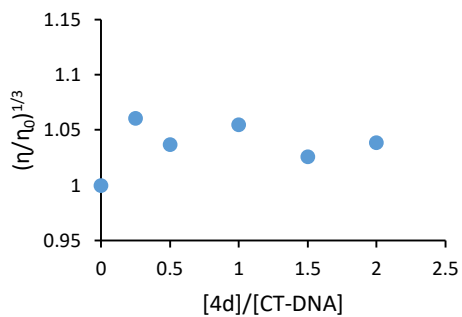
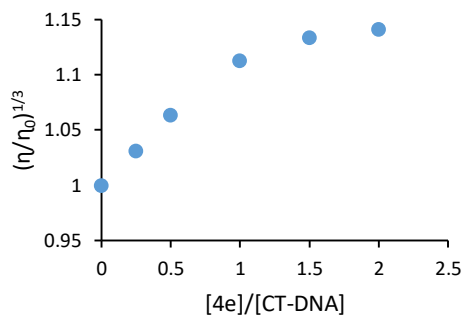
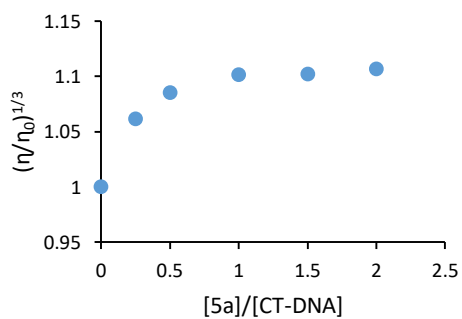
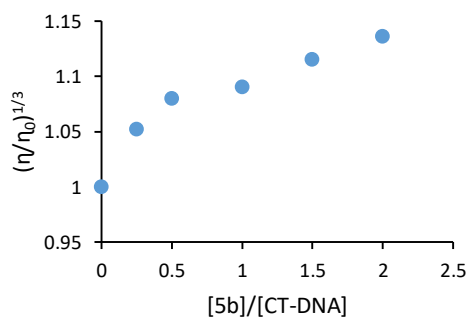
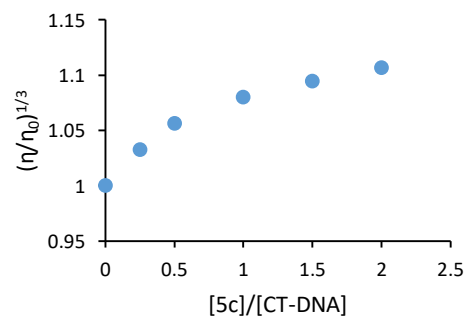
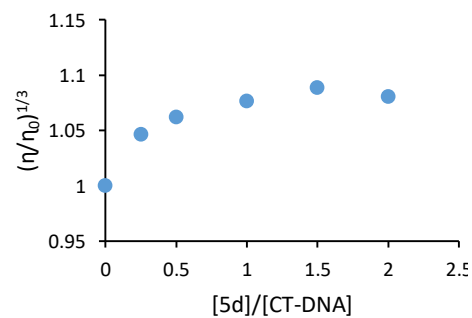
Figura III.42: Gráfica de Stern-Volmer de las valoraciones de fluorescencia de las monosales de triazoloquinolinio

## 2. 4. Estudios de interacción compuesto-ADN mediante viscosimetría

Las pruebas fotofísicas proporcionan información necesaria pero no suficiente para determinar un modo de interacción. Con el objetivo de obtener evidencia del tipo de interacción entre las monosales estudiadas y el ADN se llevaron a cabo medidas de viscosidad. En estos estudios se midió la viscosidad de disoluciones de ADN en ausencia ( $\eta_0$ ) y en presencia de cantidades crecientes de estos compuestos ( $\eta$ ). Se representa  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  frente a la relación [compuesto]/[ADN]. La tendencia que presentan los cambios de viscosidad del ADN con la adición de compuesto nos permite distinguir el modo de interacción.

Las condiciones experimentales se describen detalladamente en el apartado **III.5.6**.

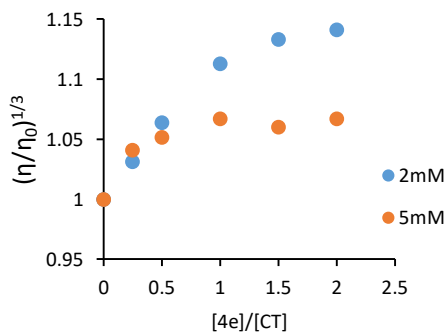
Los resultados para las monosales se representan en la figura **III.43**. Se aprecia que estos compuestos producen un ligero aumento de la viscosidad del ADN en disolución. Un aumento de la viscosidad está relacionado con la elongación de la hebra debido al desenrollamiento de la doble hélice la cual ocurre cuando un compuesto se intercala entre las nucleobases del ADN.<sup>80</sup> Además, excepto en el compuesto **4d**, se observa que, al aumentar la cantidad de monosal, la viscosidad se mantiene constante, este hecho es característico de compuestos que interaccionan con el ADN mediante intercalación parcial. Para el compuesto **4d**, la viscosidad del ADN no cambia significativamente, por lo que podemos deducir una interacción a través de los surcos y/o a través de los grupos fosfato.<sup>48</sup>

**4d****4e****5a****5b****5c****5d**

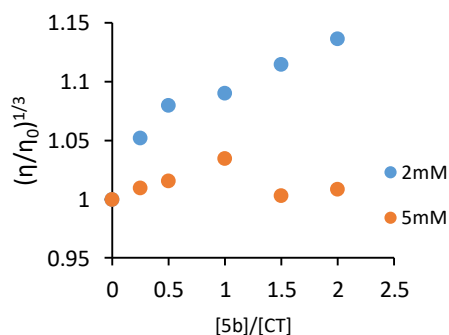
**Figura III.43:** Gráfico de viscosimetría para los compuestos **4d**, **4e**, **5a-d** con CT-DNA

Dada la naturaleza catiónica de estos compuestos consideramos interesante determinar la influencia de la fuerza iónica en la interacción de estos compuestos con el ADN. Para ello, se realizaron los estudios de viscosidad con los compuestos **5b** y **4e** a diferente fuerza iónica. Los resultados (Figura III.44) muestran que, a diferencia de los resultados anteriores con fuerza iónica 2 mM, la viscosidad del ADN no se modifica significativamente con la adición de los compuestos a fuerza iónica 5 mM. El hecho de que a fuerza iónica 5 mM no se produzcan cambios significativos sugiere que estos compuestos interaccionan a través de los surcos y/o de los grupos fosfato. A mayor fuerza iónica la interacción electrostática de los compuestos con los grupos fosfato del ADN disminuye y por consiguiente la intercalación de las monosales es menos favorable. Como es sabido la interacción electrostática favorece el proceso de intercalación.<sup>81</sup>

**4e**



**5b**



**Figura III.44:** Gráfico de viscosimetría para los compuestos **4e** y **5b** con CT-DNA en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM (azul) y NaCl 5 mM (naranja) (pH = 7.2).

### 3. INTERACCIÓN DE DISALES DE TRIAZOLOQUINOLINIO CON EL ADN

Del mismo modo que se procedió con las monosales de triazoloquinolinio, la interacción de las disales **6a-d** y **7a-c** (Figura III.45) con el ADN se ensayó con los mismos métodos de desnaturalización térmica, UV-visible, valoraciones de fluorescencia y viscosimetría.

Los fármacos que contienen dos unidades para poder intercalarse con el ADN, normalmente, tienen mayor afinidad por el ADN.<sup>82</sup>

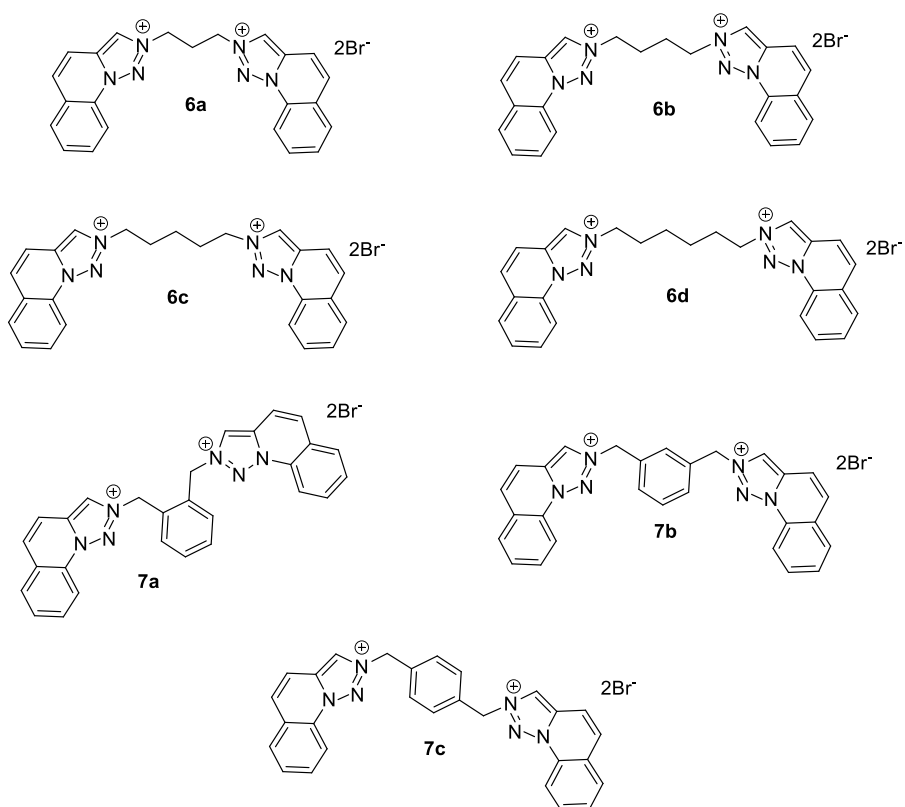


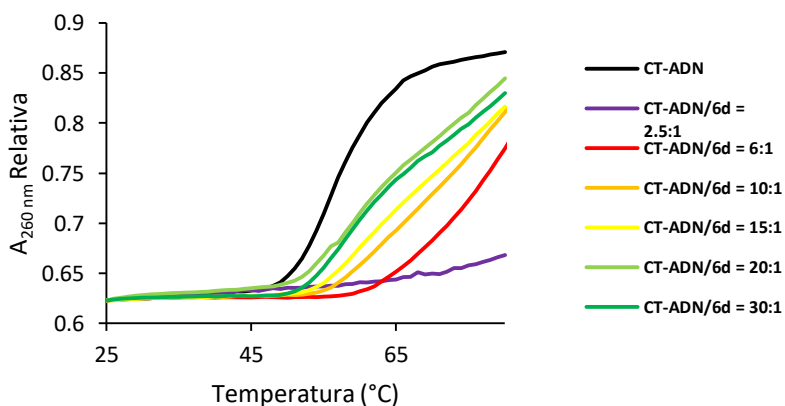
Figura III.45: Disales de triazoloquinolinio



### 3. 1. Desnaturalización térmica

Los estudios de desnaturalización térmica con las disales de triazoloquinolinio y CT-ADN se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo experimental que para las monosales. El procedimiento experimental se describe de forma detallada en el apartado III.5.2.

Como se ha indicado en las monosales, los ensayos de desnaturalización térmica, dependen significativamente de la relación [ADN]:[Compuesto]. Para determinar las condiciones más adecuadas para llevar a cabo estos estudios con las disales de triazoloquinolinio, en primer lugar, se determinó la temperatura de fusión del ADN en presencia de diferentes concentraciones del compuesto **6d** (Figura III.46) en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM (pH = 7.2).



**Figura III.46:** Curvas de desnaturalización térmica del CT-DNA 100  $\mu\text{M}$  (pares de bases) en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM, pH = 7.2, en ausencia (línea negra) y presencia del compuesto **6d** a diferentes relaciones [CT-DNA]/[**6d**].

Como se puede observar en la figura III.46, la interacción de **6d** con el ADN produce un aumento significativo de la temperatura de fusión del mismo, lo que indica que

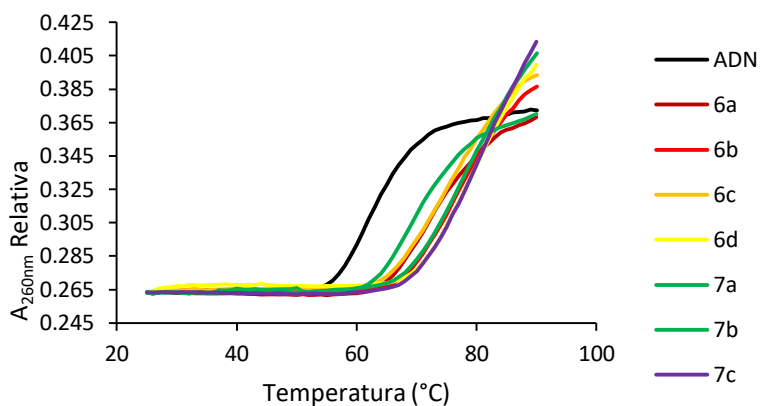
la unión de **6d** provoca una gran estabilización de la doble hélice. A las más altas concentraciones de compuesto ensayadas el desplazamiento de la temperatura de fusión es tal que la curva de desnaturalización térmica no se define adecuadamente. El estudio comparativo con la monosal análoga **5d**, nos sugiere que la relevante estabilización de la doble hélice del ADN se podría atribuir fundamentalmente, a la fuerte interacción electrostática con **6d**. Por ello se decidió determinar cómo influye la fuerza iónica en la interacción del compuesto. Se eligió ensayar la relación [ADN]:[Compuesto] = 6:1 con fuerza iónica 10 mM y la relación 10:1 con fuerza iónica 5 mM. Los resultados se muestran en la tabla **III.7**.

**Tabla III.7:** Incremento de la temperatura de fusión del ADN con el compuesto **6d** a diferentes relaciones y fuerzas iónicas.

[ADN]:[6d]	Fuerza Iónica		
	2 mM	5 mM	10 mM
<b>10:1</b>	n.d*	18.4	13.4
<b>6:1</b>	n.d*	22.7	16.9

\*n.d: No definido

A la vista de estos resultados, se decidió que las mejores condiciones de trabajo eran relación [ADN]:[compuesto] = 10:1 y la fuerza iónica 5mM. En estas condiciones se procedió al estudio de la desnaturalización térmica del ADN en ausencia y presencia de todas las disales. En la figura **III.47** y la tabla **III.8**, se muestran los resultados obtenidos.



**Figura III.47:** Curvas de desnaturalización térmica del CT-DNA 100  $\mu\text{M}$  (pares de bases) en tampón fosfato 1 mM, NaCl 5 mM, pH = 7.2 en ausencia (línea negra) y presencia de las disales (líneas coloreadas) a una relación [CT-DNA]/[Compuesto] = 10:1

**Tabla III.8:** Datos de desnaturalización térmica del ADN en presencia de las disales de triazoloquinolinio

Disal	$\Delta T_m$ (°C)
<b>6a</b>	10.9
<b>6b</b>	14.7
<b>6c</b>	13.6
<b>6d</b>	18.4
<b>7a</b>	8.8
<b>7b</b>	15.8
<b>7c</b>	20.9

En general, todas las disales provocan un gran aumento de la temperatura de fusión del ADN, especialmente los compuestos **6d** y **7c** (~18-21 °C). Las disales **6b**, **6c** y **7b** producen un desplazamiento similar (~13-15 °C). Los compuestos **6a** y **7a** provocan un menor aumento de la temperatura de fusión (~8-11 °C). Según estos resultados, se podría decir que los compuestos **6d** y **7c** presentan una mayor afinidad por el ADN, de la misma manera que las disales **6a** y **7a** presentarían una interacción más débil.

Los incrementos de T<sub>m</sub> de nuestros compuestos son similares e incluso superiores a los descritos para compuestos que presentan dos cargas positivas y cuya interacción se considera que tiene lugar por intercalación.<sup>83</sup> Teniendo en cuenta estos resultados podríamos sugerir que nuestros compuestos interaccionan del mismo modo, por intercalación.

El análisis detallado de los resultados, pone de manifiesto que el número de carbonos del *linker* entre los anillos de triazoloquinolina influye directamente en el incremento de temperatura de fusión, ya que las disales **6d** y la **7c** provocan una mayor estabilización de la doble hélice del ADN que indica que estos compuestos interaccionan más fuertemente con el ADN que el resto de las disales. En el caso de las monosales también se observó que la longitud de la cadena influía en el desplazamiento de la temperatura de fusión de la doble hélice (**4d** y **5d** fueron las monosales que indujeron un mayor desplazamiento en la temperatura de fusión del ADN).

Es destacable que las disales provocan un mayor aumento en la temperatura de fusión que las monosales, lo que corrobora la importancia de la interacción electrostática en este tipo de compuestos. Como cabría esperar, dado que las disales presentan dos cargas positivas en su estructura, la interacción electrostática de éstas es mayor que la interacción electrostática que se da con las monosales.

Con el objetivo de determinar si estos compuestos tienen cierta preferencia por regiones ricas en A-T del ADN, se llevaron a cabo estudios de desnaturalización térmica en las mismas condiciones, de desnaturalización térmica con poly(dA-dT)<sub>2</sub>. Los resultados se muestran en la tabla **III.9**.

**Tabla III.9:** Datos del incremento de temperatura de fusión de las disales con poly(dA-dT)<sub>2</sub>.

Disal	$\Delta T$ (°C)
<b>6a</b>	14.7
<b>6b</b>	27.4
<b>6c</b>	11.5
<b>6d</b>	17.6
<b>7a</b>	9.8
<b>7b</b>	24.3
<b>7c</b>	23.2

Los datos obtenidos de estos ensayos muestran que las disales **6a**, **6c**, **6d**, **7a** y **7c**, no difieren significativamente de los obtenidos en los estudios realizados con CT-DNA. Esto indica que estos compuestos no presentan una marcada preferencia por regiones ricas en AT del ADN. Por el contrario, los compuestos **6b** y **7b**, provocan un mayor aumento de la temperatura de fusión en el poly(dA-dT)<sub>2</sub> que en CT-DNA, hecho que demuestra que estos compuestos sí presentan una marcada preferencia por secuencias del ADN ricas en bases adenina y timina.

### 3.2. Valoraciones UV-Visible

Para profundizar en el estudio de la interacción de las disales con el ADN, se procedió al estudio de la interacción de los compuestos mediante valoración UV-Visible. A una disolución de concentración constante de compuesto, se añaden cantidades crecientes de ADN y se registran los espectros de absorción en el rango comprendido entre 300-500 nm. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado **III.5.3**.

En las figuras **III.48-54** se presentan los resultados obtenidos. Al igual que se hizo con las monosales, los espectros que se muestran son espectros en diferencia, obtenidos restando al espectro del compuesto-ADN el correspondiente espectro del ADN registrado en las mismas condiciones experimentales. De este modo, los espectros en las figuras **III.48-54** muestran únicamente el efecto que el ADN produce en el espectro de absorción del compuesto.

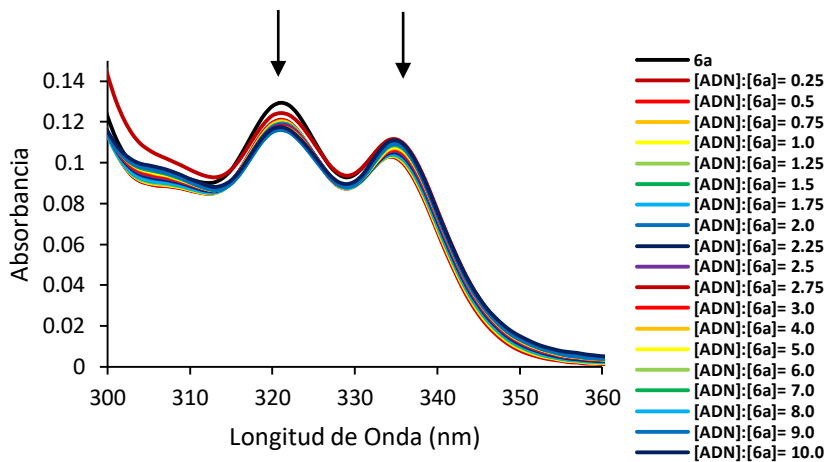
La adición de cantidades crecientes de ADN ([ADN]:[compuesto] = 0.0-10.0) a la disolución de los compuestos, produce una disminución significativa de la intensidad de absorción de las bandas características de las disales (318 y 332 nm) excepto en las disales **6a** (Figura **III.48**) y **7a** (Figura **III.52**) que no muestran cambios significativos (Tabla **III.10**).

**Tabla III.10:** Hipocromismo de las bandas a 318 y 332 nm tras la última adición de ADN  
(relación [ADN]:[Compuesto] = 20)

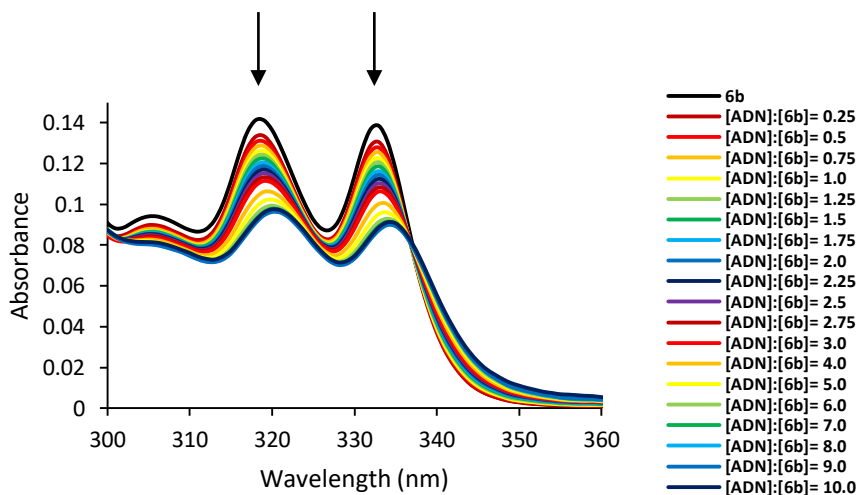
Disal	318 nm (%)	332 nm (%)	$\Delta\lambda_{\text{máx}}$ 318 nm	$\Delta\lambda_{\text{máx}}$ 332 nm
<b>6a</b>	5	3	-	-
<b>6b</b>	32	36	1	1
<b>6c</b>	33	38	1	2
<b>6d</b>	39	45	2	2
<b>7a</b>	8	2	-	-
<b>7b</b>	40	42	3	2
<b>7c</b>	38	36	*	*

\*Desplazamiento del máximo no determinado por desdoblamiento de las bandas.

Las disales **6d**, **7b** y **7c** son las que producen un mayor hipocromismo en la banda a 318 nm. El relevante hipocromismo observado pone de manifiesto una fuerte interacción del compuesto con el ADN. Además, en todas las disales que muestran interacción con el ADN, excepto el compuesto **7c** en el que se produce un desdoblamiento de las bandas, se observa un ligero desplazamiento del máximo hacia longitudes de onda mayores, efecto que se conoce como efecto batocrómico. Por otra parte, se observa un punto isobéptico a 337 nm, lo cual indica un equilibrio entre dos especies en disolución, compuesto libre y compuesto-ADN.<sup>65, 66</sup> Estas características indican la existencia de una interacción disal-ADN y quizás una primera evidencia de una posible intercalación entre los pares de bases del ADN y las disales de triazoloquinolinio, aunque el modo de unión exacto no se puede proponer mediante estudios de UV-visible.<sup>70</sup>

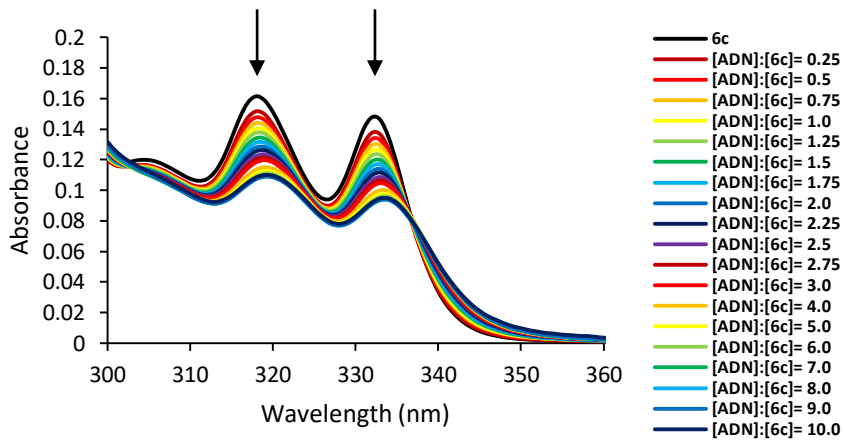


**Figura III.48:** Espectros UV del compuesto **6a** 20  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.

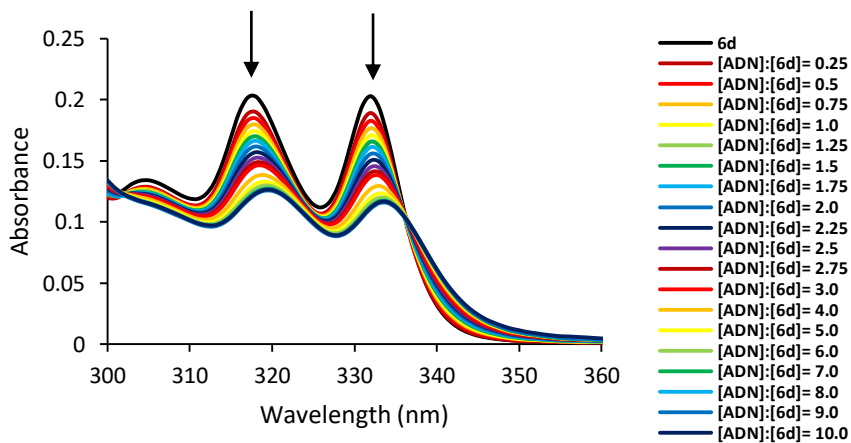


**Figura III.49:** Espectros UV del compuesto **6b** 20  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.

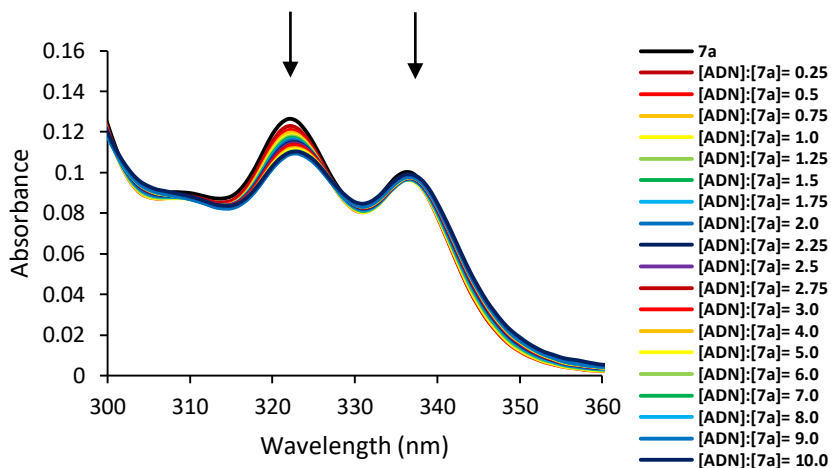




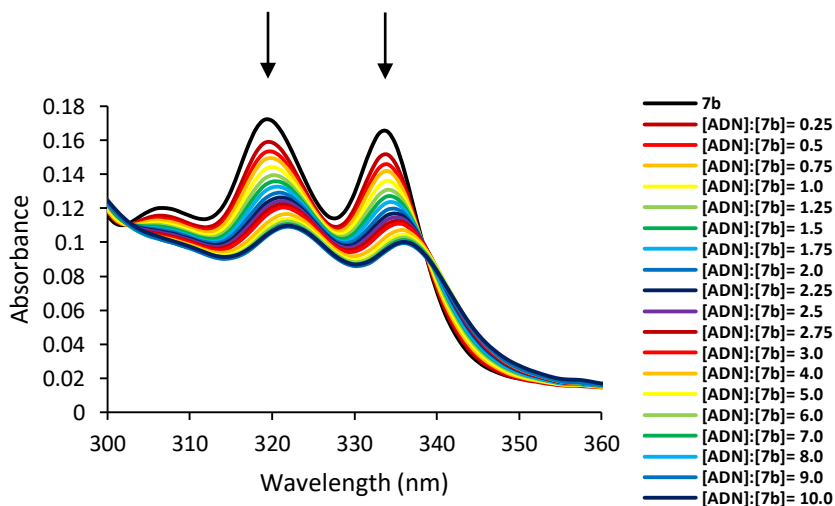
**Figura III.50:** Espectros UV del compuesto **6c** 20 μM en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200 μM. Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.



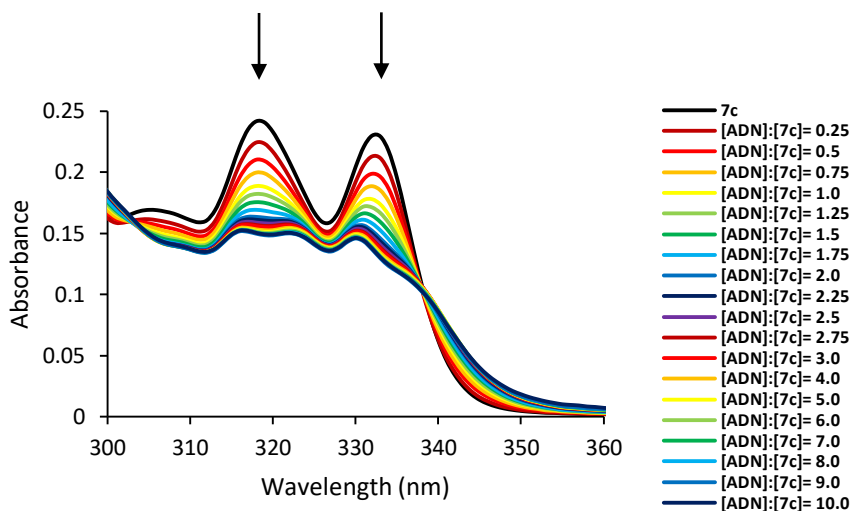
**Figura III.51:** Espectros UV del compuesto **6d** 20 μM en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200 μM. Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.



**Figura III.52:** Espectros UV del compuesto **7a** 20  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.



**Figura III.53:** Espectros UV del compuesto **7b** 20  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.



**Figura III.54:** Espectros UV del compuesto **7d** 20  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 1 mM (NaCl 2 mM), pH = 7.2, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CT-DNA de 5.0 a 200  $\mu\text{M}$ . Las flechas indican el efecto del CT-DNA en la absorbancia UV.

Los compuestos **6a** y **7a** no muestran cambios significativos en los máximos de absorción. Aunque podríamos pensar que estos compuestos no interactúan con el ADN, los estudios de desnaturalización térmica muestran una clara evidencia de la interacción de las disales **6a** y **7a**. Por ello, de acuerdo con los resultados de UV-visible, se propone una interacción débil para estos compuestos que no modifican significativamente las propiedades de los mismos.

Es interesante destacar que en el espectro UV del compuesto **7c** se produce un desdoblamiento de las bandas a concentraciones altas, que podría indicar que la interacción **7c**-ADN da lugar a un compuesto con unas propiedades ópticas claramente diferentes al compuesto de partida. Esto podría evidenciar la participación del anillo de fenilo en la interacción del ADN.

La constante de equilibrio intrínseca se obtuvo mediante la ecuación de Wolfe-Shimer,<sup>37</sup> monitorizando el cambio en la intensidad de absorción del espectro de la

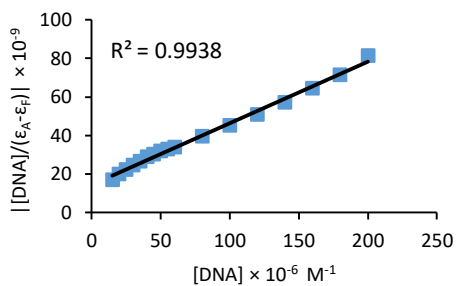
banda a 318 nm, con concentraciones crecientes de CT-DNA (Figura III.55 y Tabla III.11).

**Tabla III.11:** Tabla de constantes de unión para las disales que muestran cambios en su espectro de absorción UV

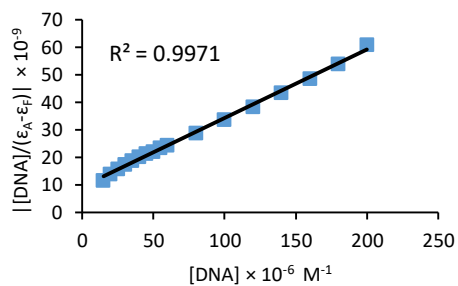
<b>Disal</b>	<b>Kb</b>
<b>6a</b>	N.D*
<b>6b</b>	$3.0 \times 10^4$
<b>6c</b>	$3.7 \times 10^4$
<b>6d</b>	$3.3 \times 10^4$
<b>7a</b>	N.D*
<b>7b</b>	$3.7 \times 10^4$
<b>7c</b>	$5.0 \times 10^4$

\*N.D: No Determinado

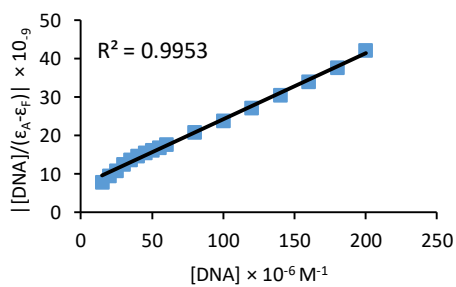
6b



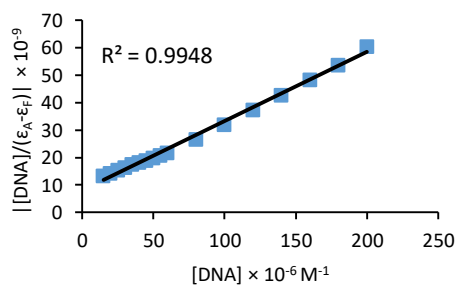
6c



6d



7b



7c

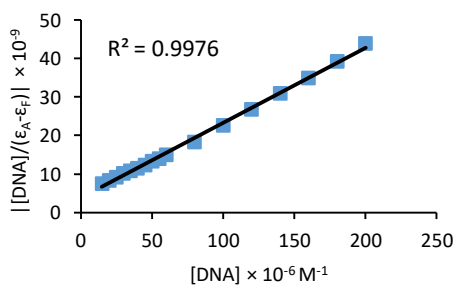


Figura III.55: Gráfica de Wolf-Shimer de las valoraciones UV de los compuestos **6b**, **6c**, **6d**, **7b** y **7c**.

Las constantes  $K_b$  calculadas para estos compuestos, son comparables entre sí y comprables a aquellas descritas en la literatura para moléculas orgánicas pequeñas con anillos de triazol en su estructura.<sup>62</sup> Huang y colaboradores<sup>82</sup> estudiaron la interacción de compuestos antracénicos con el ADN. El compuesto con dos subunidades de antraceno presentaba una constante de afinidad mayor que el compuesto con una sola subunidad antracénica, ya que se daban múltiples interacciones con el ADN y las dos subunidades de antraceno. En nuestro caso, contrariamente a lo que cabría esperar, las monosales, con una sola unidad de triazoloquinolina, a bajas concentraciones de ADN, en general, presentan una constante de afinidad mayor que las disales.

### **3.3. Estudios por fluorescencia**

Debido a que la fluorescencia de estos compuestos no se mantenía estable en el tiempo, no se pudo estudiar de forma directa su interacción con el ADN, por lo que se decidió utilizar un método indirecto, el desplazamiento de bromuro de etidio, para el estudio de la interacción de las disales con el ADN mediante esta técnica.

#### **3.3.1. Ensayo de desplazamiento de Bromuro de Etidio**

La emisión de fluorescencia del BE aumenta notablemente cuando se intercala entre las pares de bases del ADN. Una disminución de la emisión del sistema BE-ADN, en presencia del compuesto de estudio, puede ser debida a diversos factores.<sup>43,84</sup>

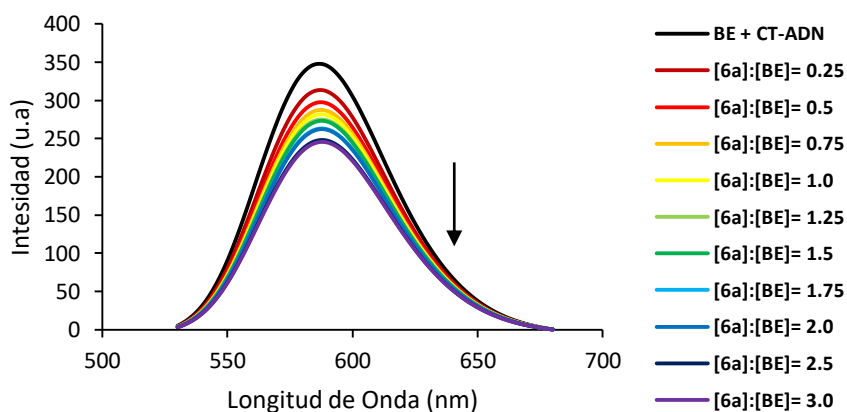
- i) Desplazamiento del BE del interior de la doble hélice por el compuesto.
- ii) La capacidad del compuesto de aceptar el electrón del estado excitado del BE a través de un mecanismo de transferencia electrónica.

- iii) Un cambio conformacional en el ADN producido por la interacción del compuesto, lo que permitiría que el BE quede expuesto al medio y por tanto un mayor acceso del  $O_2$  que desactivará el estado excitado del BE.

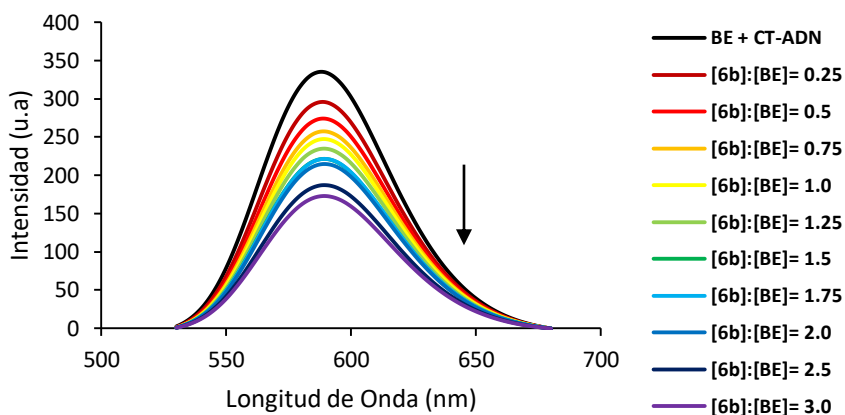
En este experimento se midió la intensidad de fluorescencia de varias disoluciones de BE-ADN (1:1) y diferentes concentraciones de las disales **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **7a**, **7b** y **7c**. El procedimiento experimental se describe detalladamente en el apartado III.6.5.

Los resultados que se presentan en las figuras III.56-62 muestran una importante disminución en la emisión del sistema BE-ADN, lo que indica claramente la desactivación del estado excitado del bromuro de etidio por interacción significativa de los compuestos. Podríamos sugerir debido a las características estructurales de los compuestos, la posibilidad de la interacción con el ADN mediante la intercalación.

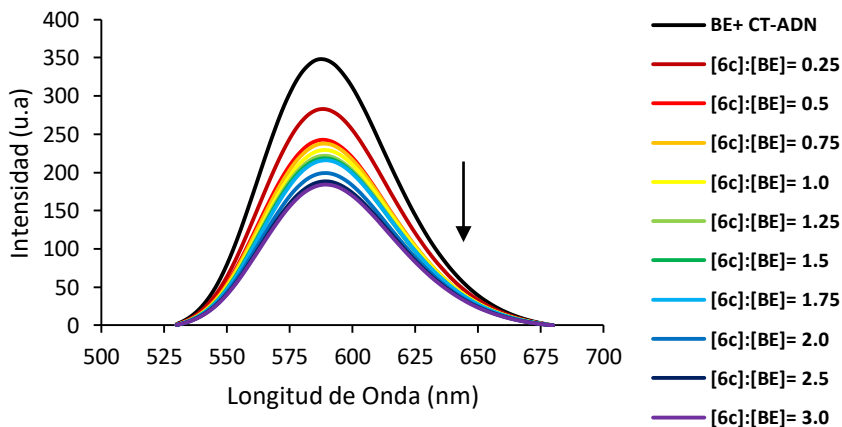
85,86



**Figura III.56:** Espectro de emisión de fluorescencia del [BE] y [CT-DNA] = 50  $\mu$ M en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM, pH = 7.2 en ausencia y presencia de cantidades crecientes de **6a** desde 12.5 a 150  $\mu$ M. Las flechas indican el efecto de **6a** en la intensidad de emisión.

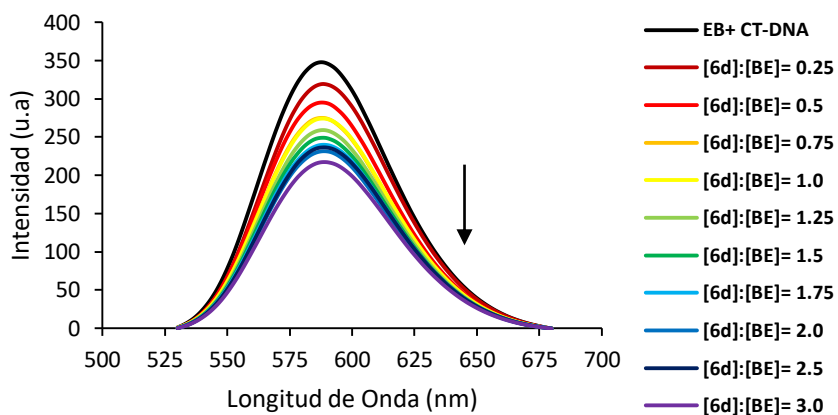


**Figura III.57:** Espectro de emisión de fluorescencia del [BE] y [CT-DNA] = 50  $\mu$ M en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM, pH = 7.2 en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [6b] desde 12.5 a 150  $\mu$ M. Las flechas indican el efecto de 6b en la intensidad de emisión.

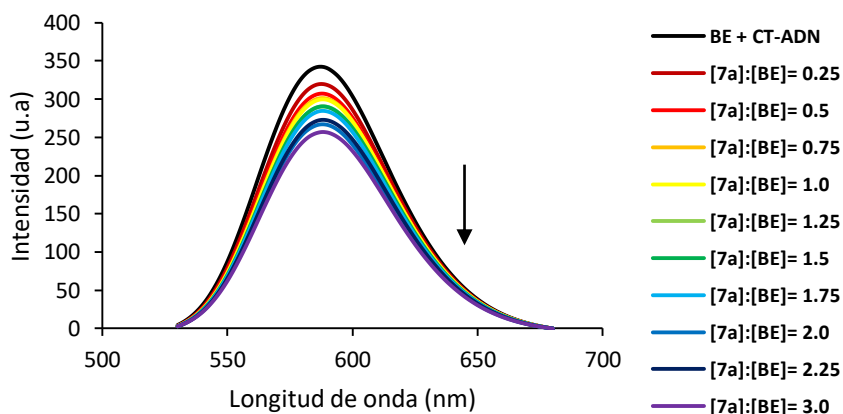


**Figura III.58:** Espectro de emisión de fluorescencia del [BE] y [CT-DNA] = 50  $\mu$ M en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM NaCl, pH = 7.2 en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [6c] desde 12.5 a 150  $\mu$ M. Las flechas indican el efecto de 6c en la intensidad de emisión.

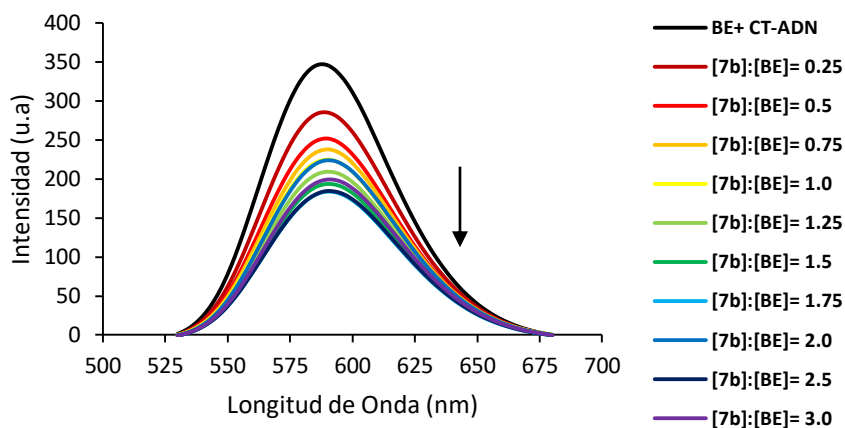




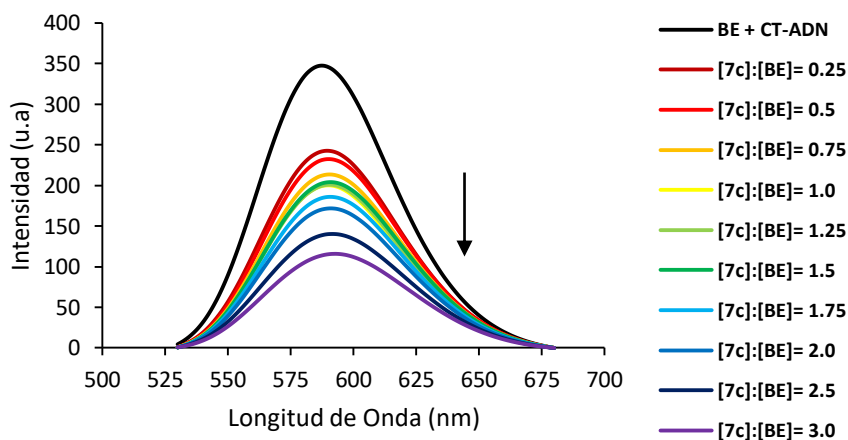
**Figura III.59:** Espectro de emisión de fluorescencia del [BE] y [CT-DNA] = 50  $\mu$ M en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM, pH = 7.2 en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [6d] desde 12.5 a 150  $\mu$ M. Las flechas indican el efecto de 6d en la intensidad de emisión.



**Figura III.60:** Espectro de emisión de fluorescencia del [BE] y [CT-DNA] = 50  $\mu$ M en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM, pH = 7.2 en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [7a] desde 12.5 a 150  $\mu$ M. Las flechas indican el efecto de 7a en la intensidad de emisión.



**Figura III.61:** Espectro de emisión de fluorescencia del [BE] y [CT-DNA] = 50  $\mu$ M en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM, pH = 7.2 en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [7b] desde 12.5 a 150  $\mu$ M. Las flechas indican el efecto de 7b en la intensidad de emisión.



**Figura III.62:** Espectro de emisión de fluorescencia del [BE] y [CT-DNA] = 50  $\mu$ M en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM, pH = 7.2 en ausencia y presencia de cantidades crecientes de [7c] desde 12.5 a 150  $\mu$ M. Las flechas indican el efecto de 7c en la intensidad de emisión.

La disminución de la intensidad de emisión puede ser una medida de la afinidad de los compuestos por el ADN. La magnitud de la unión del compuesto con el ADN se determinó cuantitativamente utilizando la ecuación de Stern-Volmer.

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q]$$

**Tabla III.12:** Tabla de constantes de Stern-Volmer para las disales

<b>Disal</b>	<b>K<sub>sv</sub></b>
<b>6a</b>	2.5 x 10 <sup>3</sup>
<b>6b</b>	5.7 x 10 <sup>3</sup>
<b>6c</b>	4.4 x 10 <sup>3</sup>
<b>6d</b>	4.2 x 10 <sup>3</sup>
<b>7a</b>	1.9 x 10 <sup>3</sup>
<b>7b</b>	7.7 x 10 <sup>3</sup>
<b>7c</b>	1.1 x 10 <sup>4</sup>

Como podemos observar en la tabla **III.12**, el compuesto con una mayor K<sub>sv</sub> es el **7c**, lo que indica que éste presenta una mayor interacción con el ADN.

Los resultados obtenidos muestran una concordancia con los estudios de UV-visible y desnaturalización térmica, ya que el compuesto que presenta un mayor hipocromismo (Tabla **III.13**) y una K<sub>sv</sub> mayor es el compuesto **7c**.

**Tabla III.13:** Hipocromismo experimentado con las disales **6** y **7**

Disal	Hipocromismo (%)
<b>6a</b>	36
<b>6b</b>	60
<b>6c</b>	58
<b>6d</b>	46
<b>7a</b>	30
<b>7b</b>	52
<b>7c</b>	80

Los resultados ponen de manifiesto la importancia de la naturaleza y longitud del *linker* en la interacción con el ADN. Los compuestos **7b** y **7c**, los cuales presentan una mayor afinidad, tienen en su estructura un anillo de benceno como *linker*. En líneas generales, en las disales con una cadena alifática disminuye la afinidad según aumenta el número de carbonos del *linker*, exceptuando los compuestos **6a** y **7a**. Esto podría ser debido a la rigidez de la estructura, la cual impediría una mayor aproximación al ADN y por lo tanto presentaría una menor interacción.

Si comparamos las disales **7** entre sí, la **7a** es la más rígida y la que presenta menor afinidad por el ADN. La disal **7c** con una mayor flexibilidad y es la más afín. Estos resultados respaldan nuestra teoría de que la rigidez del compuesto es importante para su interacción con el ADN.

Además, la adición de **7b** y **7c** produce un desplazamiento del máximo de emisión del sistema ADN-BE, hecho que apoya una mayor interacción de estos dos compuestos frente al resto de las disales estudiadas.

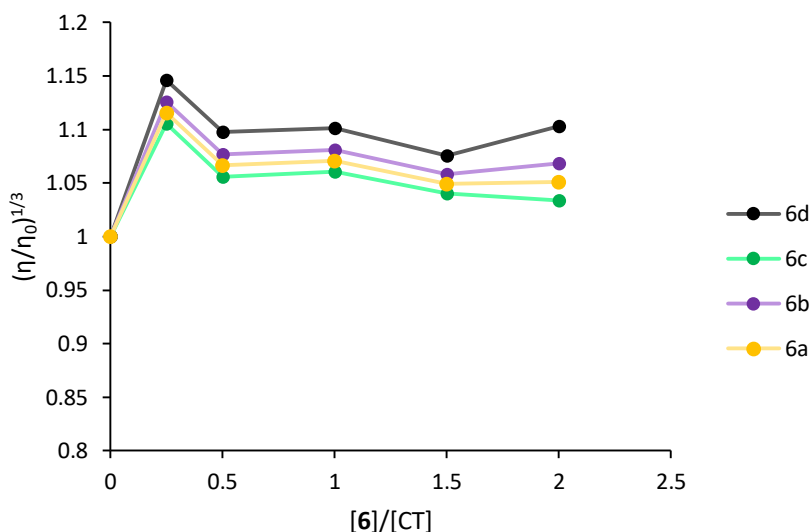
Podemos deducir, por tanto, que las características estructurales del *linker* determinan, en cierta medida, la afinidad de nuestros compuestos por el ADN. Resultados similares han sido publicados para compuestos análogos.<sup>87</sup>

### 3. 4. Estudios mediante viscosimetría

Como ya se ha indicado, las pruebas fotofísicas proporcionan información necesaria pero no suficiente para determinar un modo de interacción. Con el objetivo de obtener mayor evidencia del tipo de interacción entre las disales de triazoloquinolinio y el ADN se llevaron a cabo medidas de viscosimetría. En estos estudios se midió la viscosidad del ADN en disolución ( $\eta_0$ ) y de diferentes disoluciones de ADN/Compuesto a diferentes concentraciones ( $\eta$ ). Los datos se obtienen mediante la medida del tiempo de elución de estas disoluciones utilizando un viscosímetro. La viscosidad relativa elevada a un tercio ( $\eta/\eta_0$ )<sup>1/3</sup> se representa frente a la relación [compuesto]/[ADN]. La tendencia que presenta la viscosidad nos sirve para distinguir el modo de interacción. Las condiciones experimentales se describen en el apartado **III.5.6**.

Los resultados se muestran a continuación, en las figuras **III.63** y **III.64**. Las condiciones experimentales se describen de manera detallada en el apartado III.5.

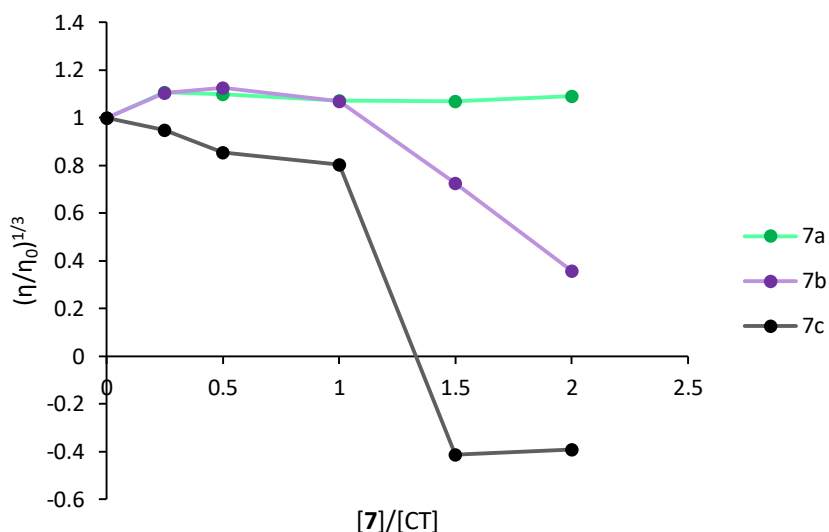
Los resultados muestran que los compuestos **6a-d** no provocan cambios significativos en la viscosidad del ADN (Figura **III.63**).



**Figura III.63:** Gráfica de viscosimetría de los compuestos **6** con ADN.

A la vista de estos resultados podríamos decir que estos compuestos interactúan a través de los surcos y/o los grupos fosfato del ADN. Aunque no se puede descartar que se dé una intercalación dado que a bajas concentraciones del compuesto tiene lugar un aumento de la viscosidad.

El compuesto **7a** presenta el mismo patrón de viscosidad que se observa para los compuestos **6**. Sin embargo, para los compuestos **7b** y **7c** la tendencia que se observa es significativamente diferente, ya que estos dos compuestos disminuyen la viscosidad del ADN a altas concentraciones. A partir de una relación [ADN]:[Compuesto] 0.5, se observan cambios relevantes en la viscosidad del ADN. En el caso del compuesto **7c** la disminución de la viscosidad ocurre desde la primera adición (Figura III.64).



**Figura III.64:** Gráfica de viscosimetría de los compuestos **7** con ADN.

Como ya se ha mencionado en el apartado 1.3.4, existen compuestos que disminuyen la viscosidad del ADN.<sup>50</sup> La disminución de la viscosidad del ADN en disolución puede deberse a torsiones o flexiones provocadas por el compuesto en la doble hélice del ADN.<sup>88</sup> Estos compuestos presentan un modo de interacción diferente a la intercalación. Para los compuestos **7b** y **7c** a partir de relación [ADN]:[Compuesto] = 1, se podría proponer una interacción no intercalativa que promueve torsiones y flexiones en la doble hélice del ADN, además de la interacción a través de los grupos fosfato y los surcos.

#### 4. CONCLUSIONES

1. Los ensayos de desnaturalización térmica, UV-Visible, fluorescencia y viscosimetría indican que las monosales y las disales de triazoloquinolinio interaccionan fuertemente con el ADN.
2. Estas sales provocan un desplazamiento de la temperatura de fusión del ADN, que es moderado en el caso de las monosales y muy elevado en el caso de las disales. Este resultado pone de manifiesto que el desplazamiento de la temperatura de fusión del ADN se da, principalmente, por una interacción electrostática.
3. Los ensayos de desnaturalización térmica utilizando poly(dG-dC)<sub>2</sub> han puesto de manifiesto que las monosales presentan cierta preferencia por secuencias ricas en guanina-citosina. Mientras que las disales muestran preferencia por regiones ricas en adenina-timina.
4. El estudio de la interacción de las monosales con el ADN mediante espectroscopía UV-Visible, indican que esta interacción ocurre en dos procesos. La  $K_b$  calculada ( $k_{b1}$  y  $k_{b2}$ ) para cada uno de estos procesos pone de manifiesto que las monosales más afines son las **4d**, **4e**, **5c** y **5d**.
5. Las constantes de *binding* ( $K_b$ ) para los compuestos **6b**, **6c**, **6d**, **7b** y **7c**, son similares entre sí, e inferiores a la  $K_{b1}$ , que corresponde al primer proceso, de las monosales. Los compuestos **6a** y **7a** no inducen ningún cambio significativo que permita el cálculo de una constante de unión. Para estos compuestos suponemos una interacción débil con el ADN.
6. A partir de los datos de fluorescencia, en el caso de las monosales, se calculan las constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) como medida de la afinidad de los



compuestos por el ADN. Los valores de las constantes obtenidas están, en general, en concordancia con los datos obtenidos de las valoraciones UV-visible.

7. Los estudios de desplazamiento de bromuro de etidio en presencia de ADN, estudiado para las disales, indican una interacción significativa de las disales, que, proponemos, podría ser mediante intercalación. De las disales ensayadas, teniendo en cuenta la  $K_{sv}$ , el compuesto que presenta una mayor afinidad por el ADN, es el **7c**.
8. Las monosales, a excepción de **4d**, tienen la capacidad de aumentar ligeramente la viscosidad del ADN, lo que indica que interaccionan mediante intercalación parcial.
9. Se ha observado que, en el caso de las disales, **7a** tiene un comportamiento similar a las monosales. Los compuestos **7b** y **7c** disminuyen la viscosidad del ADN de manera significativa a partir de una relación [ADN]:[compuesto] = 1. Este hecho sugiere que la interacción de estos compuestos provoca torsiones y flexiones en la doble hélice del ADN.
10. El conjunto de todos estos estudios nos permite establecer una relación estructura-afinidad por el ADN. Ya que, en el caso de las monosales, generalmente, aquellas que tienen una mayor longitud de la cadena carbonada, presentan más afinidad, al igual que las disales **6**. En el caso de las disales **7**, podemos decir que la afinidad viene determinada por la flexibilidad del compuesto, siendo el **7c** el que presenta una mayor afinidad por el ADN.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON EL ADN

### 5. 1. Preparación de las disoluciones de ADN

Las disoluciones *stock* de CT-DNA (Tipo XV, Sigma-Aldrich) y poly(dG-dC)<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) se prepararon en agua destilada, mientras que la disolución *stock* de poli(dA-dT)<sub>2</sub> se preparó en tampón cacodilato 0.1M, (pH=6.0) y 10 mM NaCl.

La concentración de ADN en moles de nucleótidos por litro se determinó mediante absorbancia UV a 260 nm para el CT-DNA y 262 nm para poly(dA-dT)<sub>2</sub> después de hacer una dilución 1:20 utilizando los coeficientes de extinción molar de cada polinucleótido:  $\epsilon_{\text{CT-DNA}} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{\text{poly(dA-dT)}_2} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 5. 2. Temperatura de fusión

Los experimentos de fusión del ADN se llevaron a cabo mediante la monitorización del espectro de absorbancia entre 1000-200 nm de CT-DNA (100  $\mu\text{M}$ ) a diferentes temperaturas en ausencia y presencia de los compuestos a diferentes relaciones [ADN]-[compuesto].

Las medidas se llevaron a cabo con un espectrofotómetro UV-Visible Agilent 8453 equipado con un Peltier controlador de la temperatura de célula simple (Agilent 89090A).

Los experimentos fueron realizados en tampón fosfato pH = 7.2 (1 mM fosfato, 2 y 5 mM NaCl). Las muestras se agitaron continuamente y calentadas con un incremento de temperatura de 1 °C/min. El intervalo de temperatura estudiado fue de 25 a 90 °C. El punto de fusión se obtuvo con la primera derivada usando el algoritmo Savitzky-Golay.<sup>89</sup>

### **5. 3. Valoraciones de absorción electrónica**

El espectro UV-Visible de las muestras fueron registrados a 25 °C en un espectrofotómetro de UV-Visible Agilent 8453 equipado con un Peltier controlador de la temperatura de célula simple (Agilent 89090A).

Las valoraciones de absorción electrónica se realizaron mediante la adición de ADN a una solución del compuesto a una concentración fija. Las muestras se prepararon en tampón fosfato pH = 7.2 (fosfato 1 mM, NaCl 2 mM).

Los espectros se registraban cada 10 minutos tras cada adición de ADN para permitir así que la mezcla se equilibrara. Para corregir la absorbancia del ADN, se registró el espectro UV del CT-DNA en ausencia de compuesto bajo las mismas condiciones, y éste se restó al espectro de compuesto + ADN.

### **5. 4. Valoraciones de fluorescencia**

Los espectros de fluorescencia se registraron en un espectrofluorímetro JASCO FP-6200 a temperatura ambiente.

Las valoraciones de fluorescencia se realizaron mediante la adición de cantidades crecientes de CT-DNA a una disolución del compuesto ensayado a una concentración fija. Las muestras con un volumen final de 3 mL se prepararon en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM (pH = 7.2).

### **5. 5. Ensayo de desplazamiento de bromuro de etidio**

Los espectros de fluorescencia se registraron con un espectrofluorímetro JASCO FP-6200 a temperatura ambiente.

Estos experimentos implican la adición de los compuestos en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM (pH = 7.2) (rango de concentración final entre 25-250  $\mu$ M) a muestras

con CT-DNA 50  $\mu\text{M}$  y Bromuro de Etidio 50  $\mu\text{M}$ . Para cada una de las muestras, el BE y CT-DNA se mezclaron primeramente y se dejaron equilibrar durante 30 minutos. Trascurrido este tiempo se añadió a la solución el compuesto de estudio y las soluciones resultantes se dejaron equilibrar durante 15 minutos antes de registrar el espectro de fluorescencia. Todas las muestras fueron excitadas a 500 nm y la recogida de emisión fue entre 530 y 680 nm.

## 5. 6. Medidas de viscosidad

Los experimentos de viscosidad se llevaron a cabo con un viscosímetro inmerso Ubbelodhe en un baño con termostato Julabo ME16G mantenido a  $25.0 \pm 0.1$  °C.

Las muestras, de 4 mL, contenían el compuesto de ensayo (con una concentración final que van de 0.25-2.0  $\mu\text{M}$ ) y CT-DNA (100  $\mu\text{M}$ ) en tampón fosfato pH = 7.2 (1 mM fosfato, 2 mM NaCl). Los tiempos de flujo se midieron por triplicado con un cronómetro. Los datos se representaron como  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  vs. la relación de la concentración del compuesto y el ADN, donde  $\eta$  es la viscosidad de ADN en presencia del compuesto y  $\eta_0$  es la viscosidad del ADN en ausencia de compuesto. Los valores de viscosidad se calcularon a partir del tiempo de flujo de la solución de DNA corregido mediante el tiempo de flujo de tampón ( $t_0$ ),  $\eta = t - t_0$ .

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. B. Lewin, *in Genes VII*, Ed. Marbán, **2001**
2. F. Crick, *Simp. Soc. Exp. Biol. XII* **1958**, 139
3. F. Crick, *Nature* **1970**, 227, 561
4. F. Miescher, *Med. Chem. Unters.* **1871**, 4, 441
5. O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137
6. a) J. D. Watson, F. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737. b) J. D. Watson, *La Doble Hélice*, Ed. Atheneum, 1980
7. J. Luque, Á. Herráez, *Biología Molecular e ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud.*, Elsevier Science, Madrid, **2002**, pp. 32
8. M. J. Hannon, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 280
9. L. Strekowski, B. Wilson, *Mutat. Res.* **2007**, 623, 3
10. K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, *Drug-DNA Interactions: Structure and Spectra*, Wiley, New York, **2008**
11. A. Lorente, M. J. Fernández, *An. Quím.* **2008**, 104, 280
12. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2013**, 124, 1
13. P. G. Baraldi, A. Bovero, F. Fruttarolo, D. Preti, M. A. Tabrizi, M. G. Pavani, R. Romagnoli, *Med. Res. Rev.* **2004**, 24, 475
14. T. A. Larsen, D. S. Goodsell, K. Cascio, K. Grzeskowiak, R. E. Dickerson, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, 7, 477
15. M. Elrod-Erickson, T. E. Benson, C. O. Pabo, *Structure* **1998**, 6, 451
16. I. Radhakrishnan, D. J. Patel, *Structure* **1994**, 2, 17
17. I. Radhakrishnan, D. J. Patel, *Structure* **1993**, 1, 135
18. B. Nordén, F. Tjernelid, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, 50, 508
19. B. Nordén, F. Tjernelid, E. Palm, *Biophys. Chem.* **1978**, 8, 1
20. S. K. Kim, B. Nordén, *FEBS Lett.* **1993**, 315, 61

21. P. L. Hamilton, D. P. Arya, *Nat. prod. Rep.* **2012**, *29*, 134
22. L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18
23. D. M. Chothers, *Biopolymers* **1968**, *6*, 575
24. K. W. Jennette, S. J. Lippard, G. A. Vassiliades, W. R. Bauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1974**, *71*, 3839
25. M. Howe-Grant, K. C. Wu, W. R. Bauer, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1976**, *15*, 4339
26. M. Howe-Grant, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1979**, *18*, 5762
27. K. E. Erkkila, D. T. Odom, J. K. Barton, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2777
28. C. L. Kielkopf, K. E. Erkkila, B. P. Hudson, J. K. Barton, D. C. Rees, *Nat. Struc. Mol. Biol.* **2000**, *7*, 117
29. F. A. Tanious, S. F. Yen, W. D. Wilson, *Biochemistry* **1991**, *30*, 1813
30. A. Harris, Y. Qu, N. Farrell, *Inor. Chem.* **2005**, *44*, 1196
31. S. Komeda, T. Moulaei, K. K. Woods, M. Chikuma, N. P. Farrell, L. D. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16092
32. J. Reedijk, *Chem. Commun.* **1996**, 801
33. U. M. Ohndorf, M. A. Rould, Q. He, C. O. Pabo, S. J. Lippard, *Nature* **1999**, *399*, 708
34. A. Delgado Cirilo, C. Minguillón Llombart, J. Joglar Tamargo, *Introducción a la Química Terapéutica*, Ed. Díaz de Santos, Madrid, **2004**, pp. 483
35. G. Lenglet, M. H. David-Cordonnier, *Journal of Nucleic Acids* **2010**, *2010*, 1
36. K. R. Fox, *Drug-DNA interaction protocols, Vol. 90*, Humana Press Inc, New Jersey, **1977**, pp. 195
37. A. Wolfe, G. H. Shimer, T. Meehan, *Biochemistry*, **1987**, *26*, 6392
38. H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703
39. D. E. V. Schmechel, D. M. Crothers, *Biopolymers* **1971**, *10*, 465
40. J. B. Lepecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87

41. A. R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, D. H. Evans, *Nucleic Acids Res.*, **1979**, *7*, 547
42. J. R. Lakowicz, G. Weber, *Biochemistry* **1973**, *12*, 4161
43. B. Selvakumar, V. Rajendiran, P. Uma Maheswari, H. Stoeckli-Evans, M. Palaniandavar, *J. Inor. Biochem.* **2006**, *100*, 316
44. O. Stern, M. Z. Volmer, *Phys.* **1919**, *20*, 183
45. X. Sheng, X. Guo, X-M. Lu, G-Y. Lu, Y. Shao, F. Liu, Q. Xu, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 490
46. K. R. Fox, *Drug-DNA interaction protocols, Vol. 90*, Humana Press Inc, New Jersey, **1997**, pp. 219
47. S. Satyanarayana, J. C. Dabrowiak, J. B. Chaires, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9319
48. D. Suh, Y. K. Oh, J. B. Chaires, *Process Biochem.* **2001**, *37*, 521
49. S. Mahadevan, M. Palaniandavar, *Inor. Chem.* **1998**, *37*, 3927
50. J. Liu, H. Zhang, C. Chen, H. Deng, T. Lu, L. Ji, *Dalton Trans.* **2003**, 114
51. T. Aravinda, N. H. S. Bhojya, N. H. R. Prakash, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **2009**, *15*, 273
52. S-F. Cui, Y. Ren, S-L. Zhang, X-M. Peng, G. L. V. Damu, R-X. Geng, C-H. Zhou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 3267
53. X. Li, Y. Lin, Q. Wang, Y. Yuan, H. Zhang, X. Qian, *Eur. J. med. Chem.*, **2011**, *46*, 1274
54. K. Lemke, M. Wojciechowski, W. Laine, H. Bailly, P. Colson, M. Baginski, A. K. Larsen, A. Skladanowski, *Nucleic Acids Res.*, **2005**, *33*, 6034
55. E. Zabost, A. M. Nowicka, Z. Mazerska, Z. Stojek, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2012**, *14*, 3408
56. I. Steiner, N. Stojanovic, A. Bolje, A. Brozovic, D. Polancec, A. Ambriovic-Ristov, M. Radic-Stojkovic, I. Piantadina, D. Eljuga, J. Kosmrlj, M. Osmak, *Radiol. Oncol.*, **2016**, *50*, 280

57. W. M. Cholody, S. Martelli, J. Konopa, *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 2852
58. J. Węsierska-Gądek, N. Zulehner, F. Ferk, A. Składanowski, O. Komina, M. Maurer, *Biochem. Pharmacol.*, **2012**, *84*, 1318
59. K. Lemke, V. Poindessous, A. Składanowski, A. K. Larsen, *Mol. Pharmacol.*, **2004**, *66*, 1035
60. M. Lapier, M. C. Zúñiga-López, B. Aguilera-Venegas, R. Adam, B. Abarca, R. Ballesteros, R. López-Muñoz, J. D. Maya, C. Olea-Azar, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2017**, *17*, 399
61. A. Martín-Montes, R. Ballesteros-Garrido, R. Martín-Escolano, C. Marín, R. Gutiérrez-Sánchez, B. Abarca, R. Ballesteros, M. Sánchez-Moreno, *RSC Adv.*, **2017**, *7*, 15715
62. R. Adam, P. Bilbao-Ramos, B. Abarca, R. Ballesteros, M. E. González-Rosende, M. A. Dea-Ayuela, F. Estevan, G. Alzuet-Piña., *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 4903
63. B. Zayas, J. Reyley, M. Terron, M. Cordero, W. Hernández, A. E. Alegría, O. Cox, *Toxicology in Vitro*, **2007**, *21*, 1155
64. P. J. Llabres-Campaner, L. Guijarro, C. Giarratano, R. Ballesteros-Garrido, R. J. Zaragoza, M. J. Aurell, E. García-España, R. Ballesteros, B. Abarca, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 12825
65. A. Mazzoli, B. Carlotti, G. Consiglio, C. G. Fortuna, G. Miolo, A. Spalletti, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2014**, *13*, 939
66. A. Mazzoli, B. Carlotti, C- G. Fortuna, A. Spalletti, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, *10*, 973
67. S. J. Lippard, *Science*, **1976**, *194*, 726
68. I. Bertini, H. B. Gray, S. J. Lippard, J. S. Valentine., *Bioinorganic Chemistry Ed. University Science Books*, **1994**.



69. B. Wilson, M. J. Fernández, A. Lorente, K. B. Grant, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 4026
70. P. Živec, F. Perdih, I. Turel, G. Giester, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, *117*, 35
71. D. S. Raja, N. S. P. Bhuvanesh, K. Natarajan, *Inorg. Chem.*, **2011**, *50*, 12852
72. A. Ghosh, P. Das, M. R. Gill, P. Kar, M. G. Walker, J. A. Thomas, A. Das, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 2089
73. a) C. Hiort, P. Lincoln, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 3448. b) F. M. O'Reilly, J. M. Kelly, *New. J. Chem.*, **1998**, *22*, 215. c) C. Moucheron, A. Kirsch-DeMesmaeker, *J. Phys. Org. Chem.*, **1998**, *11*, 577. d) I. Ortman, B. Elias, J. M. Kelly, C. Moucheron, A. Kirsch-DeMesmaeker, *Dalton's Trans*, **2004**, *4*, 668
74. A. Mazzoli, B. Carlotti, C. Bonaccorso, C. G. Fortuna, U. Mazzucato, G. Miolo, A. Spalletti, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, *10*, 1830
75. I. Ortman, B. Elias, J. M. Kelly, C. Moucheron, A. Kirsch-DeMesmaeker, *Dalton's Trans.*, **2004**, *4*, 668
76. G. J. Ryan, R. B. P. Elmes, S. J. Quinn, T. Gunnlaugsson, *Supramol. Chem. Lett.*, **2012**, *24*, 175
77. S. Campagna, M. Cavazzini, M. Cusumano, M. L. Di Pietro, A. Giannetto, F. Puntoriero, S. Quici, *Inorg. Chem.*, **2011**, *50*, 10667
78. F. Liu, K. Wang, G. Bai, Y. Zhang, L. Gao, *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 1799
79. T. Phillips, I. Haq, A. J. H. M. Meijer, H. Adams, I. Soutar, L. Swanson, M. J. Sykes, J. A. Thomas, *Biochemistry*, **2004**, *43*, 13657
80. P. J. Bindu, K. M. Mahadevan, T. R. R. Naik, B. G. Harish, *Med. Chem. Commun.*, **2014**, *5*, 1708
81. S. Murphy, S. A. Bright, F. E. Poyton, T. McCabe, J. A. Kitchen, E. B. Veale, D. C. Williams, T. Gunnlaugsson, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 6610

82. Y. Huang, Y. Zhang, J. Zhang, D-W. Zhang, Q-S. Lu, J-L. Liu, S-Y. Chen, H-H. Lin, X-Q. Yu, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 2278
83. G. A. Neyhart, N. Grovers, S. R. Smith, W. A. Kalsbeck, T. A. Fairley, M. Cory, H. H. Thorp, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 4423
84. L. Lakovicz, G. Weber, *Biochemistry*, **1973**, *12*, 4161
85. F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, *105*, 476
86. F. Dimiza, S. Fountoulaki, A. N. Papadopoulus, C. A. Kontogiorgis, V. Tangouls, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, A. Terzis, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, *Dalton Trans.*, **2011**, *40*, 8555
87. Z. Bánóczy, Á. Tantos, A. Farkos, P. Tompa, P. Friedrich, F. Hudecz, *Bioconjugate Chem.*, **2007**, *18*, 121
88. G. Yang, J. Z. Wu, L. Wang, L. N. Ji, X. Tian, *J. inorg. Biochem.*, **1997**, *66*, 141
89. W. H. Press, W. T. Vetterling, S. T. Teukolsky, B. P. Flannery, *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*, **1992**, pp. 650–655. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

## **CAPÍTULO IV**

### **ESTUDIOS DE FOTO-RUPTURA DEL ADN CON MONOSALES Y**

### **DISALES DE TRIAZOLOQUINOLINIO**



## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1 Agentes de escisión del ADN

Las nucleasas son enzimas que catalizan la escisión del ADN mediante la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster del mismo. El mecanismo de hidrólisis del ADN más aceptado implica un ataque nucleofílico de un oxígeno de una molécula de agua al fósforo para dar lugar a un intermediario de fosfato coordinado con cinco átomos. La escisión subsecuente del enlace P-O<sup>3'</sup> o P-O<sup>5'</sup> (más frecuentemente P-O<sup>3'</sup>) provoca la escisión de la hebra, dando lugar a las terminaciones R-OH y R-O-PO<sub>3</sub>.<sup>1</sup>

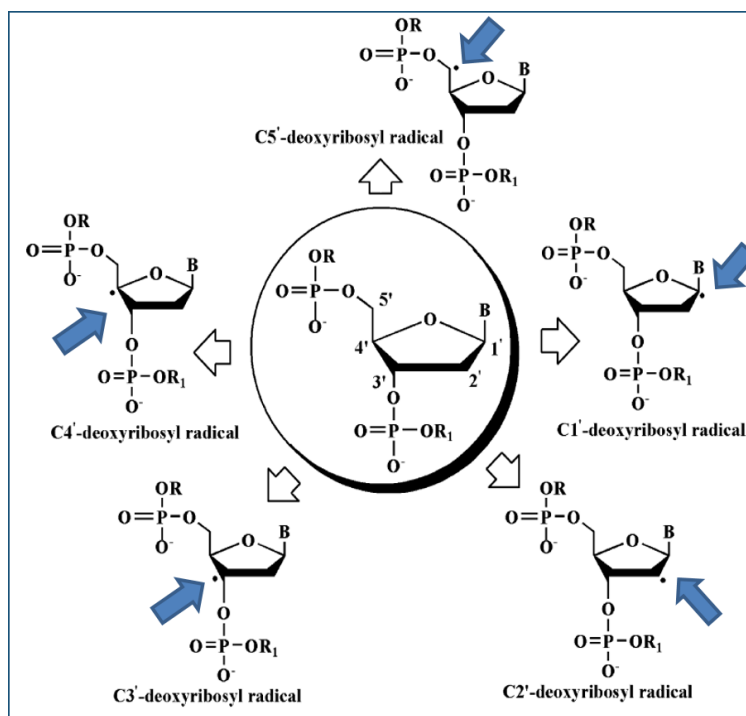
Las enzimas con actividad nucleasa tienen un papel importante en las células, ya que están involucrados en los procesos de reparación del ADN. Estas enzimas son de gran importancia en la ingeniería genética para la recombinación del ADN. Esta aplicación ha estimulado la investigación de agentes sintéticos efectivos como herramientas para manipular el ADN. Una molécula con capacidad para provocar la escisión del ADN podría ser un antibiótico o un compuesto quimioterapéutico.<sup>1,2</sup>

Debido a todas estas aplicaciones, se han hecho grandes esfuerzos para la obtención de agentes de escisión del ADN de forma sintética. Estas moléculas pueden provocar la escisión mediante dos mecanismos:

- Escisión hidrolítica: Es el mecanismo por el cual actúan las nucleasas naturales. Normalmente, los agentes químicos que producen este tipo de escisión son complejos metálicos de lantánidos o de metales de transición (Co, Zn, Fe) con estructura mono- o dinuclear.<sup>1, 3-8</sup>
- Escisión oxidativa: En este tipo de mecanismo, el daño se produce en las nucleobases o azúcares del ADN. Se han descrito numerosos ejemplos de

complejos de metales de transición y moléculas orgánicas capaces de actuar mediante este mecanismo.<sup>2, 8-10</sup>

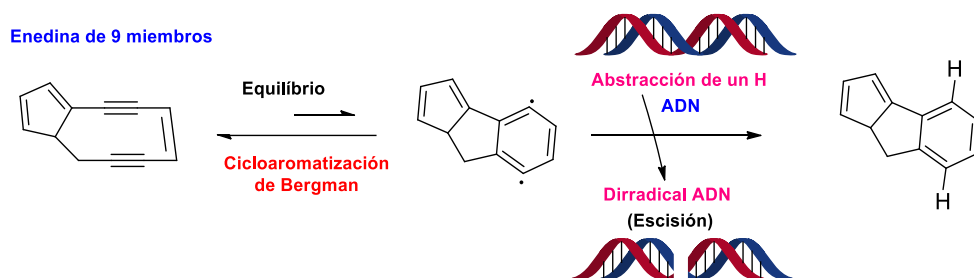
En la escisión oxidativa, la ruptura de la hebra ocurre, normalmente, mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de la desoxirribosa, produciendo así un radical desoxirribosilo que provoca la ruptura de la hebra del ácido nucleico (Figura IV.2).



**Figura IV.1:** Radicales desoxirribosilo producidos por la eliminación de hidrógeno (Imagen obtenida de *Coord. Chem. Rev.*, **2007**, 251, 1951).

La extracción del hidrógeno de la desoxirribosa puede llevarse a cabo mediante complejos metálicos como por ejemplo *bis*(1,10-fenantrolina)cobre(I)<sup>11</sup> o complejos

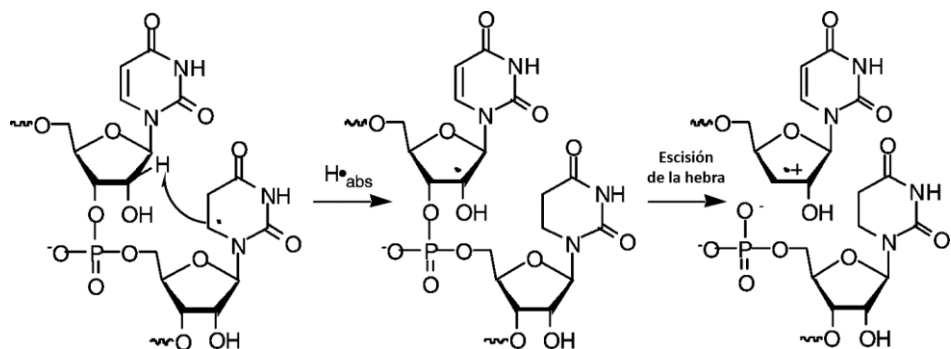
de rodio(III),<sup>12</sup> especies reactivas de oxígeno y moléculas orgánicas, como compuestos derivados de enedina,<sup>13</sup> los cuales forman radicales intermedios (Figura IV.2).



**Figura IV.2:** Mecanismo de acción propuesto para antibióticos Enedina. La rotura del ADN se inicia por la extracción de hidrógeno en C4' o C5' (Imagen modificada de <https://nptel.ac.in/courses/104103068/module1/lec4/1.html>)

La eliminación de un hidrógeno específico en la desoxirribosa depende de la fuerza del enlace C-H y de la accesibilidad del agente oxidante. En general, la preferencia de la extracción del hidrógeno sigue el orden  $C5' > C4' > C2' \sim C3' > C1'$ . Los átomos de hidrógeno en C1', C4' y C5' son accesibles en el surco de la forma B-ADN, mientras que C2' y C3' son más accesibles desde el surco mayor. Por tanto, el sitio de interacción del oxidante determinará el hidrógeno que es eliminado.<sup>2, 10</sup>

Las nucleobases, purinas y pirimidínicas, ricas en electrones, son dianas principales para reacciones con electrófilos: ROS, complejos de metales de transición, halógenos o agentes alquilantes. Cuando la oxidación tiene lugar en las nucleobases raramente se produce una ruptura directa, la ruptura del ADN requiere calor, la adición de una base o tratamiento enzimático para acabar dando lugar a una deglicosilación y  $\beta$ -eliminación del 3'-fosfato (Figura IV.3).<sup>9,10</sup>



**Figura IV.3:** Escisión del ADN mediante el daño de nucleobases seguido por un tratamiento secundario.

Dadas las diferentes propiedades electroquímicas de las cuatro nucleobases, este tipo de escisión del ADN es más específico que la escisión oxidativa producida por la oxidación del azúcar. La guanina es la base más comúnmente modificada, sin embargo, las reacciones específicas del sitio también se pueden dar en timina y citosina.<sup>9,10</sup>

Entre los diferentes tipos de ruptura del ADN, la escisión oxidativa mediante irradiación ha ganado importancia en la fotoquimioterapia o terapia fotodinámica (PDT) del cáncer. Moléculas con actividad fononucleasa han demostrado ser de utilidad para este tipo de terapia.<sup>14</sup> La fotoquimioterapia es una terapia no invasiva utilizada en el tratamiento del cáncer, degeneración macular relacionada con la edad y psoriasis, entre otras enfermedades. Esta terapia consiste en que una fuente de luz es utilizada para activar un agente fotosensibilizador (FS) el cual, destruye selectivamente tejido dañado. El compuesto fotosensibilizador es administrado al paciente horas o días antes del procedimiento, así las células absorberán el compuesto, pero será retenido preferentemente, por las células tumorales. Debido a ello, el compuesto no debe ser citotóxico hasta ser activado mediante luz. Durante



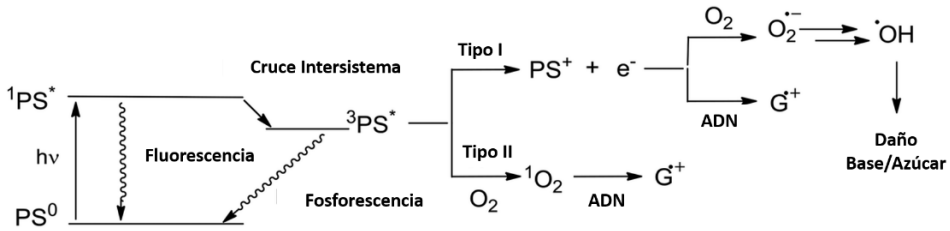
el procedimiento, el tejido dañado es irradiado a una longitud de onda específica a la cual absorbe el compuesto. El compuesto causará daño al ADN y a otros componentes celulares en la zona irradiada, dejando intactas las células sanas.<sup>15-18</sup>

Debido a todas las posibilidades que ofrece la terapia fotodinámica, se han realizado estudios más exhaustivos en el desarrollo de agentes capaces de producir la ruptura del ADN tras ser irradiados con luz (*photocleavage agents*). Éstos, son compuestos cuyos estados excitados pueden iniciar una serie de reacciones químicas, las cuales darán lugar a la ruptura del ADN. La fotoescisión de ácidos nucleicos implica una reacción oxidativa inicial con una nucleobase o un resto azucarado. Esta reacción se desencadena mediante intermedios reactivos (ROS, carbenos y carbocationes) formados a partir del agente fotoexcitado. En el caso de especies reactivas difusibles, como los radicales hidroxilo, una fotonucleasa no necesita interaccionar con el ácido nucleico para inducir la escisión.<sup>19-21</sup>

En el mecanismo propuesto para la formación de intermedios reactivos, el fotosensibilizador, inicialmente en estado fundamental ( $PS^0$ ), es irradiado a la longitud de onda adecuada y pasa a un estado excitado singlete ( $^1PS^*$ ) el cual se puede convertir en un estado triplete ( $^3PS^*$ ). El papel principal del estado singlete en el proceso de fotosensibilización es actuar como precursor del estado triplete. Este estado triplete es el estado fotoactivo, el cual puede generar especies citotóxicas mediante dos mecanismos (Figura IV.4):<sup>9, 16, 17-20</sup>

- *Mecanismo tipo I*: En este tipo de reacciones existe una transferencia de electrones o de hidrógeno. A través de este mecanismo se pueden formar radicales hidroxilo y superóxido, capaces de dañar los azúcares y las nucleobases, así como intermedios que reaccionan directamente con las nucleobases.

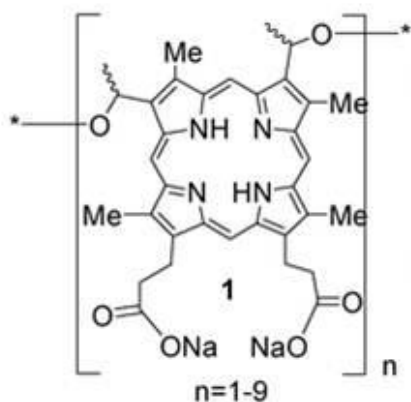
- *Mecanismo tipo II:* En estas reacciones hay una transferencia de energía triplete de la fotonucleada excitada al  $O_2$ , para mediar la formación del oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el cual es capaz de oxidar la nucleobases, especialmente la guanina.



**Figura IV.4:** Mecanismo de fotoescisión (Imagen obtenida de la tesis doctoral de Rosa Adam Ortiz)

En este proceso, la luz actúa como un cofactor altamente selectivo. Siempre que el cromóforo de la fotonucleasa sea sensible a la luz a una longitud de onda mayor a 300 nm, los ácidos nucleicos y la mayoría de las proteínas serán transparentes, de este modo se permitirá la excitación selectiva de la fotonucleasa.

Podemos encontrar múltiples ejemplos de complejos de metales de transición y moléculas orgánicas como fotonucleasas. Las porfirinas son los compuestos orgánicos más comunes utilizados como agentes *photocleavage*, y varias moléculas con esta estructura se usan actualmente como fármacos. Es el caso de fotofrin (Figura IV.5), utilizado para el tratamiento de cáncer de pulmón, esofágico, vejiga y cervical.<sup>18</sup> Otro tipo de moléculas orgánicas, como las antraquinonas<sup>22,23</sup> o naftaliimidias,<sup>24</sup> también han demostrado tener buena actividad nucleasa fotoinducida.

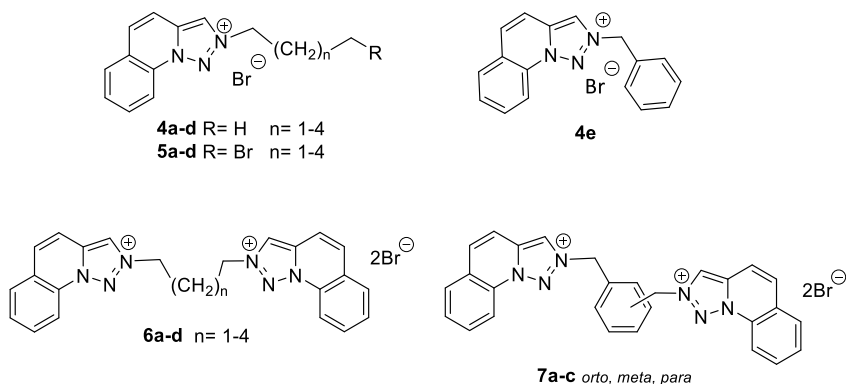


**Figura IV.5:** Fotosensibilizador fotofrin. Fuente:

<https://photochemistry.wordpress.com/2012/12/16/photodynamic-therapy-an-overview/>

En nuestro grupo de investigación se han desarrollado nuevos derivados de triazolopiridina capaces de actuar como eficientes nucleasas fotoinducidas.<sup>25</sup>

Dado el interés en el diseño de compuestos capaces de actuar como fotonucleasas con aplicación en terapia fotodinámica para el tratamiento del cáncer, en este capítulo se estudia la actividad fotonucleasa y el mecanismo de escisión de las monosales **4**, **5** y disales **6**, **7** de triazoloquinolinio (Figura IV.6) mediante electroforesis en gel de agarosa.



**Figura IV.6:** Sales de triazoloquinolinio utilizadas en los estudios de fotoescisión del ADN

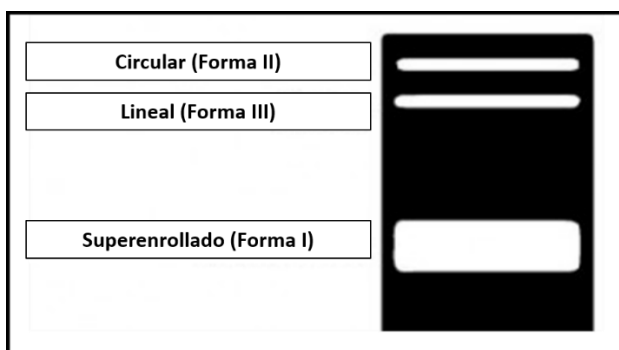
## 1. 2. Ensayo de la actividad nucleasa fotoinducida mediante electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es uno de los métodos más comunes para el análisis de diferentes fragmentos del ADN y sus conformaciones. El ADN en condiciones fisiológicas es un poli-anión y por tanto se mueve en un campo eléctrico.

La agarosa es un polímero que se disuelve en agua caliente y forma un gel cuando se enfría. El tamaño del poro del gel determinará el tamaño del fragmento de ADN que puede ser separado. El tamaño del poro del gel depende de su concentración, cuanto menor es la concentración del gel, mayor es el tamaño del poro y, por tanto, el ADN que puede separarse será de mayor tamaño. Otro factor que determina la separación de los fragmentos de ADN es su forma. Esta técnica está basada en el hecho de que las moléculas cargadas en disolución acuosa, se mueven hacia la carga opuesta cuando se encuentran en un campo eléctrico. La movilidad de las partículas depende de dos fuerzas opuestas: la fuerza eléctrica, la cual es directamente proporcional a la carga, y, la fuerza de fricción que se opone a la migración con una

intensidad que depende del tamaño y forma de la partícula y de las características del medio.

En este ensayo se trata una disolución de plásmido pUC18 superenrollado (sc, forma I) con el compuesto en las condiciones deseadas y seguidamente se realiza la electroforesis en gel de agarosa para determinar si el compuesto ha producido el corte del ADN. El corte en una de las hebras convierte el ADN superenrollado (forma I) en la forma circular (forma II) mientras que la escisión de las dos hebras da lugar al ADN lineal (forma III). La escisión de la doble hebra tiene lugar si los compuestos de estudio presentan la capacidad de provocar dos cortes en lugares muy cercanos en las dos hebras. El ADN superenrollado (forma I) es el que tiene mayor movilidad, el ADN circular (forma II) es el que presenta menor movilidad y el ADN lineal (forma III) tiene una movilidad intermedia (Figura IV.7).<sup>26</sup>



**Figura IV.7:** Electroforesis en gel de agarosa mostrando las formas I, II y III del ADN.

El bromuro de etidio se introduce en el gel de agarosa como agente revelador. Debido a su intensa fluorescencia en presencia del ADN, nos permite diferenciar las bandas correspondientes a las tres formas.

### **1.3. Objetivos**

El objetivo de este capítulo es el estudio de la habilidad de las monosales **4** y **5** y las disales **6** y **7** para provocar la fotoescisión del ADN, es decir, su capacidad como de actuar como fotonucleasas y estudiar el mecanismo del proceso de escisión del ADN.

## 2. ESTUDIOS DE FOTO-RUPTURA DEL ADN CON MONOSES DE TRIAZOLOQUINOLINIO

### 2.1 Actividad Fotonucleasa Inducida

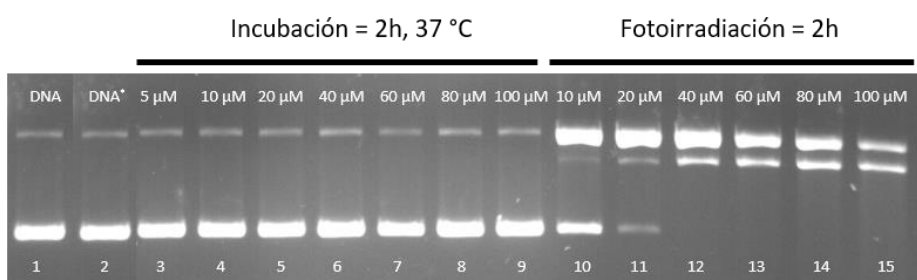
Los compuestos con la habilidad de unirse y romper el ADN en condiciones fisiológicas son en la actualidad de gran interés por sus potenciales aplicaciones. Estos compuestos son útiles para estudios de *footprinting*, en investigación genómica y como agentes de diagnóstico y antitumorales.<sup>27</sup>

Uno de los principales problemas de la quimioterapia para el cáncer es la dosis, que es próxima a los niveles de toxicidad de los principios activos, debido a su falta de especificidad para actuar sólo sobre las células cancerosas. Como consecuencia de ello, existe un gran interés en el diseño de agentes anticancerígenos con potencial citotóxico, que muestren selectividad sobre las células cancerosas sin afectar al tejido normal. Una de las estrategias para lograr este objetivo es el diseño de compuestos capaces de provocar la rotura del ADN tras la activación mediante luz en los tejidos diana.<sup>28-30</sup> Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, han demostrado que compuestos derivados de las triazolopiridinas, como las triazolopiridopirimidinas, presentan actividad nucleasa a bajas concentraciones cuando son fotoactivados.<sup>25</sup> Debido a los prometedores resultados obtenidos y con la finalidad de profundizar en la naturaleza de la actividad nucleasa fotoinducida de compuestos derivados de triazol, se llevaron a cabo ensayos de escisión de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa de las monoses **4d,e** y **5a-d** (Figura IV.6) descritas en el capítulo II.

En estos estudios se prepararon diferentes disoluciones de pUC18 con los compuestos a diferentes concentraciones en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM (pH = 7.2). Cada muestra se irradió con luz UVA ( $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$ ) durante dos horas.

Finalmente, los fragmentos plasmídicos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Para comprobar que el ADN no sufre daño tras la irradiación, se hizo un control de ADN en ausencia de compuesto irradiado en las mismas condiciones. Para comprobar si el ADN era degradado en presencia de compuesto sin irradiar, las muestras no fotoirradiadas se mantuvieron a 37 °C durante dos horas en ausencia de luz. Las condiciones experimentales para cada uno de los ensayos se indican de manera detallada en el apartado **IV.6.1**.

En primer lugar, se estudió el compuesto **5d** a concentraciones comprendidas entre 10 y 100  $\mu\text{M}$ . Los resultados se muestran en la figura **IV.8**.



**Figura IV.8:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **5d**,  $t_{\text{irradiación}} = 2 \text{ h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **5d** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **5d** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **5d** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **5d** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **5d** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **5d** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **5d** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **5d** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **5d** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **5d** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **5d** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **5d** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **5d** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

Como se observa en la figura **IV.8**, cuando el ADN es tratado con **5d** a 37 °C durante 2 h sin ser activado con luz (carreras 3-9), no se observa la ruptura del ADN. Sin embargo, cuando las diferentes muestras en presencia de compuesto son fotoirradiadas, se produce la escisión del ADN (carreras 10-15). A una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (carrera 10), el compuesto provoca la ruptura del ADN superenrollado que se transforma, parcialmente, en ADN circular (69.6 %) y lineal (2.0 %). A

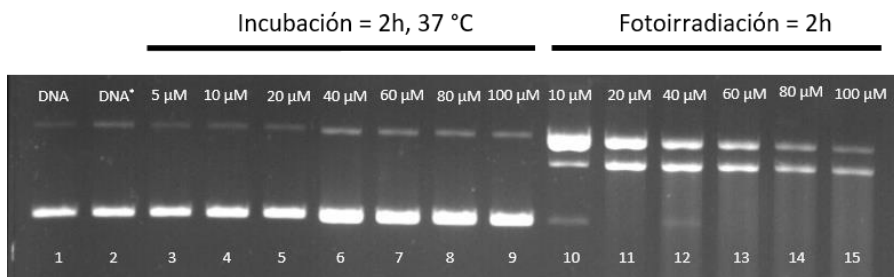


concentraciones mayores (carrera 11), la transformación del SC-ADN en las formas II (87.5 %) y III (11.65 %) aumenta significativamente. Entre 40-100  $\mu\text{M}$  (carreras 12-15) el compuesto degrada completamente el ADN superenrollado en ADN circular (forma I) y lineal (forma III), siendo mayor la degradación a concentraciones mayores de 80  $\mu\text{M}$  (carreras 14 y 15), puesto que el compuesto es capaz de romper el ADN en pequeños fragmentos que dan lugar a una estela en el gel, fenómeno que se conoce como *smearing*.

Los resultados, por tanto, indican que **5d** se comporta como una nucleasa muy efectiva cuando es activado con luz.

El ADN lineal puede generarse por la ruptura de las dos cadenas del ADN superenrollado, la ruptura de ADN circular o por la simultaneidad de ambos procesos. A 10 y 20  $\mu\text{M}$  se observan tres bandas correspondientes a las tres formas del ADN, lo que sugiere que parte del ADN lineal procede de la ruptura de las dos hebras del ADN superenrollado.<sup>31</sup> Este hecho es relevante ya que la ruptura de una doble hebra no es reparada por los mecanismos celulares lo que conllevaría a la muerte celular y, por tanto, el compuesto **5d** podría considerarse un potencial agente antitumoral.

El mismo estudio se llevó a cabo con las monosales restantes. Los resultados se muestran en las figuras **IV.9-11**. En general, todos los compuestos sin fotoirradiar (carreras 3-10) no mostraron actividad nucleasa, mientras que en presencia de luz (carreras 10-15) se comportan como nucleasas efectivas.

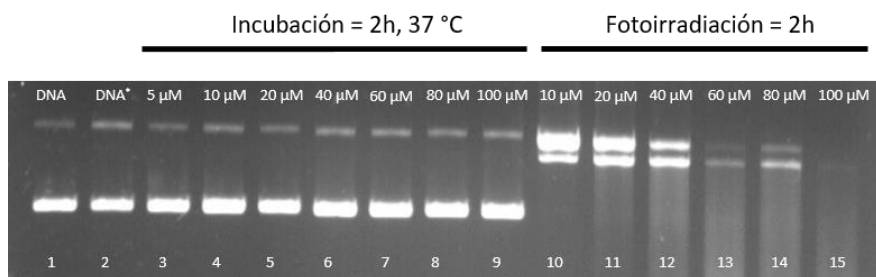


**Figura IV.9:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **5c**,  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **5c** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **5c** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **5c** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **5c** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **5c** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **5c** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **5c** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **5c** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **5c** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **5c** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **5c** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **5c** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **5c** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

El compuesto **5c** (Figura IV.9) muestra capacidad de cortar el ADN cuando es fotoirradiado, al igual que el compuesto **5d**, aunque en este caso, **5c** presenta una mayor capacidad de fotoescisión que **5d** (carreras 10-15). A 10  $\mu\text{M}$  la transformación del ADN superenrollado en circular (94.7 %) y lineal (3.3 %) es prácticamente completa (98%). Como se puede apreciar, según aumenta la concentración del compuesto, aumenta la degradación del ADN, hecho que ya se observó en el compuesto **5d** y que indica la degradación del ADN por parte de los compuestos depende claramente de la concentración, de echo a partir de 20  $\mu\text{M}$  (carreras 11-15), el compuesto ha sido capaz de degradar el ADN en ADN circular, lineal y pequeños fragmentos dando lugar a *smearing*.

La presencia de las tres formas de ADN en la carrera 10 (concentración 10  $\mu\text{M}$ ), indica que parte del ADN lineal deriva de dos cortes simultáneos en el ADN superenrollado, por lo que el corte producido por el compuesto **5c** es *double strand*,<sup>32</sup> característica que, al igual que ocurre con **5d**, hace de este compuesto un potencial agente antitumoral.

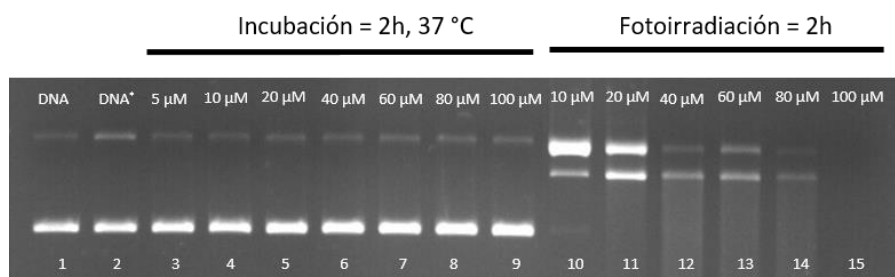
Los resultados para el compuesto **5b** se muestran en la figura **IV.10**.



**Figura IV.10:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **5b**,  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **5b** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **5b** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **5b** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **5b** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **5b** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **5b** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **5b** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **5b** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **5b** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **5b** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **5b** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **5b** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **5b** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

El compuesto **5b** presenta una actividad nucleasa fotoinducida muy significativa. Esta monosal promueve, a 10  $\mu\text{M}$  (carrera 10) la ruptura del ADN superenrollado completamente, que es transformado en circular (60.1 %) y lineal (39.9 %). A partir de 20  $\mu\text{M}$  (carrera 11-14) se observan las formas I y II y una estela de pequeños fragmentos de ADN (*smearing*). A concentración de 100  $\mu\text{M}$  (carrera 15), el ADN es totalmente degradado en pequeños fragmentos, no se observa forma II ni forma III. Estos resultados ponen de manifiesto que la actividad fotonucleasa de este compuesto es mayor que la de los compuestos **5c** y **5d**.

El compuesto **5a** también presenta actividad fotonucleasa muy relevante. Los resultados se muestran en la figura **IV.11**.



**Figura IV.11:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **5a**,  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **5a** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **5a** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **5a** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **5a** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **5a** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **5a** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **5a** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **5a** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **5a** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **5a** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **5a** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **5a** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **5a** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

La actividad fotonucleasa del compuesto **5a**, presenta un patrón similar al descrito para los compuestos anteriores. En ausencia de luz, **5a** no es capaz de producir la degradación del ADN mientras que promueve la ruptura del plásmido cuando es irradiado.

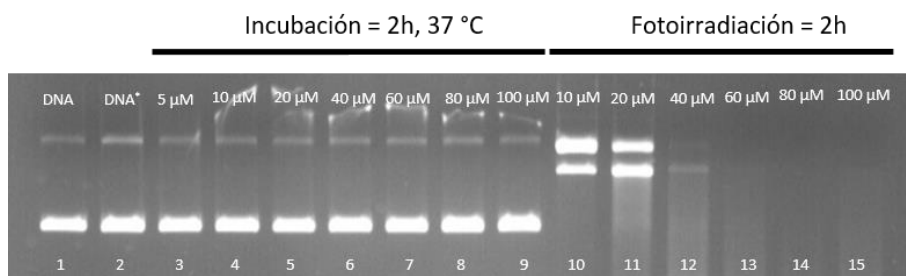
Este compuesto a 10  $\mu\text{M}$  (carreras 10), no degrada completamente el ADN superenrollado en las formas circular (93.5 %) y lineal (4.35 %). A partir de 20  $\mu\text{M}$  y hasta 80  $\mu\text{M}$  (carrera 11-14) se observa ADN circular, lineal y *smearing*. En la carrera 15, que corresponde a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , el corte es muy significativo en tanto que ya no se observa ninguna de las formas del ADN en el gel.

Teniendo en cuenta los resultados, podemos concluir que las monosales de triazoloquinolinio **5** presentan actividad nucleasa fotoinducida muy significativa. La actividad de las monosales está íntimamente relacionada con su estructura. La capacidad de las monosales para provocar la fotoescisión del ADN, disminuye con la longitud de la cadena alifática. Cuánto más larga es la cadena alifática, menor es la capacidad para degradar el ADN. Estos resultados muestran que la actividad

fotonucleasa de estos compuestos no se puede relacionar directamente con su capacidad de interactuar con el ADN.

Finalmente se ensayaron los compuestos **4d** y **4e**. Los resultados se muestran en las figuras **IV.12** y **IV.13**.

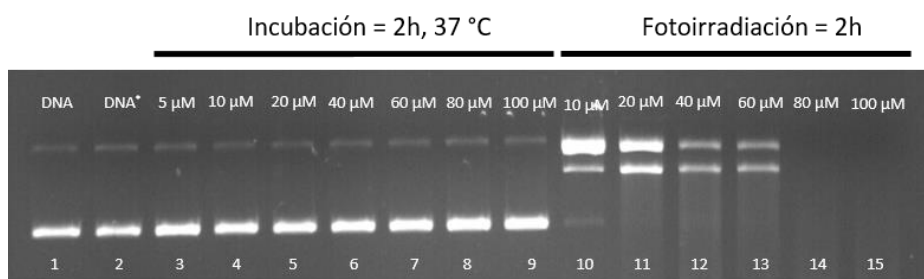
El compuesto **4e** (Figura **IV.12**) se comporta como una fotonucleasa altamente efectiva, con una actividad superior a la que presentan los compuestos descritos hasta el momento. A 20  $\mu\text{M}$  (carrera 11), el compuesto promueve la ruptura del ADN superenrollado en circular, lineal y pequeños fragmentos. A 40  $\mu\text{M}$  (carrera 12) se puede observar que el ADN está completamente degradado en pequeños fragmentos, aunque todavía se aprecia la forma lineal. A 60  $\mu\text{M}$  (carrera 13) ya no se observa ninguna de las tres formas del ADN, el plásmido está totalmente degradado en pequeños fragmentos que prácticamente no se observan en el gel.



**Figura IV.12:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **4e**,  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **4e** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **4e** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **4e** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **4e** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **4e** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **4e** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **4e** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **4e** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **4e** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **4e** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **4e** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **4e** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **4e** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

Como observamos en la figura **IV.13**, cuando **4d** es fotoirradiado y a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (carrera 10), todavía se aprecia una pequeña cantidad de ADN superenrollado (1.2 %).

A 20  $\mu\text{M}$  (carrera 11), el ADN superenrollado se transforma completamente en ADN circular y lineal, observándose también un ligero *smearing*. A concentraciones de 40 y 60  $\mu\text{M}$  (carreras 12 y 13), la degradación del ADN es más significativa, siendo clara la disminución del ADN circular y lineal y el aumento de la estela debida a los pequeños fragmentos. En las siguientes carreras, 14 y 15, que corresponden a concentraciones de 80 y 100  $\mu\text{M}$  respectivamente, el ADN ha sido degradado por completo, siendo visible una pequeña cantidad de pequeños fragmentos de ADN que da lugar a *smearing*.



**Figura IV.13:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **4d**,  $t_{\text{irradiación}} = 2 \text{ h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **4d** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **4d** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **4d** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **4d** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **4d** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **4d** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **4d** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **4d** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **4d** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **4d** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **4d** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **4d** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **4d** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

El compuesto **4d** presenta un patrón de corte similar a los compuestos **5a-d** a concentraciones comprendidas entre 10-60  $\mu\text{M}$  (carreras 10-13), pero a partir de 80  $\mu\text{M}$  (carreras 14 y 15) se comporta como una fotonucleasa más efectiva.

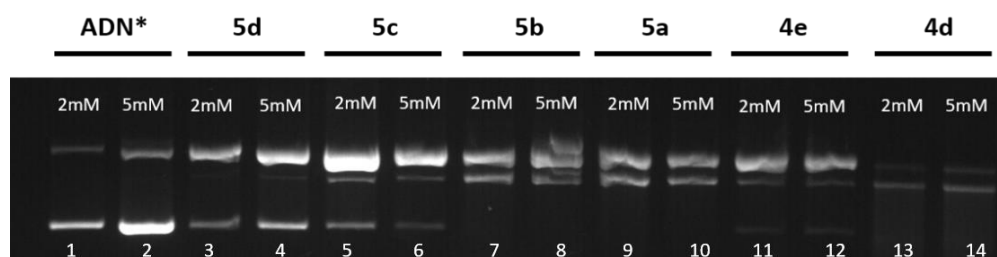
Las monosales **4d** y **4e**, que no presentan un bromo terminal en su estructura, presentan una actividad fotonucleasa mayor, que se observa claramente a concentraciones más elevadas, por lo que se puede deducir que la actividad fotonucleasa está íntimamente relacionada con la estructura de los compuestos.

### 2.1.1 Estudios de la influencia de la fuerza iónica sobre la actividad nucleasa de las monosales de triazoloquinolinio

En estudios anteriores de desnaturalización térmica y viscosidad, se demostró la importancia de la fuerza iónica en la interacción de las monosales de triazoloquinolinio con el ADN. Por lo que se estudió la actividad fotonucleasa de estos compuestos a diferentes fuerzas iónicas, 2 y 5 mM.

Las condiciones experimentales se describen detalladamente en la parte experimental, apartado IV.6.2.

Los resultados de este ensayo, que se muestran en la figura IV.14, ponen de manifiesto que la actividad fotonucleasa de los compuestos, no varía en función de la fuerza iónica, lo que corrobora la teoría de que la actividad nucleasa fotoinducida no depende de la interacción de los compuestos con el ADN.



**Figura IV.14:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con las diferentes monosales (10  $\mu$ M) en tampón fosfato 1 mM con distintas fuerzas iónicas (NaCl 2 y 5 mM). Tiempo de irradiación 2 h. 1: ADN (NaCl 2 mM) 2: ADN (NaCl 5 mM) 3: **5d** (NaCl 2 mM). 4: **5d** (NaCl 5 mM). 5: **5c** (NaCl 2 mM). 6: **5c** (NaCl 5 mM). 7: **5b** (NaCl 2 mM). 8: **5b** (NaCl 5 mM). 9: **5a** (NaCl 2 mM). 10: **5a** (NaCl 5 mM). 11: **4e** (NaCl 2 mM). 12: **4e** (NaCl 5 mM). 13: **4d** (NaCl 2 mM). 14: **4d** (NaCl 5 mM).

## 2.2 Mecanismo de fotoescisión del ADN

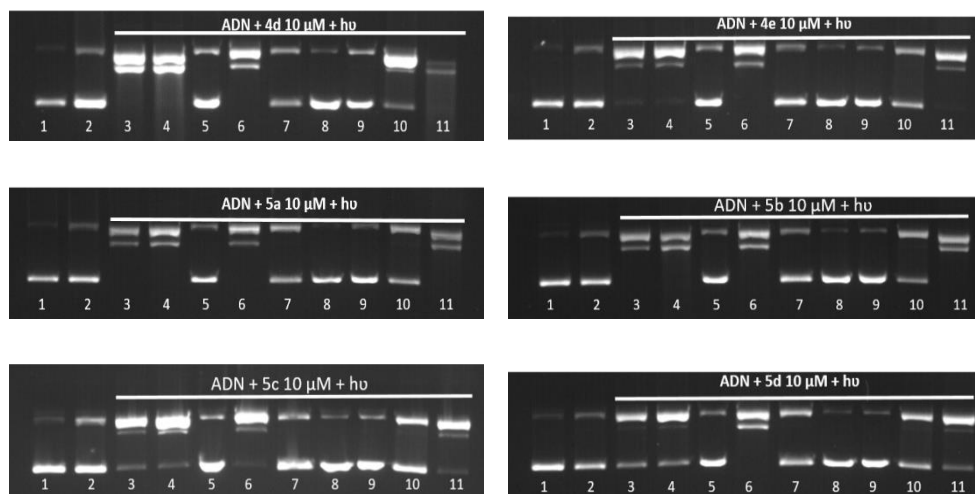
La ruptura fotoinducida del ADN, normalmente ocurre a través de un mecanismo oxidativo, en el cual están implicadas diferentes especies reactivas del oxígeno (ROS) como son el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ),<sup>33,34</sup> el radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ),<sup>35</sup> el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sup>36</sup> y el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ),<sup>37</sup> que son los responsables de producir la escisión del ADN.

Con el objetivo de conocer si estos compuestos cortaban el ADN mediante un mecanismo oxidativo y determinar las especies implicadas en este proceso, se estudió el corte inducido por los distintos compuestos en presencia de diferentes captadores de especies reactivas del oxígeno.

El uso de compuestos que reaccionan con estas especies reactivas, permite establecer su participación en el mecanismo de degradación ya que inhiben el proceso de rotura del ADN. Si se utilizan captadores o *scavengers* del radical hidroxilo como el formiato sódico, yoduro potásico y DMSO, cabe esperar una inhibición o al menos una disminución del daño producido en el ADN por el compuesto, si el radical hidroxilo participa en la reacción de escisión del ácido nucleico.<sup>38-41</sup> El uso de captadores del radical superóxido como la enzima superóxido dismutasa (SOD) permite conocer si el mecanismo de escisión implica esta especie reactiva.<sup>39,41-43</sup> La 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (TMP), el 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano (DABCO) y la azida sódica, reaccionan también con el oxígeno singlete e impiden que esta especie pueda reaccionar con la doble hélice y como consecuencia, dañarla.<sup>38,39,41</sup> Por otra parte, el  $\text{D}_2\text{O}$  puede ser utilizada para detectar la presencia de oxígeno singlete, ya que el agua pesada aumenta el tiempo de vida media de éste, y por tanto se observaría un aumento en el corte del ADN inducido por el compuesto.



A continuación (Figura IV.15), se muestran los resultados obtenidos de los ensayos realizados con las monosales de triazoloquinolinio. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado IV.6.3.



**Figura IV.15:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con las monosales 10  $\mu\text{M}$ ,  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: Compuesto; 4: Compuesto +  $\text{D}_2\text{O}$ ; 5: Compuesto +  $\text{NaN}_3$  0.4 M; 6: Compuesto + TMP 0.4 M; 7: Compuesto + DABCO 0.4 M; 8: Compuesto + KI 0.4 M; 9: Compuesto + Formiato sódico 0.4 M; 10: Compuesto + DMSO 0.4 M; 11: Compuesto + SOD

Como se puede observar en la figura IV.15, el corte inducido por los compuestos en presencia de captadores de especies reactivas de oxígeno, presenta un patrón similar. En general, los captadores del oxígeno singlete inhiben el corte (carreras 5-7), esto indica que el oxígeno singlete estaría implicado en el mecanismo de escisión del ADN por parte de estos compuestos. El agua pesada (carrera 4) no produce ningún cambio significativo en el corte del ADN.

Yoduro potásico, formiato sódico y DMSO (carreras 8-10) inhiben claramente el corte indicando que el radical hidroxilo también intervendría en el proceso de rotura del ADN.

La superóxido dismutasa cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, el cual también interviene en el daño al ADN. La presencia de SOD (carrera 11) no afecta a la actividad de los compuestos, excepto a la del compuesto **4d**, en el que la SOD aumenta el corte claramente. En este caso podríamos decir que el peróxido de hidrógeno procedente de la dismutación del superóxido, interviene en la rotura del ADN.<sup>44-46</sup>

Por tanto, las especies reactivas de oxígeno implicadas en el mecanismo de escisión del ADN por parte de las monosales de triazoloquinolinio son el oxígeno singlete, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno.

### 2.2.1 Interacción con los surcos mayor y menor del ADN

En la literatura existen moléculas que interaccionan a través de los surcos del ADN de manera específica. Entre estas moléculas se encuentran la distamicina A,<sup>38, 47, 48</sup> el 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)<sup>49,50</sup> y el Hoescht 33342<sup>51</sup> que interaccionan en el surco menor (Figura IV.16).

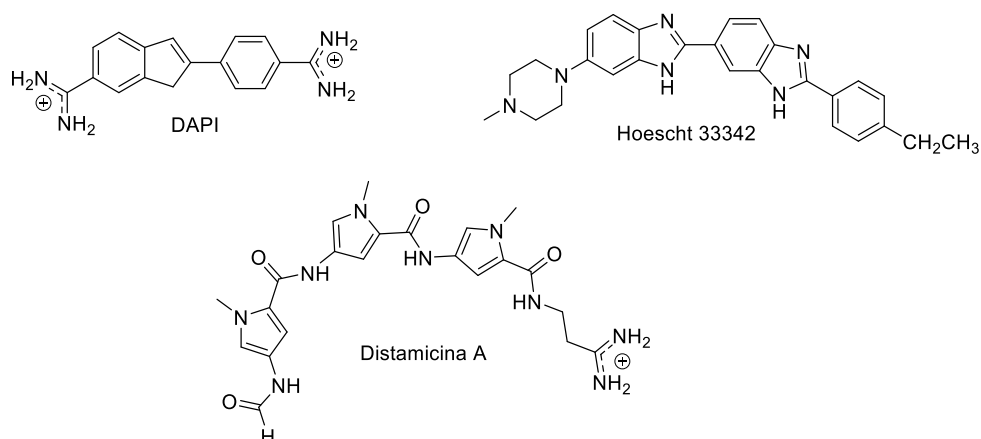
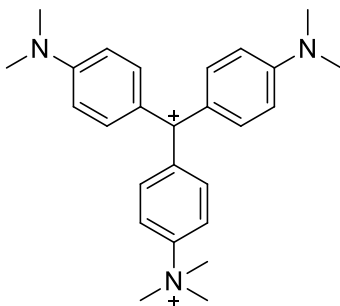


Figura IV.16. Moléculas que interaccionan con el surco menor del ADN

Entre las moléculas que se unen al surco mayor, cabría destacar el verde de metilo (VM), que es una molécula no planar con simetría pseudo- $C_{2v}$ .<sup>52</sup>



**Figura III.13:** Verde de Metilo

Generalmente, las moléculas que se unen al surco menor tienen forma de media luna, contienen anillos aromáticos y presentan un potencial electrostático positivo, que facilita la unión dado el potencial electronegativo del surco menor. La forma arqueada de estas moléculas permite que se adapten a la curvatura del surco menor. Normalmente el N2 del grupo amino de la guanina bloquea la unión de estas moléculas, como consecuencia de un ensanchamiento y una disminución de la profundidad del surco, así como una disminución en el potencial electronegativo. El Hoescht 33342 podría modificar el surco al unirse, facilitando así la entrada del compuesto en el surco menor favoreciendo el corte por parte del mismo.<sup>53</sup>

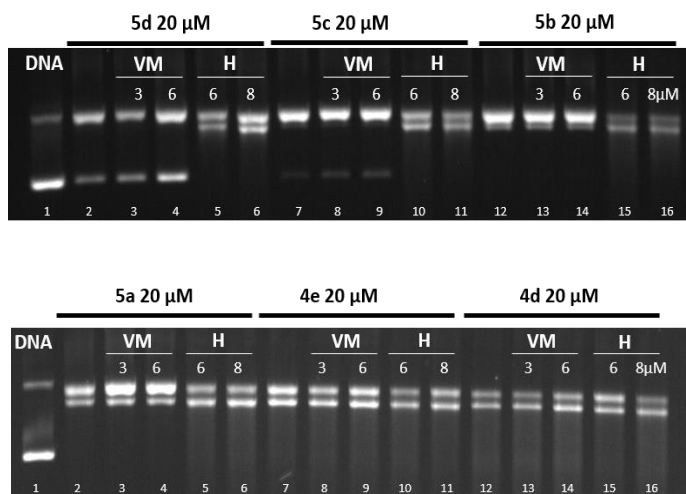
Si en presencia de estas moléculas se produce una disminución del daño al ADN por parte de los compuestos, podría indicar una posible interacción de estos por estas regiones del ADN.

Para conocer si la interacción de las monosales tiene lugar a través del surco mayor o menor, se utilizaron moléculas que interaccionan de manera específica en cada

uno de los surcos, Hoescht 33342 y verde de metilo, los cuales interactúan en el surco menor y mayor respectivamente. Los resultados se muestran en la figura IV.17.

Las condiciones experimentales se encuentran detalladas en el apartado IV.6.4.

En presencia de verde de metilo el corte del ADN inducido por el compuesto no presenta cambios significativos. Sin embargo, en presencia de Hoescht 33342, aumenta el corte, lo que sugiere que las monosales interactúan en el surco menor.



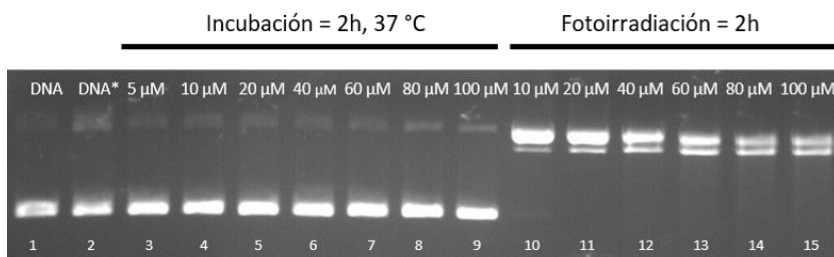
**Figura IV.17:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con las monosales **4** y **5** (20 μM). Todos los compuestos fueron irradiados durante un periodo de tiempo de 2 h. 1: ADN control; 2, 7 y 12: Compuesto + ADN; 3, 8 y 13: Compuesto + Verde Metilo 3 μM; 4, 9 y 14: Compuesto + Verde Metilo 6 μM; 5, 10 y 15: Compuesto + Hoescht 6 μM; 6, 11 y 16: Compuesto + Hoescht 8 μM.

### 3. ESTUDIOS DE FOTO-RUPTURA DEL ADN CON DISALES DE TRIAZOLOQUINOLINIO

#### 3.1 Actividad Fotonucleasa Inducida

Al igual que se hizo con las monosales, se ensayó la actividad fotonucleasa para las disales de triazoloquinolinio (**6a-d** y **7a-c**), de acuerdo con el procedimiento experimental descrito en el apartado **IV.6.1**. Para todos los ensayos se utilizó tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM, pH = 7.3.

Los resultados de las disales **6a-d** se muestran en las figuras **IV.18-21**, respectivamente.

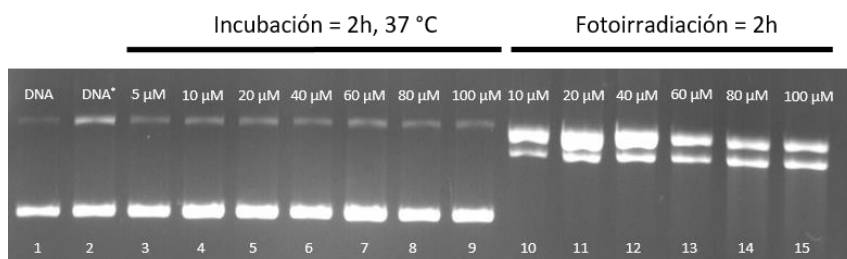


**Figura IV.18:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **6d**,  $t_{\text{irradiación}} = 2$  h. 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **6d** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **6d** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **6d** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **6d** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **6d** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **6d** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **6d** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **6d** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **6d** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **6d** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **6d** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **6d** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **6d** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

El compuesto **6d** (figura **IV.18**) tiene capacidad para romper el ADN cuando es irradiado. A concentraciones comprendidas entre 10 y 60  $\mu\text{M}$  (carreras 10-13) el compuesto transforma completamente el ADN superenrollado en las formas II (83.8% (10  $\mu\text{M}$ ) y 46.6% (60  $\mu\text{M}$ )) y III (16.2% (10  $\mu\text{M}$ ) y 54.4% (60  $\mu\text{M}$ )). A 80 y 100  $\mu\text{M}$  (carreras 14 y 15) además del ADN circular y lineal, se observan una pequeña cantidad de pequeños fragmentos de ADN que dan lugar a una estela en el gel (*smearing*).

Si comparamos con los resultados obtenidos para el compuesto **5d** (Figura IV.8), ambos compuestos presentan una actividad nucleasa fotoinducida, aunque el compuesto **6d** actúa como una fotonucleasa más efectiva, ya que **6d** a 10 y 20  $\mu\text{M}$  (carreras 10 y 11) es capaz de transformar totalmente el ADN superenrollado y el compuesto **5d** lo hace de manera parcial (carreras 10 y 11, figura IV.8).

Como se observa en la figura IV.19, el compuesto **6c** es capaz de degradar por completo el ADN superenrollado en circular (69.6% (10  $\mu\text{M}$ ) y 65.3 (40  $\mu\text{M}$ )) y lineal (30.7% (10  $\mu\text{M}$ ) y 34.7% (40  $\mu\text{M}$ )) a concentraciones de 10-40  $\mu\text{M}$  (carreras 10-12). Entre 60 y 100  $\mu\text{M}$  (carreras 13-15) aumenta la degradación del ADN observándose ADN circular y lineal, así como pequeños fragmentos de ADN (*smearing*).



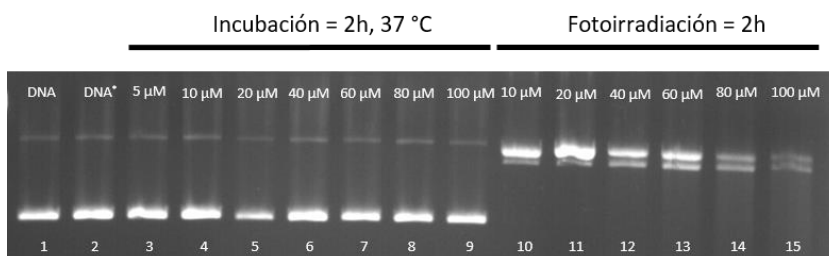
**Figura IV.19:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **6c**,  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **6c** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **6c** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **6c** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **6c** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **6c** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **6c** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **6c** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **6c** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **6c** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **6c** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **6c** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **6c** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **6c** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

Cabe resaltar que la eficiencia nucleolítica del compuesto **6c** es ligeramente mayor que la del compuesto **6d**.

El estudio comparativo entre el compuesto **6c** y **5c** (figuras IV.19 y IV.9) muestra que, la capacidad nucleasa de la disal es menor que la de su monosal análoga a partir de

una concentración de 20  $\mu\text{M}$ . A diferencia de lo observado para los compuestos **6d** y **5d**.

En la figura **IV.20**, se muestran los resultados para el compuesto **6b**.



**Figura IV.20:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **6b**,  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **6b** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **6b** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **6b** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **6b** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **6b** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **6b** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **6b** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **6b** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **6b** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **6b** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **6b** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **6b** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **6b** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

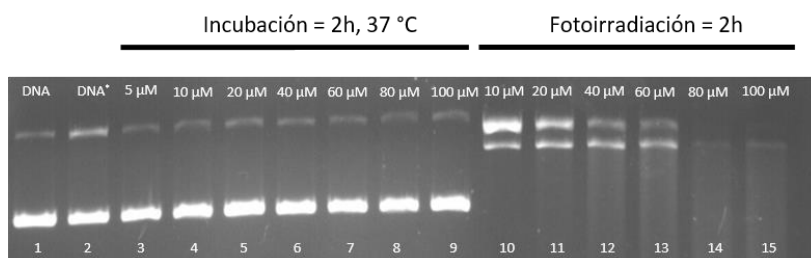
Al igual que en los compuestos anteriores, el ADN en presencia de compuesto sin irradiar, no sufre ningún daño, lo que significa que la escisión del ADN debida al compuesto, se produce exclusivamente por acción de la luz. El compuesto **6b** fotoactivado es capaz de transformar por completo el ADN superenrollado en ADN circular y lineal, como podemos observar en las carreras 10-12, que corresponden a las concentraciones 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  respectivamente. A 10 y 20  $\mu\text{M}$  (carreras 10 y 11) el ADN circular representa el 75% y el ADN lineal el 25%. A 40  $\mu\text{M}$  (carrera 12) se observa la misma proporción de ADN lineal y circular (49-51% respectivamente, figura **IV.20**). A partir de 60  $\mu\text{M}$  (carrera 13) ya se puede apreciar que el compuesto **6b** es capaz de degradar el ADN en pequeños fragmentos, aunque se observa, todavía, ADN lineal y circular. Las disales **6b** y **6c** presentan un patrón de corte similar, aunque a concentraciones elevadas (80 y 100  $\mu\text{M}$ ) se observa que **6b** corta

más el ADN que **6c**. Por tanto, podríamos concluir que **6b** es una nucleasa más efectiva que **6c**.

Comparando los resultados obtenidos con **5b** (carreras 10-15, figura **IV.10**), se observa que ésta presenta una actividad nucleolítica muy superior a la que presenta **6b**.

Los resultados para el compuesto **6a**, se muestran en la figura **IV.21**.

Cuando el compuesto es fotoirradiado, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (carrera 10) la disal **6a** induce la degradación del ADN, que es transformado completamente en las formas II (97.9 %) y III (2.1 %). A 20  $\mu\text{M}$  (carrera 11) se observa que parte del ADN circular y lineal ha empezado a transformarse en pequeños fragmentos que dan lugar a una estela en el gel (*smearing*). A concentraciones mayores, 40 y 60  $\mu\text{M}$  (carreras 12 y 13) la degradación del ADN es mayor, ya que se aprecia menor cantidad de ADN circular y lineal y pequeños fragmentos. A partir de 80 y 100  $\mu\text{M}$  (carreras 14 y 15) no se observa ADN circular, disminuye significativamente la cantidad de ADN lineal y prácticamente solo se aprecia *smearing*.



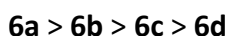
**Figura IV.21:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **6a**,  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **6a** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **6a** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **6a** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **6a** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **6a** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **6a** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **6a** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **6a** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **6a** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **6a** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **6a** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **6a** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **6a** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.



El corte producido por **6a** es mayor que el observado en las disales anteriores (**6b-6d**). Este hecho se observa claramente a concentraciones superiores a 20  $\mu\text{M}$  en la que **6a** degrada por completo el ADN y, a concentraciones mayores de 60  $\mu\text{M}$  **6a** promueve la degradación de ADN en pequeños fragmentos que dan lugar a *smearing*. Esta alta eficiencia nucleolítica de **6a** muestra claramente que la actividad nucleasa de las disales no está directamente relacionada con la afinidad de estos compuestos por el ADN. Resultados similares se publicaron por nuestro grupo de investigación en compuestos derivados del triazol.<sup>25</sup>

El patrón de corte de **6a** es muy similar al de su monosal análoga **5a** (Figura **IV.11**).

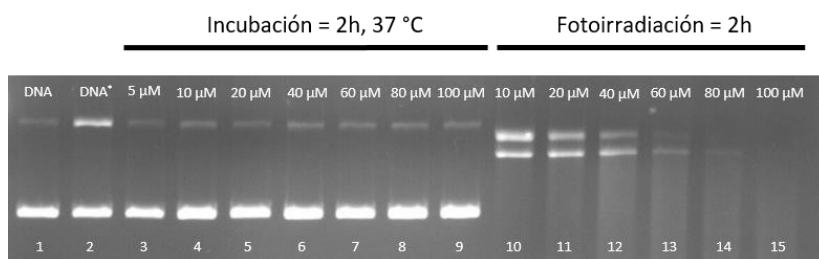
Los resultados que se acaban de describir ponen de manifiesto que el orden de eficiencia nucleolítica de las disales con cadena alifática es el siguiente:



Al igual que ocurre con las monosales, cuanto mayor es la longitud de la cadena alifática, menor es la capacidad del compuesto para provocar fotoescisión del DNA.

Por otra parte, en general, la capacidad nucleasa fotoinducida de estas disales es menor que la de las monosales correspondientes.

A continuación, se ensayaron los compuestos **7a**, **7b** y **7c**. Estos compuestos, estructuralmente diferentes a las disales anteriormente descritas, presentan un anillo de benceno que une las dos unidades de triazoloquinolina, por lo cual, su estudio permitirá conocer otras características estructurales que pudieran influir en la actividad fonucleasa de esta serie de compuestos. Los resultados se muestran en las figuras **IV.22-24**, respectivamente.

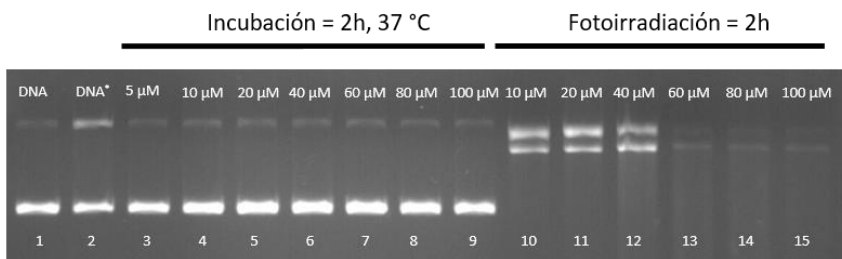


**Figura IV.22:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **7a**,  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **7a** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **7a** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **7a** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **7a** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **7a** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **7a** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **7a** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **7a** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **7a** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **7a** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **7a** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **7a** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **7a** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

El corte producido por el compuesto **7a** (figura IV.22) es claramente dependiente de la concentración. A 10  $\mu\text{M}$  (carrera 10) se observa la conversión total del ADN superenrollado en las formas I (96.8 %) y II (3.2 %). A 20 y 40  $\mu\text{M}$  (carreras 11 y 12) observamos que disminuye la proporción de ADN circular y se observa la estela debida la formación de pequeños fragmentos (*smearing*). A 60  $\mu\text{M}$  (carrera 13) la degradación de ADN es tal que solo se observa una pequeña cantidad de ADN lineal y pequeños fragmentos del plásmido. A 80 y 100  $\mu\text{M}$  (carreras 14 y 15) únicamente se aprecia *smearing* en el gel. Los resultados ponen de manifiesto que **7a** tiene una actividad fotonucleasa mayor que las disales anteriormente estudiadas.

El compuesto **7b** (figura IV.23) presenta una actividad nucleasa fotoinducida similar a la disal **7a**.

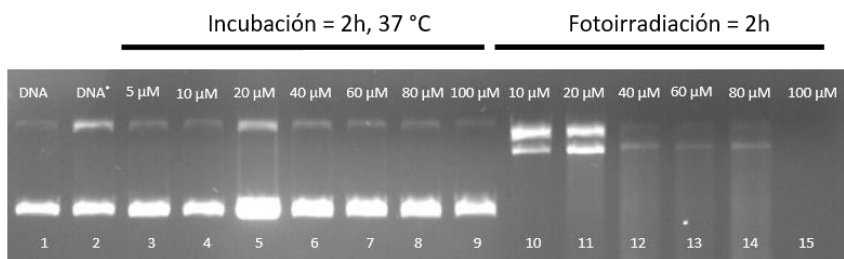
A 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  (carreras 10-12) el ADN superenrollado es transformado a ADN circular y lineal. A las concentraciones más elevadas (carreras 13-15) no se observa ADN circular, se aprecia una pequeña cantidad de lineal y *smearing*.



**Figura IV.23:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **7b**,  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **7b** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **7b** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **7b** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **7b** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **7b** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **7b** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **7b** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **7b** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **7b** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **7b** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **7b** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **7b** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **7b** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

En la figura **IV.24** se muestran los resultados para el compuesto **7c**.

En este caso, a 10  $\mu\text{M}$  (carrera 10) no se observa *smearing* pero la transformación del ADN superenrollado en las formas II (89.9 %) y III (10.1 %) es completa. A 20  $\mu\text{M}$  (carrera 11) se aprecia ADN circular y lineal y *smearing*, debido a que el ADN empieza a degradarse en fragmentos pequeños. A concentraciones entre 40-80  $\mu\text{M}$  (carreras 12-14) solo se observan pequeños fragmentos de ADN y pequeñas cantidades de ADN lineal. A 100  $\mu\text{M}$  (carrera 15) el corte promovido por el compuesto es tal que no se observan ADN en el gel.



**Figura IV.24:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con **7c**,  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: **7c** 5  $\mu\text{M}$  no irradiado; 4: **7c** 10  $\mu\text{M}$  no irradiado; 5: **7c** 20  $\mu\text{M}$  no irradiado; 6: **7c** 40  $\mu\text{M}$  no irradiado; 7: **7c** 60  $\mu\text{M}$  no irradiado; 8: **7c** 80  $\mu\text{M}$  no irradiado; 9: **7c** 100  $\mu\text{M}$  no irradiado; 10: **7c** 10  $\mu\text{M}$  irradiado; 11: **7c** 20  $\mu\text{M}$  irradiado; 12: **7c** 40  $\mu\text{M}$  irradiado; 13: **7c** 60  $\mu\text{M}$  irradiado; 14: **7c** 80  $\mu\text{M}$  irradiado; 15: **7c** 100  $\mu\text{M}$  irradiado.

El patrón de corte de **7c** es muy similar al de la monosal **4e** (figura IV.12), aunque la actividad de **7c** es ligeramente menor. A concentraciones entre 60 y 80  $\mu\text{M}$ , la monosal degrada totalmente el ADN, por el contrario, a estas mismas concentraciones para la disal, se observa una pequeña cantidad de ADN lineal.

Los resultados, en conjunto para estos tres compuestos, ponen de manifiesto que la actividad de **7a** y **7b** es similar mientras que la actividad de **7c** es ligeramente superior. Sorprendentemente, para estas disales la actividad nucleasa está directamente relacionada con la afinidad por el ADN.

Comparando con la que sería su monosal análoga, **4e**, estos tres compuestos presentan una actividad nucleolítica menor (ver carreras 12-15 figura IV.12).

En conclusión, todas las disales se comportan como nucleasas muy efectivas cuando son fotoirradiadas, aunque su actividad fotonucleasa es menor que la de sus monosales análogas. Los compuestos **6a**, **7a**, **7b** y **7c** resultaron ser los más efectivos, ya que a 100  $\mu\text{M}$  no se observa ninguna forma de ADN, apreciándose únicamente en el gel, pequeños fragmentos que dan lugar a una estela.

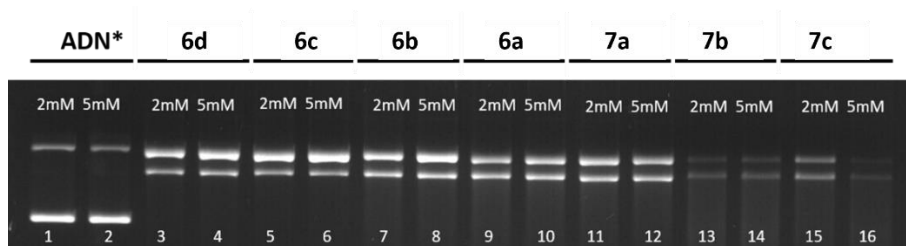
El hecho de que **7a** presenten una actividad tan efectiva apoya los resultados anteriores que demuestran que no existe una relación directa entre la actividad fotonucleasa y la afinidad por el ADN. Por tanto, podemos sugerir que la actividad nucleasa de estos compuestos está determinada, principalmente, por su capacidad para generar especies reactivas del oxígeno y por consiguiente del potencial de reducción de estos compuestos.

### **3.1.1 Influencia de la Fuerza Iónica Sobre la Actividad Nucleasa de las Disales de Triazoloquinolinio**

Los estudios de desnaturalización térmica, han puesto de manifiesto que la interacción de las disales con el ADN depende de la fuerza iónica, por ello consideramos interesante realizar un estudio sobre la actividad nucleasa de las distintas disales a diferentes fuerzas iónicas.

Las condiciones experimentales de este estudio se describen detalladamente en el apartado **IV.6.2**.

Los resultados (Figura **IV.25**) indican que la actividad fotonucleasa de las disales no depende de la fuerza iónica, del mismo modo que ocurría con las monosales. Estos resultados, a su vez, confirman, que la actividad nucleasa fotoinducida no depende del modo de interacción de nuestros compuestos con el ADN.

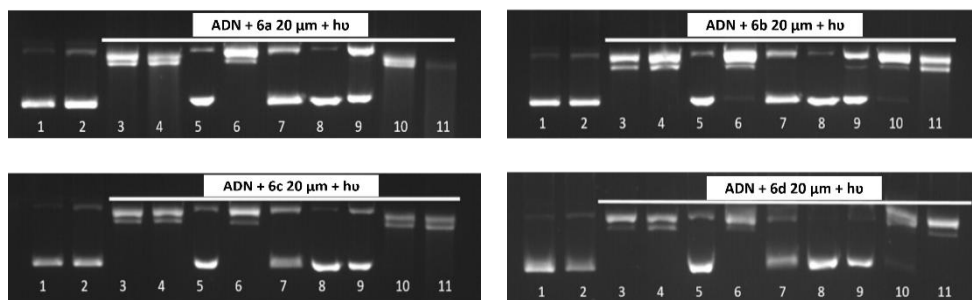


**Figura IV.25:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con las disales **6** y **7** (20  $\mu$ M) en tampón fosfato 1 mM con distintas fuerzas iónicas (NaCl 2 y 5 mM). Todas las muestras fueron irradiadas durante un periodo de tiempo de 2 h. 1: ADN (NaCl 2 mM). 2: ADN (NaCl 5 mM). 3: **6d** (NaCl 2 mM). 4: **6d** (NaCl 5 mM). 5: **6c** (NaCl 2 mM). 6: **6c** (NaCl 5 mM). 7: **6b** (NaCl 2 mM). 8: **6b** (NaCl 5 mM). 9: **6a** (NaCl 2 mM). 10: **6a** (NaCl 5 mM). 11: **7a** (NaCl 2 mM). 12: **7a** (NaCl 5 mM). 13: **7b** (NaCl 2 mM). 14: **7b** (NaCl 5 mM). 15: **7c** (NaCl 2 mM). 16: **7c** (NaCl 5 mM).

### 3.2 Mecanismo de Fotoescisión del ADN

El estudio del mecanismo de ruptura del ADN por parte de las disales de triazoloquinolinio se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito para las monosales, que se indica detalladamente en el apartado **IV.6.3**.

Para las disales **6a-d** (figura **IV.26**) los resultados indican que el D<sub>2</sub>O (carrera 4) aumenta ligeramente el daño al ADN. El agua pesada aumenta el tiempo de vida media del oxígeno singlete, por lo tanto, este resultado sugiere la participación del oxígeno singlete en el corte producido por el compuesto.



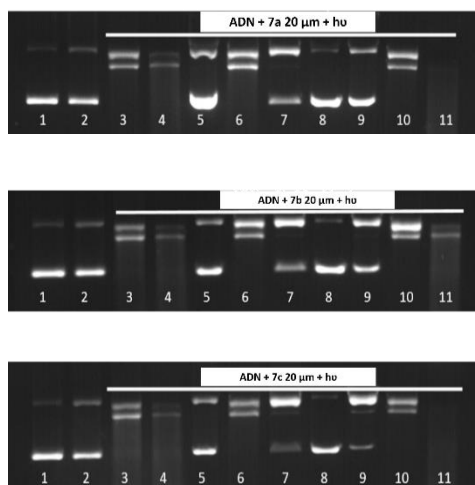
**Figura IV.26:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con las disales **6** (20  $\mu$ M),  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: DNA control no irradiado; 2: DNA control irradiado; 3: Compuesto; 4: Compuesto +  $\text{D}_2\text{O}$ ; 5: Compuesto +  $\text{NaN}_3$  0.4 M; 6: Compuesto + TMP 0.4 M; 7: Compuesto + DABCO 0.4 M; 8: Compuesto + KI 0.4 M; 9: Compuesto + Formiato sódico 0.4 M; 10: Compuesto + DMSO 0.4 M; 11: Compuesto + SOD

Respecto a los captadores de oxígeno singlete, TMP (carrera 6) no induce cambio significativo en el corte del ADN. Por otra parte, la azida sódica (carrera 5) y DABCO (carrera 7) inhiben el corte, indicando la participación del oxígeno singlete en el mecanismo de escisión del ADN.

En relación a los captadores del radical hidroxilo, el yoduro potásico (carrera 8) y el formiato sódico (carrera 9) inhiben el corte del ADN por completo, lo que indica la implicación de este radical en el mecanismo de ruptura del ácido nucleico. El DMSO (carrera 10) no produce cambios relevantes en el corte del ADN promovido por el compuesto.

La SOD (carrera 11) provoca un aumento del corte, lo que podría ser debido a que la SOD, como ya se ha explicado anteriormente, dismuta el anión superóxido dando lugar a peróxido de hidrógeno el cual sería el responsable de cortar el ADN.<sup>54</sup>

Los resultados para las disales **7a**, **7b** y **7c**, se muestran en la figura **IV.27**.



**Figura IV.27:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con las disales **7** ( $20 \mu\text{M}$ ),  $t_{\text{irradiación}} = 2\text{h}$ . 1: ADN control no irradiado; 2: ADN control irradiado; 3: Compuesto; 4: Compuesto +  $\text{D}_2\text{O}$ ; 5: Compuesto +  $\text{NaN}_3$  0.4 M; 6: Compuesto + TMP 0.4 M; 7: Compuesto + DABCO 0.4 M; 8: Compuesto + KI 0.4 M; 9: Compuesto + Formiato sódico 0.4 M; 10: Compuesto + DMSO 0.4 M; 11: Compuesto + SOD

La adición de  $\text{D}_2\text{O}$  (carrera 4) aumenta el corte del ADN promovido por el compuesto. La azida sódica y DABCO (carreras 5 y 7, respectivamente) inhiben claramente el corte del ADN. La adición de TMP (carrera 6) no produce ningún efecto significativo en el corte del ADN por parte del compuesto. Estos resultados, en conjunto, indican que el oxígeno singlete está implicado en el mecanismo de escisión.

En presencia de los captadores del radical hidroxilo KI y formiato sódico (carreras 8 y 9, respectivamente), se inhibe completamente la escisión del ADN, poniendo de manifiesto que el radical hidroxilo interviene en el mecanismo de escisión del mismo. El DMSO (carrera 10), no produce ningún efecto significativo en el corte del plásmido.

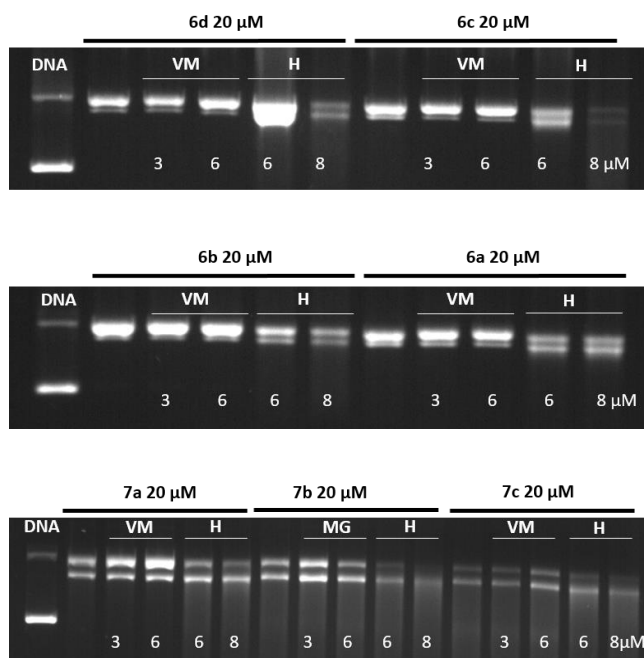


Por último, cabe destacar que la superóxido dismutasa (carrera 11) aumenta de manera significativa el corte del ADN, hecho que puede ser atribuido a la formación de peróxido de hidrógeno.<sup>54</sup>

Por tanto, podemos concluir que el mecanismo de corte de las disales es de tipo oxidativo, en el que las especies reactivas de oxígeno implicadas en el proceso son el radical hidroxilo, el oxígeno singlete y el peróxido de hidrógeno.

### **3.2.1 Mecanismo de Interacción en los Surcos del ADN**

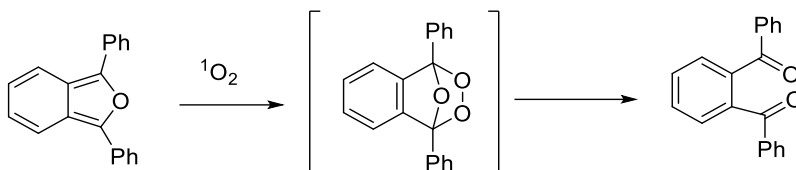
La interacción a través de los surcos de estas disales se estudió en las mismas condiciones que para las monosales (apartado **2.2.1**). Los resultados que se muestran en la figura **IV.28**, indican que estos compuestos, al igual que las monosales, interaccionan, preferentemente a través del surco menor, ya que el corte producido por el compuesto no se ve modificado en presencia de verde de metilo y, por el contrario, se ve afectado en presencia de Hoescht 33342.



**Figura IV.28:** Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 tratado con las disales **6** y **7** (20 μM). Todos los compuestos fueron irradiados durante un periodo de tiempo de 2 h. 1: ADN control; 2, 7 y 12: Compuesto + ADN; 3, 8 y 13: Compuesto + Verde Metilo 3 μM; 4, 9 y 14: Compuesto + Verde Metilo 6 μM; 5, 10 y 15: Compuesto + Hoescht 6 μM; 6, 11 y 16: Compuesto + Hoescht 8 μM.

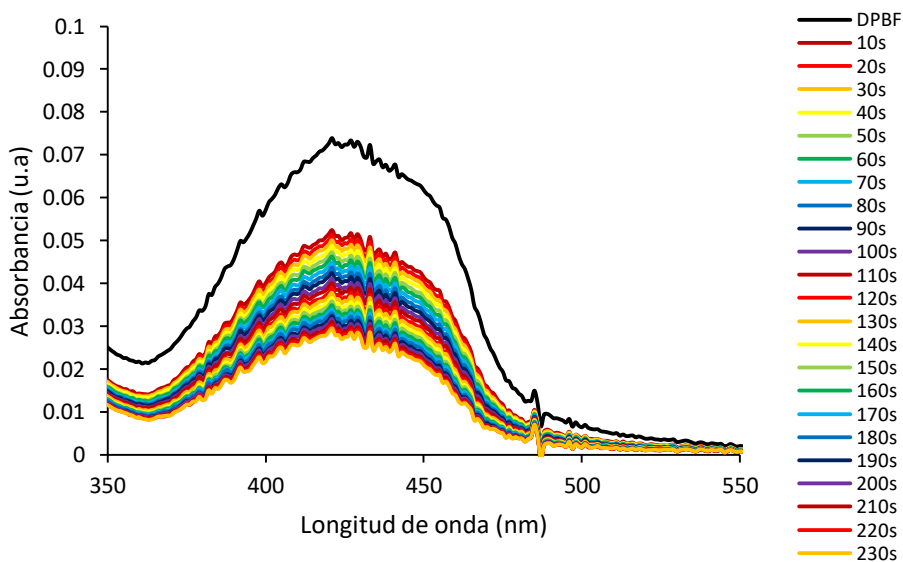
#### 4. VALORACIONES DE ABSORCIÓN ELECTRONICA CON DPBF

Para demostrar que las monosales y/o disales generan fotoquímicamente oxígeno singlete, se realizó un ensayo utilizando el 2,6-difenil dibenzo[c]furano (**DPBF**)<sup>55</sup> como captador de oxígeno singlete. Este compuesto es capaz de reaccionar con el oxígeno singlete dando lugar a una cicloadición 4+2 de tipo Diels-Alder y el aducto obtenido se rompe espontáneamente dando como producto una dicetona (Figura **IV.29**). El seguimiento de estas reacciones puede llevarse a cabo por UV en la zona de los 440nm.



**Figura IV.29:** Mecanismo de captación de oxígeno singlete por parte de DPBF

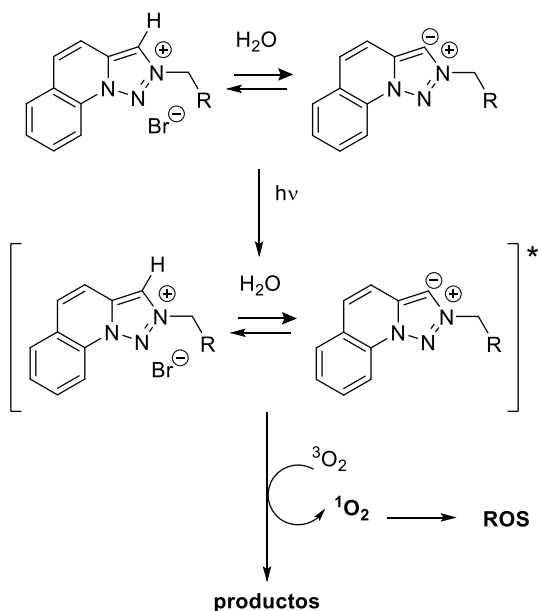
Así, cuando se realizó la experiencia con una relación [4e]:[DPBF] = 1:1 con una concentración 10 $\mu$ M en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM (pH =7.2), se observó la disminución de la banda a 440 nm en cada uno de los registros (registros cada 10 segundos). Los resultados se muestran en la figura IV.30. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado IV.6.5.



**Figura IV.30:** Espectro UV de 4e (10  $\mu$ m) en tampón fosfato 0.1 M, pH = 7.2 en presencia de DPBF.

Así pues, de acuerdo con la bibliografía,<sup>54</sup> este ensayo confirma la presencia de la formación de oxígeno singlete.

Por RMN se ha demostrado que para las monosales y disales de triazoloquinolinio existe un equilibrio entre la forma catiónica y su forma iluro. Estas dos especies en quilíbrio, una vez fotoactivadas serían las responsables de generar estas especies reactivas de oxígeno implicadas en el proceso de escisión del ADN. El mecanismo de formación de estas especies se resume en la siguiente figura.



**Figura IV.31.** Formación de ROS

## 5. CONCLUSIONES

1. Todos los compuestos actúan como nucleasas fotoinducidas muy eficientes.
2. En general, las monosales son más activas que las disales de triazoloquinolinio.
3. En vista de los resultados podemos establecer un orden de actividad nucleasa fotoinducida para las sales de triazoloquinolinio:
  - a. **4e > 4d**
  - b. **5a ~ 5b > 5c > 5d**
  - c. **6a > 6b > 6c > 6d**
  - d. **7c > 7a ~ 7b**
4. Los resultados demuestran que, según aumenta el número de carbonos en la cadena alifática, disminuye la capacidad nucleolítica de los compuestos.
5. Se ha demostrado que, tanto para las monosales como para las disales, no existe una relación directa entre la actividad fonucleasa y su afinidad por el ADN.
6. El mecanismo de fotoescisión es de tipo oxidativo, en el que las especies implicadas son el radical hidroxilo, el oxígeno singlete y el peróxido de hidrógeno, tanto para las monosales como para las disales de triazoloquinolinio.
7. Los compuestos **4**, **5**, **6** y **7**, interaccionan preferentemente en el surco menor del ADN.
8. La capacidad de actuar como una nucleasa fotoactiva, según los resultados derivados de los ensayos a distintas fuerzas iónicas, no dependen del modo de interacción de estos compuestos.

## **6. PARTE EXPERIMENTAL**

### **6.1. Fotoescisión del ADN**

La rotura fotoinducida del ADN pUC18 por los compuestos se estudió mediante la electroforesis en gel de agarosa.

La disolución stock del compuesto a ensayar se preparó en tampón fosfato pH = 7.2 (1 mM, 2 mM NaCl). Las muestras se prepararon mezclando 13.5  $\mu$ L de tampón fosfato pH = 7.2 (1 mM fosfato, 2 mM NaCl), 0.5  $\mu$ L de pUC18 (0.25  $\mu$ g/ $\mu$ L) (Thermo scientific) y 6  $\mu$ L de la disolución intermedia de compuesto a concentraciones crecientes para obtener concentraciones finales entre 5-100  $\mu$ M. Las muestras de ADN control se prepararon mezclando 19.5  $\mu$ L de tampón fosfato 2 mM y 0.5  $\mu$ L de pUC18 (0.25  $\mu$ g/ $\mu$ L). Las reacciones se llevaron a cabo en condiciones de luz usando lámparas de luz UV ( $\lambda_{\text{máx}} = 365 \text{ nm}$ ) (Luzchem Research, Inc.). Las muestras en viales eppendorf fueron fotoexpuestas durante 2h, y aquellas muestras que no fueron fotoirradiadas se mantuvieron a 37 °C en oscuridad.

Trascurridas las 2 h, se añadieron a las diferentes muestras 4  $\mu$ L de tampón de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% colorante cianol xileno, 30% glicerol), las cuales finalmente se cargaron en un gel de agarosa 0.8% en tampón TBE 0.5% (0.045M tris, 0.045 M ácido bórico y 1 mM EDTA) conteniendo 2  $\mu$ L/100 mL de una disolución de bromuro de etidio (10 mg/mL). La electroforesis se realizó en oscuridad a 80 V durante 2h. Las bandas se visualizaron con luz UV y se fotografiaron en una impresora de captura de gel TDI plus.

Las cantidades relativas de ADN superenrollado, circular y lineal se cuantificaron mediante análisis de densimetría usando el software ImageJ 1.34s.

### **6.2. Influencia de la Fuerza Iónica en la Actividad Nucleasa**

El estudio de la influencia de la fuerza iónica en la actividad fonucleasa de las sales de triazoloquinolinio, se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa.

Las disoluciones stock de los compuestos se prepararon en tampón fosfato 1 mM, NaCl 5 mM y tampón fosfato 1 mM, NaCl 5 mM a pH = 7.2.

Las muestras se prepararon mezclando 13.5  $\mu$ L del tampón fosfato correspondiente (NaCl 2 o 5 mM), 0.5  $\mu$ L del plásmido pUC18 (0.25  $\mu$ g/  $\mu$ L) (Thermo Scientific) y 6  $\mu$ L de la disolución de compuesto para una concentración de 10  $\mu$ M para las monosales y 20  $\mu$ M para las disales. Las muestras de ADN control se prepararon mezclando 19.5  $\mu$ L de tampón fosfato (NaCl 2 o 5 mM) y 0.5  $\mu$ L de pUC18 (0.25  $\mu$ g/  $\mu$ L).

Todas las muestras en viales eppendorf fueron irradiadas usando una lámpara de luz UV ( $\lambda_{\text{máx}} = 365 \text{ nm}$ ) (Luzchem Research, Inc.) durante 2 h. A continuación, las muestras se trataron como se detalla en el apartado 5.1.

### **6.3. Mecanismo de Fotoescisión del ADN**

Para probar la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante el proceso de ruptura del ADN, se añadieron captadores de especies reactivas de oxígeno a las mezclas de reacción antes de la exposición a la luz. Los captadores utilizados fueron 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (0.4 M), 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano (DABCO) (0.4 M), ácido 4,5-dihidroxi-1,3-bencenosulfónico (Tiron) (10 o 15 mM), formiato sódico (0.4 M), ioduro potásico (0.4 M), DMSO (0.4 M) y azida sódica (0.4 M). Para los experimentos de D<sub>2</sub>O, se utilizó este disolvente para la dilución de la muestra hasta un volumen de 20  $\mu$ L. Las muestras se trataron como se describe en el apartado **VII. 6.1**.

#### **6.4. Mecanismo de Interacción en los Surcos del ADN**

Para estudiar la posible interacción ADN-compuesto, se añadieron a la mezcla de reacción compuestos que interaccionan en el surco mayor y menor del ADN. En este caso, se añadió verde de metilo (3 o 6  $\mu\text{M}$ ), el cual interacciona en el surco mayor y Hoescht 33342 (6 u 8  $\mu\text{M}$ ) el cual interacciona en el surco menor. Las muestras se trataron como se indica en el apartado **VII. 6.1.**

#### **6.5. Valoraciones de absorción electrónica con DPBF**

El espectro UV-Visible de las muestras fueron registrados a 25 °C en un espectrofotómetro de UV-Visible Agilent 8453 equipado con un Peltier controlador de la temperatura de célula simple (Agilent 89090A).

Las valoraciones de absorción electrónica se realizaron mediante la adición de DPBF a una disolución del compuesto a una concentración fija (10  $\mu\text{M}$ ). Las muestras se prepararon en tampón fosfato pH = 7.2 (1 mM fosfato, 2 mM NaCl). Los espectros se registraron cada 10 segundos.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. F. Mancin, P. Scrimin, P. Tecilla, U. Tonellato, *Chem. Commun.* **2005**, 2540
2. W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089
3. M. Komiyama, J. Sumaoka, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 751
4. N. H. Williams, B. Takasaki, M. Wall, J. Chin, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 485
5. E. L. Hegg, J. N. Burstyn, *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *173*, 133
6. J. A. Cowan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 634
7. C. Liu, M. Wang, T. Zhang, H. Sun, *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 147
8. L. J. K. Boerner, J. M. Zaleski, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 135
9. C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109
10. Q. Jiang, N. Xiao, P. Shi, Y. Zhu, Z. Guo, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1951
11. D. S. Sigman, D. R. Graham, V. D'Aurora, A. M. Stern, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 12269
12. A. Sitlani, E. C. Long, A. M. Pyle, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2303
13. I. H. Goldberg, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 191
14. K. Szacilowski, W. Macyk, A. Drzewiecka-Matuszek, M. Brindell, G. Stochel, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 2647
15. R. Bonnett, *J. Heterocycl. Chem.* **2002**, *39*, 455
16. Y. N. Konan, R. Gurny, E. Allémann, *J. Photo. Photobiol. B Biol.* **2002**, *66*, 89
17. J. F. Lovell, T. W. B. Liu, J. Chen, G. Zheng, *Chem. Rev.* **2010**, *40*, 340
18. M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi, R. K. Pandey, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 340
19. N. Paillous, P. Vicendo, *J. Photo. Photobiol. B Biol.* **1993**, *20*, 203
20. B. Armitage, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1171
21. S. L. H. Higgins, K. J. Brewer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11420

22. J. R. Hwu, S-C. Tsay, S. C. Hong, Y-j. Leu, C-F. Liu, S-S. P. Chou, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2957
23. P. Zhao, L-C. Xu, J-W. Huang, B. Fu, H-C. Yu, W-H. Zhang, J. Chen, J-H. Yao, L-N. Ji, *Bioorg. Chem.* **2008**, *36*, 278
24. Q. Yang, P. Yang, X. Qian, L. Tong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6210
25. R. Adam, P. Bilbao-Ramos, B. Abarca, R. Ballesteros, M. E. González-Rosende, M. A. Dea-Ayuela, F. Estevan, G. Alzuet-Piña, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 4903
26. A. J. Prussin II, D. F. Zigler, A. Jain, J. R. Brown, B. S. J. Winkel, K. J. Brewer, *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102*, 731
27. D. S. Sigman, C. B. Chen. *Annu. Rev. Biochem.*, **1990**, *59*, 207
28. S. Dong, H-M. Hwang, C. Harrison, L. Holloway, X. Shi, H. Yu, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2000**, *64* (4), 467
29. V. Murray, R. F. Martin, *Nucleic Acid Res.*, **1994**, *22* (3), 506
30. H. Yu, S. Dong, P. P. Fu, H-M. Hwang, *Polycyclic Aromatic Compounds*, **2002**, *22*, 861
31. J. L. García-Giménez, J. Hernández-Gil, A. Martínez-Ruíz, A. Castiñeiras, M. Liu-González, F. V. Pallardó, J. Borrás, G. Alzuet-Piña, *J. Inor. Biochem.*, **2013**, *121*, 167
32. J. Stubbe, J. W. Kozarich, W. Wu, D. E. Vanderwall, *Acc. Chem. Res.*, **1996**, *29* (7), 322
33. B. Halliwell, O. I. Aruoma, *FEBS Lett.*, **1991**, *281*, 9
34. S. Steenken, *Chem. Rev.*, **1989**, *89*, 503
35. T. A. Dix, K. M. Hess, M. A. Medina, R. W. Sullivan, S. L. Tilly, L. L. T. Webb. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 4578
36. P. Richterich, N. D. Lakey, H. M. Lee, J. Mao, D. Smith, G. M. Church, *Nucleic Acids Res.*, **1995**, *23*, 4922

37. K. Yamamoto, S. Inoue, A. Yamazaki, T. Yoshinaga, S. Kawanishi, *Chem. Res. Toxicol.*, **1989**, *2*, 234
38. R. Cejudo, G. Alzuet-Piña, M. González-Álvarez, J.L. García-Giménez, J. Borrás, M. Liu-González. *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, *100*, 70
39. M. González-Álvarez, G. Alzuet-Piña, L. Del Castillo, J. Borrás, M. Liu-González. *J. Inorg. Chem.*, **2006**, 3823.
40. J. L. Sagripanti, K. H. Kraemer, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *25*, 1729
41. B. Macías, I. García, M. V. Villa, J. Borrás, M. González-Álvarez, A. Castiñeiras, *J. Biochem.*, **2003**, *96*, 367
42. C. A. Detmer III, F. V. Pamatong, J. R. Bocarsly, *J. Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 6292
43. R. W. Miller, F. D. Macdowall, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1975**, *387*, 176
44. T. S. Frey, H. H. J. Sun, N. N. Murphy, K. D. Karlin, *Inorg. Chim. Acta.*, **1996**, *242*, 329
45. B. G. Que, K. M. Downey, A. G. So, *Biochemistry*, **1980**, 5987
46. H. Sies, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *215*, 213
47. X-L. Yang, A. H. J. Wang, *Pharmacology & Therapeutics*, **1999**, *83*, 181
48. C. Bailly, J. B. Chaires, *Bioconjugate Chem.*, **1998**, *9*, 513
49. S. Y. Breusegem, R. M. Clegg, F. Loontjens, *J. Mol. Biol.*, **2002**, *315*, 1049
50. H. H. Karloon, P. Lincoln, G. Westman, *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 1035
51. B. Meunier, S. Frau, J. Bernadou, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1996**, *133*, 1053
52. S. K. Kim, B. Nordén, *FEBS*, **1993**, *315*, 61
53. K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, *Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra*, **2008**, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey
54. M. González Álvarez. Tesis Doctoral, Diseño, Síntesis y Caracterización de Compuestos de Coordinación de Nuevas Sulfonamidas N-sustituidas con Actividad Biológica. Universitat de València, **2002**.

55. Y. You, W. Nam, *Chem. Sci.*, **2014**, *5*, 4123



## **CAPÍTULO V**

### **ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE SALES DE TRIAZOLOQUINOLINIO Y TRIAZOLOPIRIDINIO**

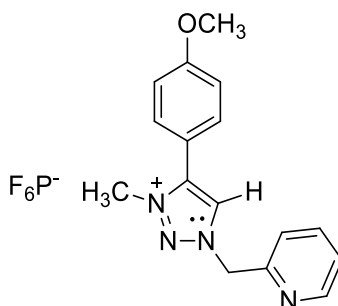


## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En el capítulo III de este trabajo se ha demostrado la interacción electrostática y la interacción parcial con el ADN de las monosales **4d-e** y **5a-d** y las disales **6b-d** y **7b-c**, siendo éstas últimas las que interaccionan más fuertemente.

Además de la interacción electrostática a través de los surcos, estos compuestos también han mostrado tener actividad nucleasa, siendo capaces de romper el ADN y transformarlo en pequeños fragmentos. Teniendo en cuenta estos resultados, se consideró interesante el estudio de su posible actividad antitumoral.

Recientemente se han descrito sales de 1,2,3-triazolio con este tipo de actividad.<sup>1-4</sup> El hexafluorofosfato de 4-(4-metoxifenil)-3-metil-1-(2-picolil)-1H-1,2,3-triazol-3-io (**A**) resultó ser el compuesto más activo (Figura **V.1**).

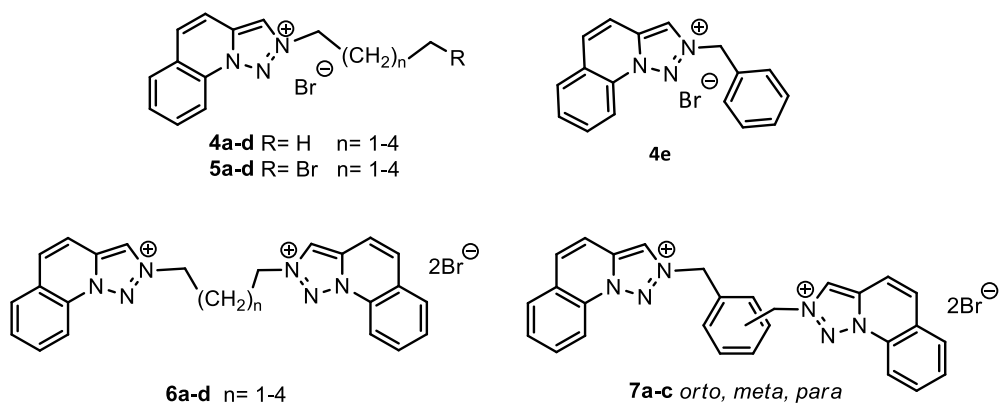


**Figura V.1:** Hexafluorofosfato de 4-(4-metoxifenil)-3-metil-1-(2-picolil)-1H-1,2,3-triazol-3-io

Además de presentar interacción electrostática con el ADN, este compuesto produce una parada del ciclo celular en la fase G1, así como la inducción de apoptosis. Probablemente, este tipo de compuestos generan especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden ser las responsables de su actividad antitumoral.

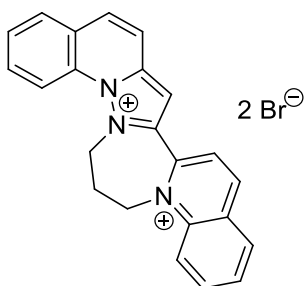


Si comparamos la estructura del compuesto (**A**) con la estructura de las monosales de triazoloquinolinio **4d-e** y **5a-d**, podemos observar una gran analogía estructural, por lo que podrían tener una actividad biológica semejante. Las disales de triazoloquinolinio **6a-d** y **7a-d** también presentan características estructurales análogas (Figura **V.2**), aunque al ser especies dicatiónicas y de mayor tamaño es posible que tengan dificultad para atravesar la membrana citoplasmática y presentar actividad antitumoral.



**Figura V.2:** Monosales y disales de triazoloquinolinio

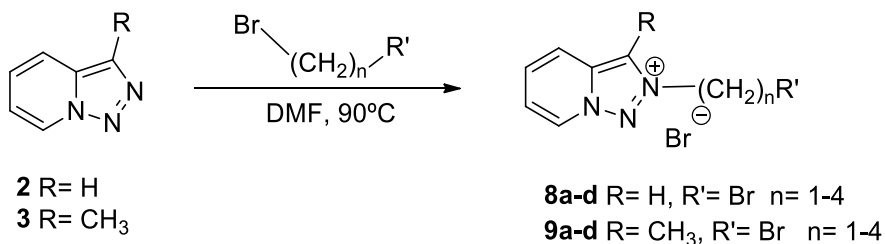
Por otra parte, las disales de triazoloquinolinio pueden relacionarse con los diquats descritos por Zysman,<sup>5</sup> (Figura **V.3**) los cuales presentan actividad antitumoral frente a células HT-29 (de adenocarcinoma de colon).



**Figura V.3:** Diquat descrito por Zysman activo frente a células de adenocarcinoma de colon HT-29

Por todo ello, el objetivo de este capítulo es un estudio preliminar de la potencial actividad antitumoral de los compuestos descritos en el capítulo II **4a-e**, **5a-d**, **6a-d** y **7a-c**.

También, con fines comparativos, se ha estudiado la actividad antineoplásica de las monosales de triazolopiridina **8a-8d** y **9a-9d**, que se han sintetizado durante el desarrollo de este capítulo a partir de la [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina **2** y de la 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina **3**. (Esquema V.I) (ver parte experimental).



**Esquema V.I:** Síntesis de monosales de triazolopiridinio.

## **2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

### **2.1. Biología del cáncer**

#### **Definición y Epidemiología**

El cáncer es una denominación genérica que engloba un gran número de diferentes patologías. Todas estas enfermedades tienen como principal característica común la división celular descontrolada. Además, en muchos casos las células tumorales adquieren la capacidad de invadir los tejidos adyacentes y distantes diseminándose a través de los vasos linfáticos y sanguíneos.

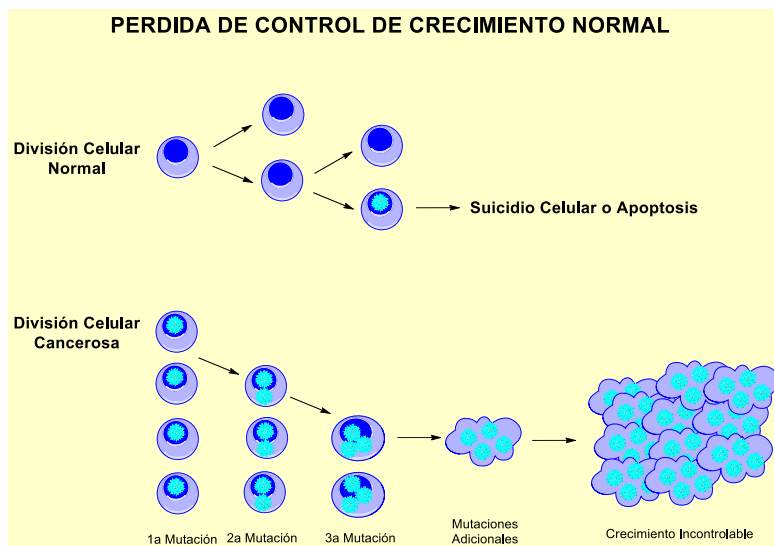
Según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), el número total de nuevos casos de cáncer en el año 2017 fue de 228.482, de los cuales 133.601 fueron en hombres y 94.881 en mujeres. Los cánceres más frecuentes siguen siendo el colorrectal con una incidencia del 15%, próstata (13%), pulmón (12.5%), mama (11.5%) y vejiga (6.4%). Para 2035 se estima que habrá 315.413 nuevos casos de cáncer en España.<sup>6</sup>

#### **Origen y evolución del cáncer**

Las células normales se dividen de forma controlada. Cuando en una célula normal se acumulan sucesivas mutaciones que no pueden ser reparadas por los mecanismos propios de la célula, se activa la muerte celular programada o apoptosis. Las células cancerosas desarrollan mutaciones que cuando son reparadas adecuadamente les

confieren una elevada resistencia a la apoptosis. El cáncer aparece debido a la acumulación de errores en los mecanismos encargados de controlar el equilibrio entre la proliferación y muerte celular en respuesta a factores de crecimiento, factores de inhibición de la proliferación y factores que promueven la muerte celular.

Estos errores dan lugar a alteraciones genéticas y epigenéticas que van desde mutaciones puntuales hasta grandes aberraciones cromosómicas (Figura V.4), dando lugar a la activación de determinados oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores,<sup>7</sup> y alteraciones de la expresión de microARNs (pequeñas secuencias de ARN no codificante que pueden actuar como oncogenes y/o genes supresores de tumores).<sup>8</sup>



**Figura V.4:** División celular de una célula normal y de una célula cancerosa

Por tanto, el cáncer es el resultado del crecimiento desorganizado y descontrolado de aquellas células con mecanismos de control defectuoso, lo que da lugar a la formación de una masa de tejido anormal conocido como tumor.

El cáncer se extiende a los tejidos y órganos adyacentes a través de un proceso de invasión, migración e infiltración directamente a las áreas colindantes. Este proceso se conoce como invasión local.

Además de la invasión local, las células tumorales pueden migrar a través de los vasos sanguíneos dando lugar a una diseminación directa o a través del sistema linfático, lo que da lugar a una diseminación indirecta, y viajar a través del torrente hasta llegar a otros órganos o tejidos. Este proceso se conoce como metástasis y los nuevos focos o tumores se denominan tumores secundarios.

### **Causas del cáncer**

El cáncer, como ya se ha explicado anteriormente, es una enfermedad que tiene su origen en la adquisición de mutaciones en el ADN y/o fallos en los mecanismos de regulación del mismo que resultan en una proliferación celular incontrolada.

Cualquier fenómeno carcinógeno, como la radiación ultravioleta (UV) e ionizante (rayos X), agentes intercalantes y alquilantes y radicales libres,<sup>9</sup> capaz de dañar los genes puede causar cáncer. Pero para que la célula se convierta en cancerosa tiene que existir daño en varios genes en la misma célula. Los genes alterados forman parte de procesos característicos inherentes a la propia formación del cáncer.

Para el desarrollo tumoral, la desregulación de las señales que controlan el crecimiento celular, no son suficientes. Es necesario superar ciertos mecanismos de control como la muerte celular programada o la respuesta inmunológica. De este modo, tanto el desarrollo inicial como la consecuente expansión y progresión del cáncer, necesitan adaptarse a la inestabilidad y mutación del genoma además de promover la inflamación por parte del tumor. Así, las células tumorales mantienen un potencial proliferativo descontrolado y acelerado a pesar de los diferentes

mecanismos de control del organismo. Existe una gran variabilidad inter e intratumoral entre las células tumorales, pero tienen ciertas características comunes imprescindibles para el crecimiento tumoral. Estas características se definieron en 2000 y fueron revisadas en 2011 por D. Hanahan y R. A. Weinberg, las cuales se recogen en la figura V.5.<sup>10</sup>



**Figura V.5:** Características del cáncer. Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011

Si hay angiogénesis, aumentará la probabilidad de metástasis y por tanto la formación de tumores secundarios en otros órganos o tejidos. Por lo que los tejidos más vulnerables serán aquellos que produzcan factores de crecimiento y generen tejido vascular nuevo con mayor facilidad.

## **2.2. Genes causantes de tumores**

Las alteraciones en los programas celulares implicados en el cáncer se deben a daños en el material genético de la célula. Y es la mutación, deleción o duplicación de varios grupos de genes las que están implicadas en el inicio del cáncer. Muchos de estos genes codifican proteínas reguladoras de la proliferación o de la muerte celular por apoptosis, entre otros procesos.

### **Proto-oncogenes**

Los proto-oncogenes son genes normales implicados en el crecimiento normal de las células. La alteración de estos genes, como por ejemplo la deleción del dominio de regulación, como puede ser el caso en del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), genera oncogenes.

En definitiva, un oncogén es aquel proto-oncogén que está alterado y se expresa de manera anormal, y, por tanto, contribuye al desarrollo neoplásico. Es decir, los oncogenes son en parte, responsables de la transformación de una célula normal en una célula maligna.

### **Genes supresores de tumores**

En contraposición, existen los genes supresores de tumores que codifican genes implicados en procesos tales como reparación del ADN o la inhibición de proliferación. Por ello su inactivación mediante mutación puntual o deleción génica contribuye a promover la división celular o a la supervivencia celular en presencia de daño al ADN. Los genes supresores de tumores también se conocen como antioncogenes.

Por tanto, los genes supresores de tumores son aquellos que disminuyen la probabilidad de que una célula se transforme en cancerígena ya que inhiben la proliferación celular descontrolada.

Cuando los genes que codifican proteínas reparadoras del ADN no funcionan correctamente, se produce una acumulación de mutaciones en la célula que incrementa la probabilidad en la formación de un proceso neoplásico.

### **2.3. Ciclo celular**

El ciclo celular es un proceso altamente regulado que conduce al crecimiento de la célula y a su posterior división que dará como resultado dos células hijas genéticamente idénticas.

La función del ciclo celular no es solo la división celular sino la de asegurar que el proceso se realice correctamente, para eso existen diversos puntos de control internos (*checkpoints*) con tal de evitar la posible generación de células con múltiples errores en su material genético.

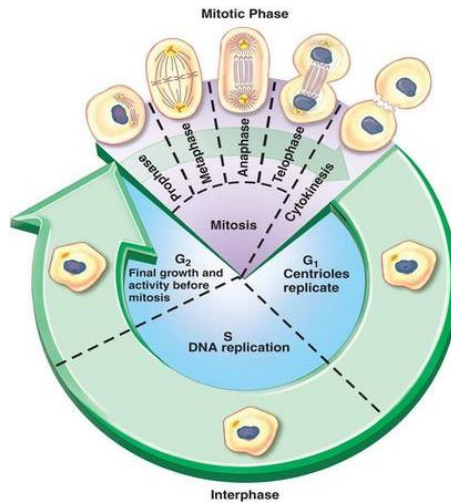
Este proceso se divide en dos fases funcionales: La síntesis del ADN o fase S y la fase M o mitosis, separadas a su vez por dos fases reguladoras G1 i G2 (del inglés Gap) (Figura V.6), en el siguiente orden secuencial: G1, S, G2 y M.

1. Fase G1: Etapa comprendida entre el final de la última división y el inicio de la fase S. En esta etapa la célula aumenta su tamaño y se produce la síntesis de proteínas. La carga genética en esta fase es diploide ( $2n$ ). Y al final de la etapa se encuentra el punto de restricción o R, en el cual se realiza un control para asegurar que la célula está lista para continuar el ciclo. Llegados a este punto, la célula puede seguir dos vías, si está preparada, continuará en el



ciclo y se dividirá o en caso contrario permanecerá arrestada en fase G1 y eventualmente entrará en la denominada quiescencia o fase G0.

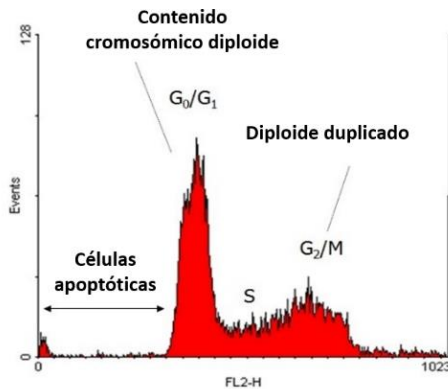
2. Fase S: En esta fase tiene lugar la síntesis del ADN, donde la célula replica su material genético. Como resultado cada cromosoma se duplica y está formado por dos cromátidas idénticas. Como consecuencia de la duplicación del material genético, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y ADN.
3. Fase G2: Continúa la síntesis de proteínas y ARN. La célula empieza a prepararse para la mitosis y el material genético se dispone en los polos celulares, al tiempo que la célula comprueba que la replicación del ADN se ha producido correctamente
4. Fase M: Etapa en la que se produce la división en dos células. Esta etapa se conoce como Mitosis y está asimismo subdividida en las siguientes fases:
  1. Profase: El material genético se condensa en forma de cromosomas. En esta etapa también se pierde la envoltura nuclear.
  2. Pro-Metafase: Reorganización de los cromosomas.
  3. Metafase: Los cromosomas se unen a los microtúbulos mediante en cinetocoro. Los cromosomas se disponen en la célula de manera que forman la placa ecuatorial.
  4. Anafase: Los cromosomas se separan y cada cromátida se desplaza a un polo de la célula gracias al huso mitótico.
  5. Telofase: El huso mitótico desaparece y la membrana nuclear empieza a formarse envolviendo las cromátidas hijas.
  6. Citocinesis: Esta es la última etapa del ciclo, donde se da la separación física del citoplasma en dos células hijas.



**Figura V.6:** Fases del ciclo celular

[https://www.blendspace.com/lessons/BLHLWz5tBh\\_FhA/cell-cycle-virtual-investigation](https://www.blendspace.com/lessons/BLHLWz5tBh_FhA/cell-cycle-virtual-investigation)

El análisis de una población celular en estado proliferativo puede seguirse mediante un marcaje del material genético, típicamente con sondas fluorescentes y su posterior análisis. Las células quiescentes y las células en fase G<sub>1</sub> del ciclo, solo poseen una copia de ADN, por tanto, tendrán una fluorescencia equivalente a 1X. Sin embargo, las células en fase G<sub>2</sub>/M tienen dos copias de ADN y por tanto el marcaje fluorescente equivaldrá a 2X. Finalmente, las células en fase S del ciclo, que están sintetizando el ADN, tendrán valores comprendidos entre 1X y 2X (Figura V.7).



**Figura V.7:** Histograma del ciclo celular (Imagen obtenida de la tesis doctoral de Ruth Villalonga Planells)

### Puntos de control o *Checkpoints*

El principal punto de control del ciclo celular es el punto de restricción en la transición G1/S. Tras la salida de la mitosis las células pueden entrar en un estado quiescente (fase G<sub>0</sub>) o continuar en G<sub>1</sub> ante la presencia de señales mitógenas como factores de crecimiento. Esta señalización aumenta los niveles de las ciclinas D y E, y la formación de los complejos ciclina D-CDK4/6 y E-CDK2 que favorecen el paso de este punto control, punto de no retorno a partir del cual se produce la progresión del ciclo celular de manera autónoma, sin necesidad de señalización mitógena.

Sin embargo, existen otros controles no activos durante el ciclo, que son inducidos únicamente cuando se detectan defectos en los eventos centrales del mismo. Estos mecanismos de control, conocidos como *checkpoints*, son vías de señalización que aseguran la estabilidad, la correcta replicación y la distribución del material genético en las células. Los principales *checkpoints* descritos en células de mamíferos son los de daño al ADN,<sup>11,12</sup> operativo durante las fases S y G<sub>2</sub>, y el llamado *checkpoint* de ensamblaje del huso mitótico durante la mitosis.<sup>13</sup>

## **2.4. Muerte celular programada: Apoptosis**

Kerr y Wyllie definieron la apoptosis como una muerte celular regulada basada en la observación de los cambios morfológicos que sufrían las células, y que, a diferencia de la necrosis, no se producía liberación del contenido citoplasmático al exterior.<sup>14</sup>

La apoptosis se trata de un proceso activo programado genéticamente y conservado evolutivamente el cual resulta imprescindible para el desarrollo normal de los órganos, la remodelación de tejidos, la respuesta inmune y la supresión tumoral. Por ejemplo, durante la embriogénesis las células de las regiones interdigitales entran en apoptosis, lo que ocasiona la formación de dedos, manos y pies. Por tanto, podemos decir que la apoptosis es un proceso crucial para el mantenimiento de la homeostasis.<sup>15</sup>

La desregulación de la apoptosis está asociada tanto a la iniciación y progresión de la tumorigénesis, como al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, autoinmunes o neurodegenerativas.<sup>16</sup> Por su desregulación en el proceso tumorigénico, en ocasiones asociada a la resistencia de los tratamientos, puede considerarse una barrera natural al desarrollo del cáncer, por lo que es necesario el estudio de las vías de señalización como potenciales dianas para solucionar la ineficacia de determinados tratamientos.<sup>17</sup>

## **Fases de la apoptosis**

Durante el proceso de apoptosis se pueden diferenciar tres fases. En la fase iniciadora intervienen tanto factores fisiológicos como estímulos externos a la célula, como, por ejemplo, la pérdida de contacto con el entorno, la detección del daño intracelular o la contradicción de señales de división celular. Estos factores pueden desencadenar el proceso de apoptosis. A esta fase le sigue la fase integradora, momento en el cual se produce la activación de las caspasas y el proceso se vuelve irreversible. Por último, la fase ejecutora, en la cual se dan cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis.<sup>18</sup>

## **Efectores intracelulares de la apoptosis: Caspasas**

Las caspasas son una familia de proteasas conservada evolutivamente que tienen un residuo de cisteína que actúa como núcleo catalítico el cual permite la ruptura de otras proteínas que contienen residuos de ácido aspártico. Por tanto, las caspasas son cisteína-proteasas específicas de ácido aspártico.<sup>19</sup>

Estas proteasas se expresan en forma de zimógenos (enzimas inactivas o pro-caspasas). Estas pro-caspasas son proteínas de cadena simple que constan de un predominio N-terminal (dominio de muerte o DD) muy variable en cuanto a funciones de regulación y activación, y una unidad catalítica que se divide en dos subunidades.<sup>20</sup>

Las caspasas se clasifican en dos subfamilias, según su función, en inflamatorias (-1, -4, -5, -11, -12, -13 y -14) y apoptóticas. Las caspasas apoptóticas se clasifican a su vez en caspasas iniciadoras (-2, -8, -9 y -10) y efectoras o ejecutoras (-3, -6 y -7).

### *Vías de señalización del proceso apoptótico*

Según el estímulo apoptótico, su regulación se realiza a través de dos vías de señalización diferenciadas, pero no excluyentes, la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca o vía iniciada por receptores de muerte. Ambas vías convergen en la activación de las caspasas que median rápidamente el desmantelamiento de la estructura celular.<sup>21</sup>

#### Vía Extrínseca

La activación de las caspasas por la vía extrínseca se inicia por la unión de ligandos específicos a receptores de muerte de la membrana celular. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor de TNF (TNFR, Tumor Necrosis Factor Receptor), con un dominio común extracelular rico en cisteínas y la presencia de un dominio intra-citoplasmático de transducción de señales desde el receptor con el resto de la maquinaria apoptótica.

Los ligandos que pueden unirse a los receptores de muerte incluyen el TNF $\alpha$ , Fas Ligand y el *TNF-related apoptosi-inducing ligand* (TRAIL).<sup>22</sup> Una vez se da la unión ligando-receptor, la señal producida se transmite intracelularmente mediante el acoplamiento del *death-inducing signaling complex* (DISC). La agregación de estos complejos da lugar a cambios conformacionales en las moléculas que lo componen desencadenando así la actividad catalítica de las caspasas iniciadoras 8 y 10, la cual promueve la cascada de activación de las caspasas efectoras 3 y 7 (Figura **V.8**).<sup>23</sup>

#### Vía intrínseca o vía mitocondrial

La principal vía de activación de las caspasas es la vía intrínseca, en la que la mitocondria juega un papel fundamental.<sup>24</sup> Esta vía responde a cualquier tipo

estímulo externo o interno, como agentes citotóxicos, radiación UV, hipoxia, especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno, infecciones víricas, activación de oncogenes, deficiencia de factores de crecimiento, citoquinas o cierto tipo de hormonas.<sup>25</sup> En general, la vía intrínseca de la apoptosis se activa en respuesta al estrés celular. Estos estímulos proapoptóticos modifican ciertos componentes celulares que actúan como sensores y transmiten la señal de muerte celular a la mitocondria. La permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP, de *mitochondrial outer membrane permeabilization*) es un paso crucial en esta cascada. La MOMP implica la salida de proteínas proapoptóticas desde el espacio intermembrana mitocondrial lo que activará las caspasas iniciadoras y por tanto la apoptosis.<sup>26,27</sup>

Bcl-2 es una familia de proteínas que regulan procesos de permeabilización mitocondrial, por lo que estas proteínas son imprescindibles en la vía intrínseca de la apoptosis. A diferencia de otros oncogenes, Bcl-2 no está implicada en la proliferación celular, sino en el bloqueo de la muerte celular, en concreto, en la inhibición de los procesos de contracción citoplasmática, condensación nuclear, desorganización de la membrana plasmática y ruptura endonucleolítica del ADN.

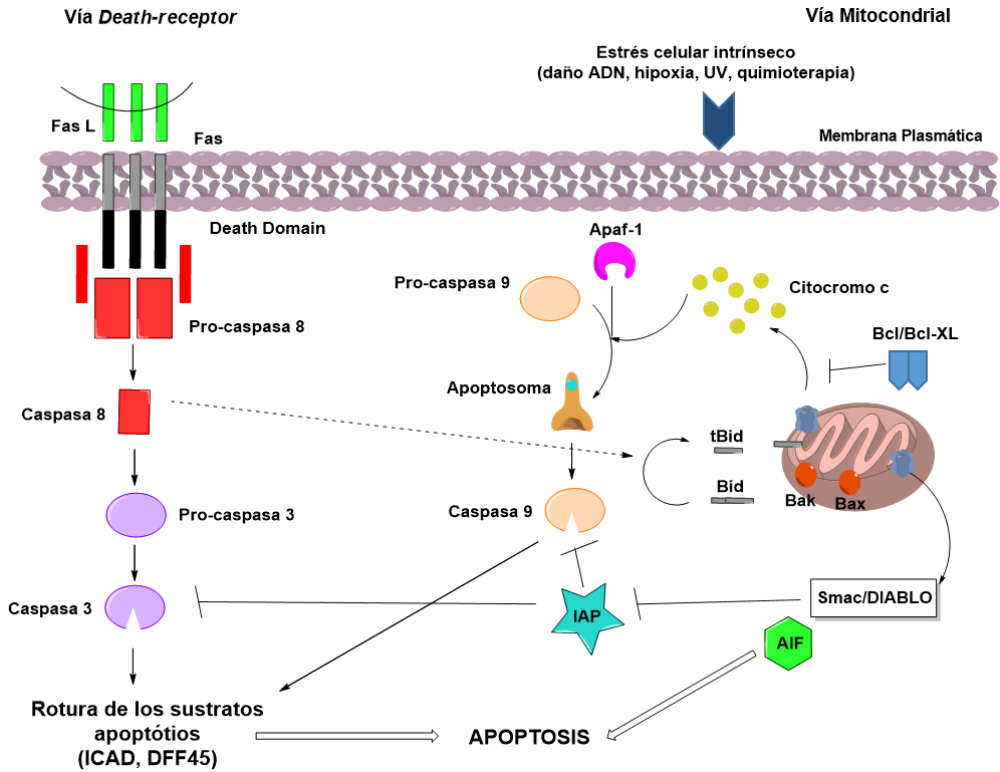
Debido a que Bcl-2 evita la muerte celular, una sobreexpresión dará lugar al aumento de la supervivencia celular, de esta manera las células podrían sufrir nuevas mutaciones en los genes supresores de tumores y en otros genes implicados en la aparición de tumores.<sup>28</sup>

La membrana externa de la mitocondria tiene en su estructura canales aniónicos dependientes de voltaje, sin embargo, el espacio intermembrana contiene moléculas como el citocromo C, ciertas procaspasas, (DIABLO, *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases* o Smac) y el factor inductor de la apoptosis (AIF). Una

vez se activa el MOMP, se libera un gran número de sustratos desde el interior de la mitocondria al citoplasma celular. El citocromo C se unirá a los dominios auto-inhibitorios de la proteína APAF-1 (*apoptotic protease activating factor*) y (d)ATP en el citosol, provocando la oligomerización de APAF-1, que se conoce como apoptosoma. Este apoptosoma activa la caspasa 9 a través de un modelo de conformación inducida y la consiguiente activación de la caspasa 3.

Cuando se liberan el AIF y Smac/Diablo, se inhibe la función antiapoptótica de diferentes IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*) y contrarrestan la inhibición de las caspasas. Además, AIF, EndoG (endonucleasa G) y HtrA2 (serín proteasa) pueden activar la apoptosis independientemente de las caspasas, AIF y EndoG por su translocación al núcleo y mediación de la fragmentación del ADN y Omi/HtrA2, por su actividad serina proteasa (Figura **V.8**).<sup>19,21,29</sup>





**Figura V.8:** Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis

## 2.5. Tratamiento oncológico

Actualmente el arsenal terapéutico para los distintos tipos de cáncer va desde los tratamientos convencionales, como la cirugía, radioterapia, y quimioterapia, hasta la terapia dirigida con fármacos “de diana” específicos para oncoproteínas tumorales, complementado así mismo con otras herramientas como la terapia hormonal y la inmunoterapia. La elección de los diferentes tratamientos dependerá de factores del propio tumor, como tipo, localización, estadio, así como del estado del paciente. Por ejemplo, la cirugía puede utilizarse en caso de tumores sólidos, por

el contrario, para cánceres oncohematológicos como la leucemia, este tipo de terapia no será efectiva. La radioterapia puede ser útil para disminuir el tamaño del tumor e impedir el crecimiento del mismo. Y los fármacos antineoplásicos impiden el desarrollo, crecimiento y proliferación de las células cancerosas.

Por tanto, una de las opciones terapéuticas que más se utilizan es una combinación de cirugía y radioterapia, quimioterapia y radioterapia, solo quimioterapia (poliquimioterapia combinada o secuencial), o la combinación de los tres como programa de tratamiento multimodal.<sup>30</sup>

La quimioterapia comprende más de 50 fármacos antineoplásicos que pueden ser de origen natural, sintético o semisintético y se clasifica según su mecanismo de acción en citostáticos que actúan sobre el ADN, que afectan a la célula en cualquier fase del ciclo celular, y fármacos que actúan sobre la mitosis los cuales interaccionan con los microtúbulos. Debido a su mecanismo de acción estos fármacos son inespecíficos, es decir, que producen citotoxicidad generalizada lo que deriva en los efectos adversos de la quimioterapia.

Los fármacos antineoplásicos se clasifican en:

a) Citostáticos que actúan sobre el ADN.<sup>31,32</sup>

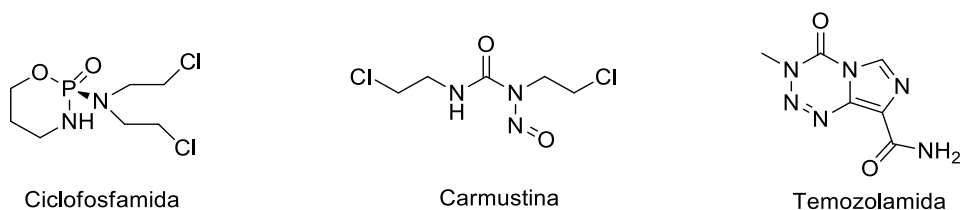
a.1) Agentes Alquilantes: Mostazas nitrogenadas, Nitrosoureas y Tetrazinas

Los agentes alquilantes son todavía uno de los grupos de antineoplásicos más utilizados. Este tipo de fármacos dañan el ADN e interfieren en la replicación del mismo y por tanto en la división celular.

Su mecanismo de acción radica en la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y las bases nitrogenadas del ADN. De esta manera se inhibe la

replicación del ADN y la transcripción del ARN y, por tanto, la mitosis y la síntesis de proteínas.

Los agentes alquilantes (Figura V.9) actúan en células en cualquier fase del ciclo celular, pero son más efectivos en células en rápida división.

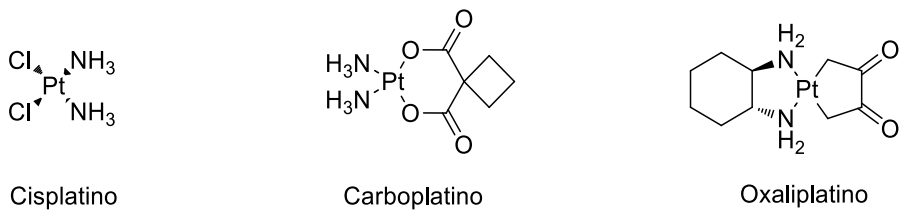


**Figura V.9:** Ejemplo de agentes alquilantes representativos. Ciclofosfamida (mostaza nitrogenada), Carmustina (Nitrosourea) y Temozolamida (Tetrazina)

Uno de los efectos adversos de este grupo de fármacos es la toxicidad aguda en la médula ósea (mielosupresión e inmunosupresión), por lo que pueden ser una buena opción para el tratamiento de linfomas Hodgkin y no Hodgkin.

#### a.2) Derivados del Platino

Los derivados del platino son complejos metálicos de platino que actúan de manera similar a los agentes alquilantes (Figura V.10), es decir, que forman enlaces covalentes con las bases nitrogenadas del ADN activando los mecanismos de apoptosis causando la muerte celular. Cuando se forman los enlaces con el ADN, se altera la configuración tridimensional del mismo, por tanto, aumenta la producción de errores en la transcripción e imposibilita la separación de las cadenas para la replicación.

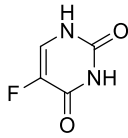


**Figura V.10:** Derivados de platino

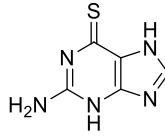
### a.3) Antimetabolitos

Se denominan antimetabolitos a moléculas con estructura similar a la de los componentes del metabolismo intermediario celular, de manera que interfieren en su metabolismo (Figura V.11). Los antimetabolitos inhiben la acción de enzimas relacionadas con la síntesis de purinas y pirimidinas, lo que resulta en la depleción celular de las mismas y en la alteración de la síntesis de los ácidos nucleicos.

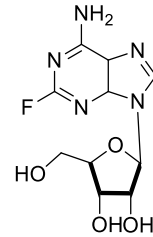
Este tipo de compuestos ejercen su acción, principalmente, sobre tumores de rápido crecimiento.



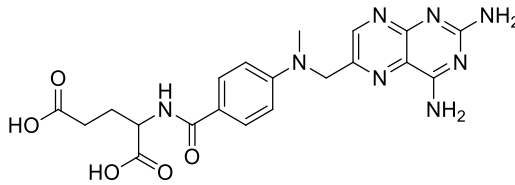
**5-Fluorouracilo**



**Tioguanina**



**Fludarabina**



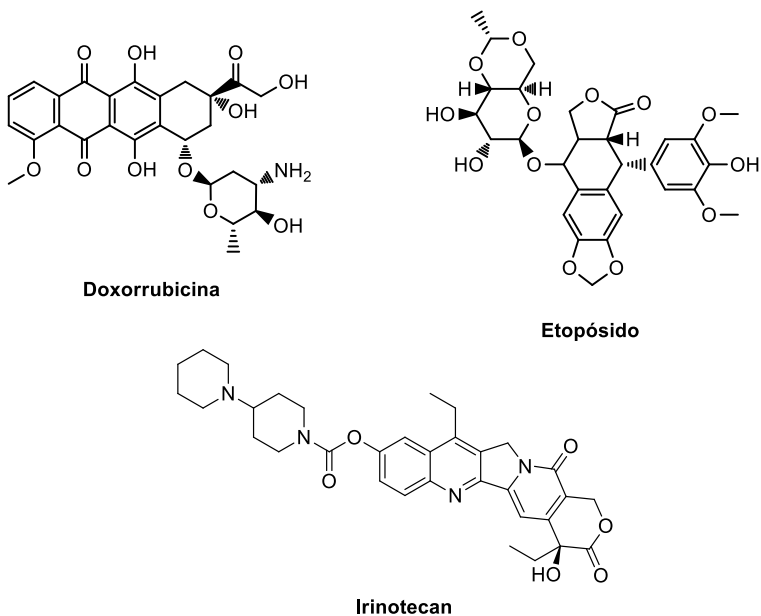
**Metotrexato**

**Figura V.11:** Antimetabolitos análogos de pirimidinas (5-Fluorouracilo), Análogos de purinas (Tioguanina), Análogos de Adenosina (Fludarabina) y Antifolatos (Metotrexato)

#### a.4) Inhibidores de topoisomerasas

Este grupo de fármacos antineoplásicos engloba antraciclinas, epodofilotoxinas y derivados de camptotecina (Figura V.12).

La topoisomerasa es una enzima esencial para la replicación, transcripción y reparación del ADN. Modifican la estructura terciaria de la doble hélice sin alterar la secuencia de nucleótidos. De manera que la inhibición de estas enzimas da lugar a la muerte de las células tumorales.



**Figura V.12:** Inhibidores de topoisomerasas

#### a.5) Miscelánea

**L-Asparaginasa:** Es una enzima natural que disminuye los niveles plasmáticos de L-asparagina, amino ácido esencial para la síntesis de proteínas y la viabilidad celular

**Bleomicina:** Provoca la formación de radicales libres que provocan la ruptura del ADN.

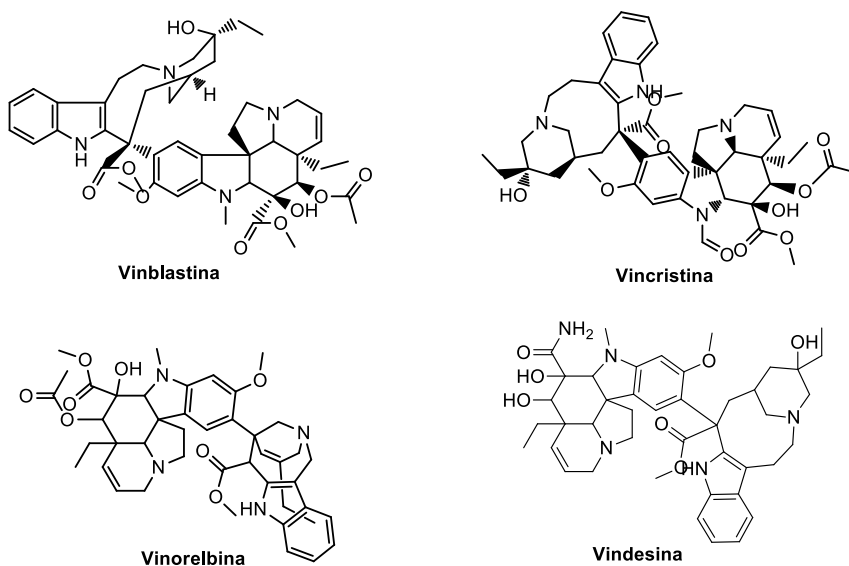
**Hidroxiurea:** Inhibe la ribonucleósido reductasa, la cual interviene en la conversión de ribonucleótido en desoxirribonucleótidos, precursores imprescindibles de la síntesis y reparación del ADN.

## b) Fármacos antimitóticos

Los fármacos que actúan sobre la mitosis interaccionan con los microtúbulos, que son polímeros protéicos presentes en el citoplasma celular y son imprescindibles para la viabilidad celular, ya que forman parte del huso mitótico, el cual permite la migración a los polos de los cromosomas durante la mitosis.

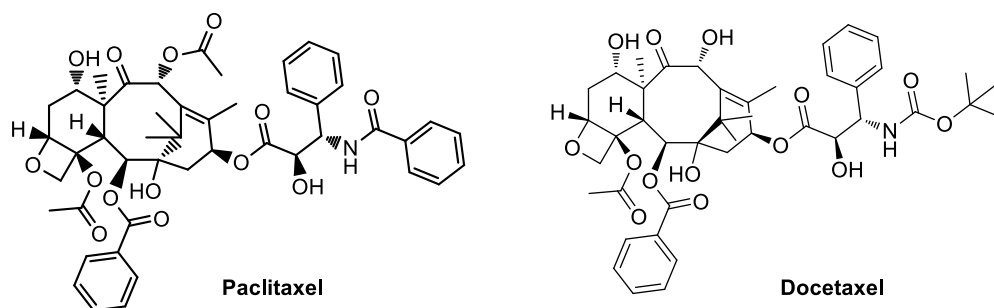
En este grupo de fármacos encontramos los alcaloides de la Vinca y los taxanos.

Normalmente se utilizan cuatro fármacos pertenecientes al grupo de los alcaloides de la Vinca. La Vinblastina, Vincristina y la Vinorelbina se emplean en la enfermedad de Hodgkin, además de en otros tipos de linfomas y leucemias. La Vindesina tiene un espectro más amplio ya que se utiliza también en el cáncer colorrectal, pulmonar y de mama (Figura V.13).



**Figura V.13:** Fármacos antimitóticos: Alcaloides de la Vinca

Los taxanos, entre los que se encuentra el paclitaxel, producen leucopenia y neutropenia de corta duración y dan lugar a reacciones de hipersensibilidad. El Docetaxel solo está indicado en el carcinoma de mama metastásico (Figura V.14).



**Figura V.14:** Fármacos antimitóticos: Taxanos

Por último, y ante la falta de especificidad de la quimioterapia convencional, aparecen los denominados fármacos biológicos o diana-específicos, que como su propio nombre indica actúan directamente sobre las proteínas o los mecanismos implicados en la proliferación y crecimiento de las células tumorales. Entre ellos se distinguen anticuerpos monoclonales, inhibidores de proteínas quinasas, fármacos antiangiogénicos, agentes inmunomoduladores, y nuevos agentes hormonales.<sup>5</sup>

Aunque en los últimos años se ha conseguido disminuir los efectos secundarios gracias a estas nuevas terapias, la calidad de vida de los pacientes sigue siendo cuestionable. A esto se añade la aparición de resistencias tanto en el caso de la quimioterapia como a fármacos diana, especialmente en cánceres avanzados donde el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos o fenotipo MDR (Multidrug Resistance) imposibilita la curación completa.<sup>33</sup> Esta resistencia, intrínseca o adquirida, puede atribuirse a determinados factores, como la heterogeneidad intratumoral, eliminación de fármacos a partir de MDR-1/P-gp (*Multidrug Resistance Protein/ Permeability glycoprotein*), o a partir de las alteraciones genéticas o



epigenéticas inducidas por el estrés metabólico y el microambiente tumoral tras la exposición al fármaco. La capacidad de adaptación al nuevo microambiente tumoral de las células cancerosas es una de las causas más importantes de la resistencia a los fármacos.<sup>34</sup>

La elevada incidencia del cáncer, los graves efectos adversos y la continua aparición de resistencias ponen de manifiesto la necesidad de identificar, caracterizar y desarrollar nuevos agentes antineoplásicos más eficaces y con un mayor perfil de selectividad, que permitan mejorar tanto la esperanza como la calidad de vida de los pacientes.

### **3. TÉCNICAS DE ESTUDIO PARA LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

#### **3.1. Ensayos de Viabilidad Celular**

Éste es un método altamente sensible y homogéneo basado en la detección de ATP para determinar el número de células viables en cultivo, de lo cual pueden inferirse tanto la ratio de proliferación celular como la citotoxicidad en respuesta a un tratamiento.

Para este ensayo se utiliza el kit “*CellTiter-Glo™*”, basado en la reacción de la luciferasa para medir el ATP, un indicador global del metabolismo celular y directamente proporcional al número de células viables. El ATP es un co-factor necesario para la reacción de la luciferasa.<sup>35,36</sup> La enzima luciferasa actúa en presencia de  $Mg^{2+}$  y ATP para producir oxiluciferina y liberar energía en forma de luminiscencia.<sup>36</sup>

Debido a que la reacción de la luciferasa requiere ATP, la luminiscencia producida es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente, lo que indica la tasa de viabilidad celular.<sup>38</sup>

Además, este es un proceso rápido el cual no necesita de largos periodos de incubación para el desarrollo de la reacción.

### **3.2. Actividad Caspasa**

La caspasa-3 se considera una de las moléculas más importantes en los eventos apoptóticos y es responsable de la escisión y activación de las caspasas-6, -7 y -8.<sup>39</sup> El kit *Caspase-Glo™ 3/7* contiene un reactivo en disolución de un sustrato proluminescente para las caspasas -3/7, el cual contiene una secuencia tetrapeptídica de proteólisis (DEVD), una luciferasa termoestable y una disolución tampón para inducir la lisis celular. La adición del reactivo da lugar a la lisis celular seguida de la escisión DEVD y por tanto la generación de luminiscencia debida a la aminoluciferasa. Esta luminiscencia es directamente proporcional a la actividad de las caspasas-3/7, que son las caspasas ejecutoras del proceso de apoptosis.<sup>40</sup>

### **3.3. Daño al ADN**

#### *Ensayo de formación de colonias*

El ensayo de formación de colonias o ensayo clonogénico es un método *in vitro* para analizar la habilidad de una célula para dividirse y formar una colonia. Una colonia se define como un conjunto de 50 células o más.

El ensayo de formación de colonias se utiliza para determinar la capacidad de recuperación celular después del tratamiento con radiación ionizante, aunque también es válido para determinar la efectividad de un agente genotóxico. Dado que la capacidad clonogénica de las células tratadas con agentes inductores del daño al ADN es inversamente proporcional al daño acumulado, cuando el tratamiento

produce daño significativo al ADN solamente una pequeña fracción de las células sembradas tendrá la capacidad de formar colonias.

Este ensayo permitirá conocer la eficiencia de plaqueo y la fracción de supervivencia para obtener la curva dosis-fracción de supervivencia.

Cada línea celular tiene una eficiencia de plaqueo (PE) propia. Cuando las células no tratadas son plaqueadas como una suspensión celular a baja densidad, crecen formando colonias. Para el cálculo de la PE y la fracción de supervivencia (SF) que es el número de colonias que se forman después del tratamiento, se utilizan las siguientes fórmulas:

$$PE = \frac{n^{\circ} \text{ colonias formadas}}{n^{\circ} \text{ células sembradas}} \quad [1]$$

$$SF = \frac{(n^{\circ} \text{ colonias formadas tras el tratamiento})}{n^{\circ} \text{ células sembradas} \times PE} \quad [2]$$

#### 4. ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LAS SALES DE TRIAZOLOQUINOLINIO Y TRIAZOLOPIRIDINIO

Los estudios de actividad antitumoral se realizaron, durante una estancia en el grupo de Biología Celular del Cáncer de la Universitat de les Illes Balears, bajo la supervisión del Dr. Priam Villalonga.

##### 4.1. Ensayos de Viabilidad Celular

La evaluación de la capacidad antiproliferativa *in vitro* en un panel de líneas celulares representativo de diferente origen tumoral es un método de selección en las etapas iniciales del desarrollo de fármacos con potencial actividad anticancerígena.<sup>41</sup>

Siguiendo los protocolos estandarizados, se evaluó, en primer lugar, la capacidad antiproliferativa de las disales de triazoloquinolinio **6a-d** y **7a-d** y la monosal **5d** (Figura V.15), en un panel representativo de líneas celulares de diferente origen tumoral, incluyendo tumores sólidos, así como neoplasias hematológicas (ver Tabla V.3, parte experimental).

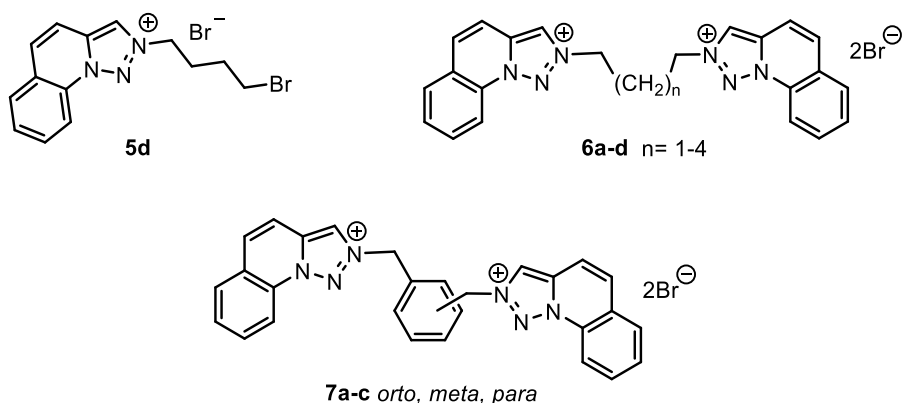
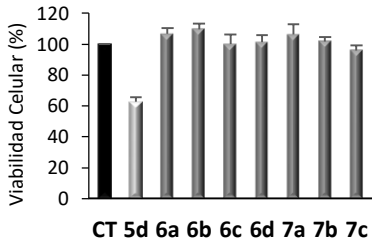


Figura V.15: Disales de triazoloquinolinio **6a-d** y **7a-d** y la monosal **5d**

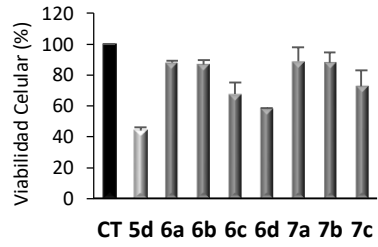
Las diferentes líneas celulares se trataron con cada uno de los compuestos a una concentración de 10  $\mu$ M. Tras 48h de tratamiento, la actividad antiproliferativa se determinó mediante el *kit* comercial *Cell Titer-Glo Luminiscent Assay*, ensayo bioluminiscente que se basa en la oxidación de la D-Luciferina a oxiluciferina. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado 5. A continuación, en la figura **V.16**, se muestran los resultados de estos ensayos.

De los ocho compuestos evaluados, tan solo la monosal **5d** mostró una inhibición significativa de la viabilidad celular en la mayoría de las líneas ensayadas. Las disales no mostraron resultados significativos en cuanto a la reducción de la viabilidad celular, alcanzando un máximo de reducción del 60% en solo algunas de las líneas a pesar de tener una carga positiva más y de los buenos resultados que dieron en los ensayos de interacción con el ADN y de actividad nucleasa.

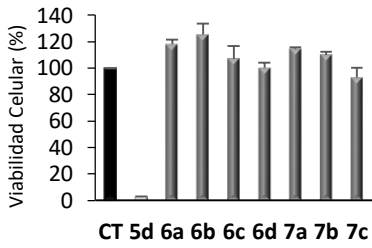
**LN-229**



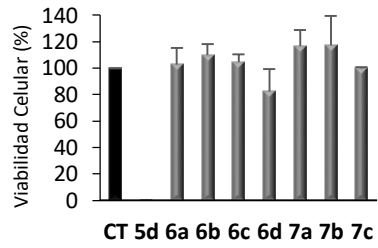
**T-98**



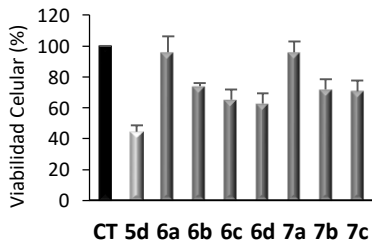
**Z-138**



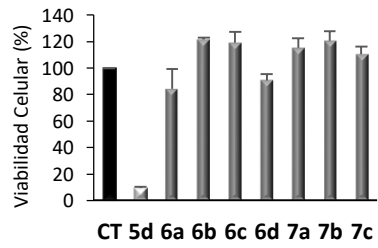
**Jeko-1**

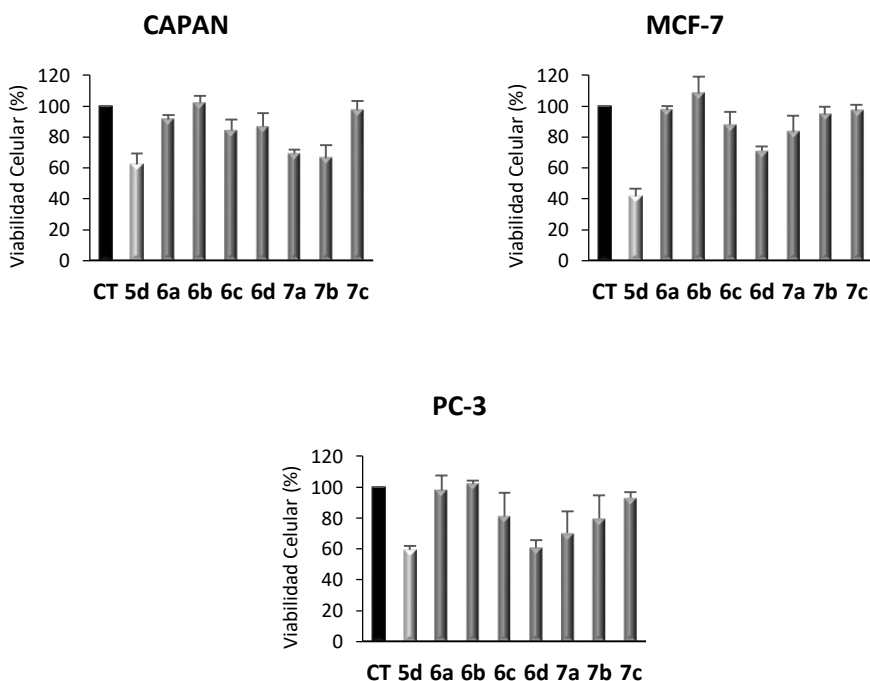


**SP-53**



**UPN**



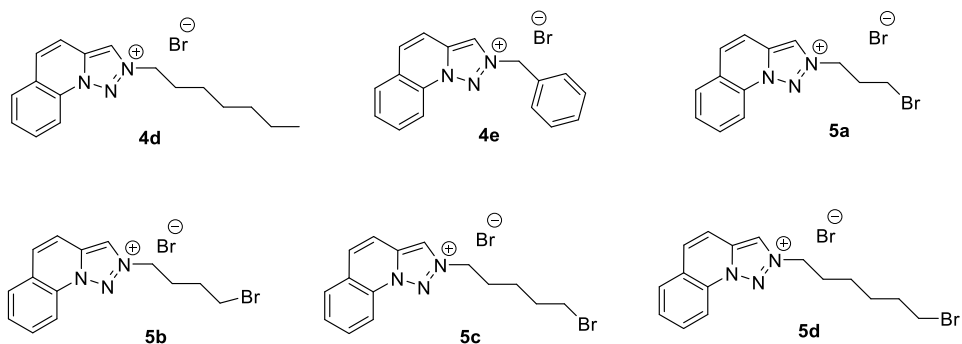


**Figura V.16:** Viabilidad celular de las líneas indicadas tras un tratamiento de las sales de triazoloquinolinio **6a-d**, **7a-c** y **5d** a una concentración de 10  $\mu$ M durante 48h. Los resultados se representan como la media  $\pm$  SD de tres ensayos independientes.

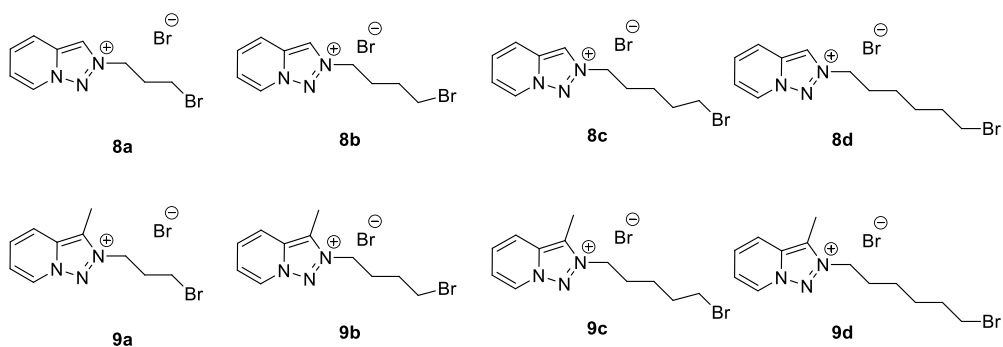
Teniendo en cuenta estos resultados, para estudiar la inhibición de la proliferación celular y su potencial actividad antitumoral, se continuó el trabajo con las monosales de triazoloquinolinio **4d** y **4e** y **5a-d** (Figura **V.17A**).

En la literatura existen ejemplos de derivados de sales de [1,2,3]-triazolo[4,3-*a*]-piridinio que presentan actividad como agentes antitumorales,<sup>42,43</sup> por lo que, dada su semejanza estructural se consideró interesante estudiar la posible actividad antitumoral de las monosales de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridinio **8a-d** y **9a-d** (Figura **V.17B**), tal como se ha expuesto en los objetivos.

A)



B)



**Figura V.17:** Monosales utilizadas para los ensayos de viabilidad celular con las líneas PC3, MCF-7, LN229 y Z-138.

Para estudiar la capacidad antiproliferativa de estos nuevos compuestos se procedió de la misma manera que para los compuestos ensayados anteriormente. En este caso, se seleccionaron cuatro líneas celulares, PC3, MCF-7, LN-229 y Z-138. Los resultados se muestran en la tabla V.1.

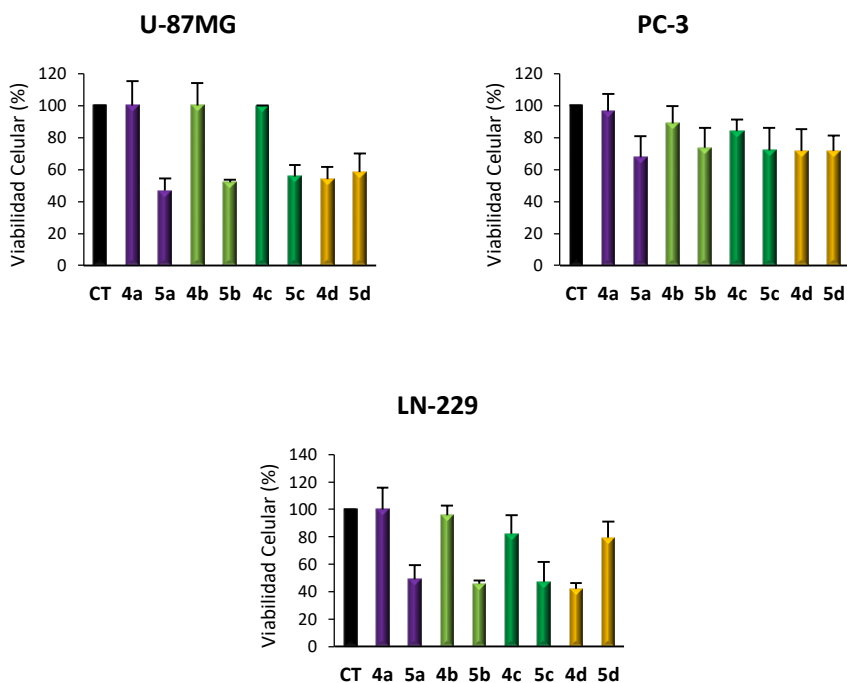


**Tabla V.1:** Viabilidad celular de las líneas PC3, MCF-7, LN229 y Z-138 tras el tratamiento con los compuestos... Las líneas indicadas fueron tratadas a una concentración 10  $\mu$ M. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de tres ensayos independientes. (ND\*: No determinado).

Compuesto	Línea Celular (% Viabilidad $\pm$ SD)			
	PC-3	MCF-7	LN-229	Z-138
<b>4d</b>	64.55 $\pm$ 7.62	59.82 $\pm$ 16.93	42.04 $\pm$ 4.04	7.57 $\pm$ 4.02
<b>4e</b>	64.78 $\pm$ 13.53	89.30 $\pm$ 9.40	64.88 $\pm$ 6.21	31.73 $\pm$ 2.41
<b>5a</b>	79.04 $\pm$ 13.91	55.61 $\pm$ 11.60	48.89 $\pm$ 11.23	21.22 $\pm$ 6.40
<b>5b</b>	65.42 $\pm$ 6.48	31.48 $\pm$ 4.30	45.81 $\pm$ 2.41	4.78 $\pm$ 1.20
<b>5c</b>	84.80 $\pm$ 2.29	50.08 $\pm$ 12.80	47.26 $\pm$ 11.18	3.66 $\pm$ 2.18
<b>5d</b>	77.01 $\pm$ 2.32	56.34 $\pm$ 13.96	79.50 $\pm$ 10.47	2.32 $\pm$ 0.89
<b>8a</b>	100 $\pm$ 17.29	99.97 $\pm$ 6.25	99.53 $\pm$ 3.10	99.50 $\pm$ 14.57
<b>8b</b>	82.35 $\pm$ 13.92	99.34 $\pm$ 5.77	81.64 $\pm$ 9.07	95.09 $\pm$ 15.06
<b>8c</b>	83.36 $\pm$ 16.22	99.64 $\pm$ 9.88	79.01 $\pm$ 1.63	77.97 $\pm$ 14.92
<b>8d</b>	93.64 $\pm$ 13.61	91.62 $\pm$ 2.39	71.61 $\pm$ 3.17	43.62 $\pm$ 2.98
<b>9a</b>	100.0 $\pm$ 4.49	91.00 $\pm$ 2.48	<b>N.D*</b>	70.64 $\pm$ 15.23
<b>9b</b>	100.0 $\pm$ 1.36	84.03 $\pm$ 12.32	<b>N.D*</b>	32.55 $\pm$ 17.99
<b>9c</b>	100.0 $\pm$ 4.99	99.45 $\pm$ 2.07	<b>N.D*</b>	85.36 $\pm$ 17.61
<b>9d</b>	81.66 $\pm$ 3.98	83.18 $\pm$ 11.78	<b>N.D*</b>	70.64 $\pm$ 15.23

Como se observa en la tabla **V.1**, los compuestos más activos son las sales de triazoloquinolinio. Además, incluso en las líneas más susceptibles, como la Z-138, las monosales de triazolopiridinio **8** y **9** no muestran una actividad antitumoral altamente significativa. Por tanto, se podría decir que la triazoloquinolina sería un mejor motivo estructural para la síntesis de compuestos con una potencial actividad antiproliferativa.

A modo de comparación y con el objetivo de determinar cuáles de las monosales de triazoloquinolinio presentaban mejores resultados, se hizo un estudio con tres líneas celulares tratadas con monosales de triazoloquinolinio sin (**4a-d**) y con (**5a-d**) bromo terminal. Los resultados se muestran en la figura siguiente.



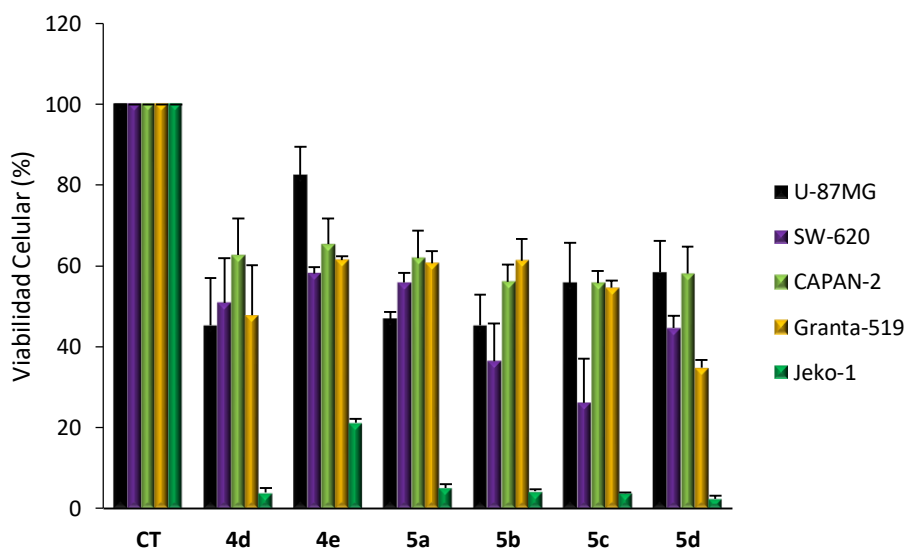
**Figura V.18:** Viabilidad celular de un panel de líneas de diferente origen tumoral tratadas con las monosales de triazoloquinolinio **4a-d** y **5a-d**, a una concentración de 10  $\mu$ M durante 48 horas.

Como observamos en la figura anterior, generalmente las sales con bromo terminal son más activas que sus análogos sin bromo. Aunque para los compuestos con una cadena de 6 carbonos, depende de la susceptibilidad de la línea y de las características propias del compuesto, ya que dependiendo de la línea el compuesto **4d** es más activo o tienen una actividad antiproliferativa similar.

Estas diferencias pueden ser debidas a la lipofilia de los compuestos, a la capacidad de penetrar en la célula y en el núcleo celular o por la forma de interacción con el

ADN. Estos estudios preliminares podrían dar lugar a una serie de ensayos para elucidar el mecanismo de acción de este tipo de compuestos.

Por último, con el objetivo de establecer los compuestos más activos entre las monosales de triazoloquinolinio, se realizaron ensayos de viabilidad celular con otras líneas celulares, cuyos resultados se muestran en la figura V.19.



**Figura V.19:** Viabilidad celular de un panel de líneas de diferente origen tumoral tratadas con las monosales de triazoloquinolinio, a una concentración de 10  $\mu$ M durante 48 horas.

En la figura anterior se observa que el compuesto **4e** resulta ser el menos activo en todas las líneas celulares ensayadas. Esto podría ser debido a que este compuesto cuenta con un anillo de fenilo como sustituyente en lugar de una cadena alifática como el resto de compuestos ensayados. De los compuestos restantes, ninguno presentó una gran actividad antiproliferativa frente a las líneas CAPAN-2 y Granta. Sin embargo, sí presentaron cierta actividad frente a las líneas SW-620 y U87MG y una gran actividad frente a la línea Jeko-1.

En base a estos resultados, se seleccionaron los compuestos más activos en todas las líneas celulares. Y puesto que los compuestos **4d** y **5d** resultaron tener una actividad antiproliferativa similar, se escogió el primero para seguir con los estudios posteriores, junto con los compuestos **5b** y **5c**.

Para los ensayos posteriores se seleccionaron tres líneas celulares representativas, U87MG, SW-620, ambas derivadas de tumores sólidos (glioblastoma y cáncer colonorectal, respectivamente) y Jeko-1 de neoplasias hematológicas.

En primer lugar, se calculó la concentración a la que los compuestos inhiben en un 50% la viabilidad celular ( $IC_{50}$ ) en cada una de las líneas tumorales seleccionadas. Las condiciones experimentales se explican detalladamente en el apartado 5. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla V.2:**  $IC_{50}$  de las monosales activas seleccionadas en las líneas celulares más sensibles a estos compuestos

Compuesto	$IC_{50}$ ( $\mu M$ ) $\pm$ SD		
	Línea Celular		
	Jeko-1	SW-620	U87MG
<b>4d</b>	0.93 $\pm$ 0.43	3.88 $\pm$ 0.25	10.8 $\pm$ 2.24
<b>5b</b>	1.82 $\pm$ 0.18	42.30 $\pm$ 4.36	3.028 $\pm$ 0.15
<b>5c</b>	1.43 $\pm$ 0.34	3.46 $\pm$ 0.62	8.55 $\pm$ 0.70

## 4.2. Análisis de la distribución del ciclo celular

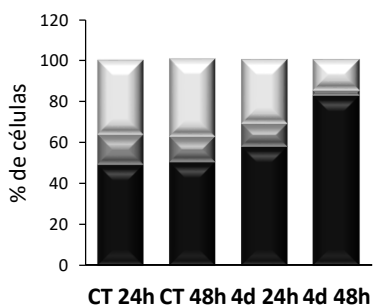
Los agentes antineoplásicos promueven una distribución característica de una población celular en las diferentes fases del ciclo (G0/G1, S y G2/M), en función de su mecanismo de acción y los reguladores afectados. De esta manera, el análisis de la distribución de una población celular en cada una de estas fases constituye una herramienta complementaria en el estudio de las diferentes vías de señalización y elucidación del mecanismo de acción.<sup>44</sup>

La distribución de las diferentes fases se analizó mediante el marcaje con yoduro de propidio (IP) tras el tratamiento con las monosales.<sup>45</sup> El IP interacciona con los polinucleótidos por intercalación en el surco mayor del ADN, formando un complejo altamente fluorescente que se excita a 535 nm y emite a 617 nm. Dado que se une en relaciones estequiométricas, la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN.<sup>45</sup>

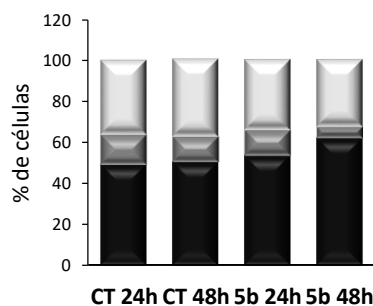
Al pasar una suspensión de células, previamente marcadas con IP, el citómetro proporciona un histograma en el que se representa la intensidad de fluorescencia respecto al número de células en cada una de las fases. Esta distribución permite diferenciar hasta tres subpoblaciones celulares en función de su dotación cromosómica, y, por tanto, extrapolables a las diferentes fases del ciclo. Se observa un pico G0/G1 correspondiente a las células con una dotación diploide (2N), el pico G2/M, con una intensidad de fluorescencia mayor, correspondiente a las células tetraploides (4N) y, entre ambas fases hay una meseta de valores intermedios correspondiente a la fase S o de síntesis. En ocasiones también puede observarse el pico sub-G0/G1, son células hipodiploides que corresponden a las que están entrando en fase de muerte celular o apoptosis.

Se realizó el estudio con la línea U87MG tras el tratamiento con las monosales **4d** y **5b**, compuestos que provocan una menor y mayor reducción de la viabilidad ( $IC_{50} = 10.80 \pm 2.24$  y  $IC_{50} = 3.028 \pm 0.15$ , respectivamente). De manera análoga a los anteriores estudios, las células se trataron a una concentración de  $10 \mu M$  durante 24 y 48h. En la figura **V.20** se muestran los resultados del análisis de la distribución del ciclo celular.

A)



B)



**Figura V.20:** Distribución porcentual de las distintas fases del ciclo celular de U87MG, **4d** (A) y **5d** (B)

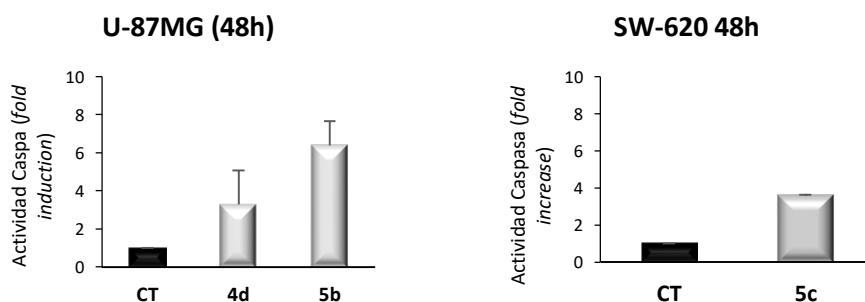
Los resultados muestran parada celular en G0/G1 por parte de los dos compuestos, aunque esta parada es más significativa en el caso del compuesto **4d** tras 48 horas de tratamiento. La parada en G0/G1 supone una disminución de la población celular en fase de síntesis en el caso de **5b**, y de las fases de síntesis y mitosis en el caso de la monosal **4d**.

### 4.3. Inducción de la Apoptosis: Activación de caspasas ejecutoras -3 y -7

La citotoxicidad de la mayoría de agentes antitumorales se relaciona directamente con la activación de la muerte celular programada.

La capacidad para inducir apoptosis por los compuestos **4d**, **5b** y **5c** se evaluó mediante la detección de la activación de las caspasas, evento característico del proceso de apoptosis. Se determinó la actividad de las caspasas ejecutoras -3 y -7, importantes en las dos vías de activación de la apoptosis, la vía extrínseca y la intrínseca. Para ello, se utilizó el Kit Caspase-Glo 3/7 Assay (ver parte experimental).

El ensayo se llevó a cabo con las líneas celulares U87MG y SW-620. Cada una se trató con los compuestos a los que resultaron ser más susceptibles en los ensayos de viabilidad celular, al igual que se procedió en el análisis de distribución del ciclo celular.



**Figura V.21:** Análisis de la actividad caspasa inducida de los compuestos **4d** y **5b** en U-87 y **5c** en SW-620 a una concentración de 10  $\mu$ M y tras un tratamiento de 48 horas. Los resultados se representan como la media  $\pm$  SD de tres ensayos independientes realizado cada uno por triplicado.



Los resultados mostrados en la figura **V.21**, sugieren que el tratamiento con las monosales **4d**, **5b** y **5c** inducen una activación de las caspasas significativo respecto del control, por lo que su mecanismo de acción podría estar mediado por la activación de la muerte celular programada o apoptosis.

#### **4.4. Ensayo de formación de colonias**

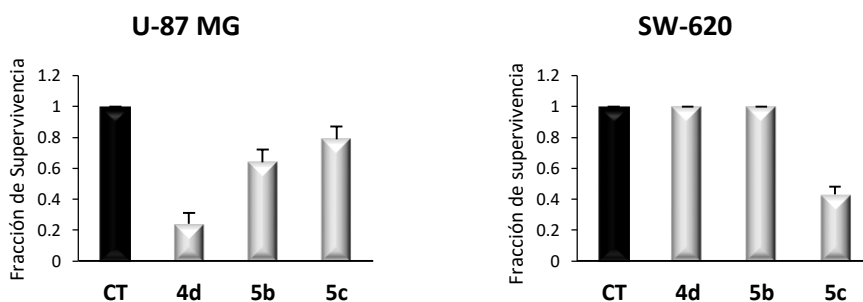
Para determinar la fracción celular con capacidad para mantener la integridad reproductiva tras el tratamiento con los compuestos, se llevó a cabo un ensayo de formación de colonias en las líneas SW-620 y U87MG.

Para ello, las células se trataron con las monosales a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  durante 4 horas, empleando como control positivo el etopósido. Los resultados se muestran en la figura **V.22**.

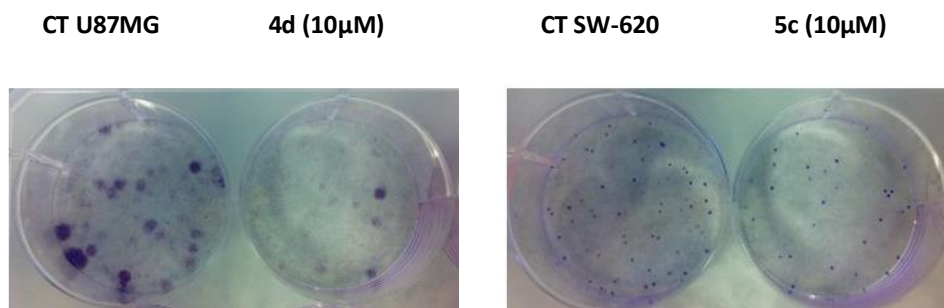
Como se observa en la figura **V.22**, sólo los compuestos **4d** y **5c** mostraron una actividad significativa en las células U87MG y SW-620 respectivamente.

Que el compuesto **4d** provoque más daño en el ADN que el compuesto **5b** puede explicarse por las diferencias estructurales. Para provocar daño en el ADN y que una célula pierda su capacidad de formación de colonias, no solo tiene que atravesar la barrera citoplasmática y entrar a la célula, sino que también debe atravesar la membrana nuclear para acceder al material genético de la célula. El compuesto **4d** tiene dos carbonos más en su cadena alifática y además no tiene un bromo terminal (como el compuesto **5b**), por tanto, este compuesto presentará una mayor lipofilia y probablemente mayor capacidad para atravesar la membrana nuclear.

A)



B)



**Figura V.22: A)** Fracción de supervivencia de células tumorales U87MG y SW-620 tratadas con los compuestos **4d**, **5b** y **5c** durante 4h y una posterior incubación de 2 semanas en ausencia de compuesto. Los resultados se representan como la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes cada uno realizado por duplicado. **B)** Fotos representativas del ensayo de formación de colonias de los compuestos más activos en cada una de las líneas ensayadas.

Del mismo modo podemos explicar que las disales no presenten actividad antiproliferativa. Estos compuestos presentan una gran interacción con el ADN y una actividad nucleasa significativa, por el contrario, no son capaces de inducir la muerte de células tumorales, hecho que podría ser debido a su incapacidad para atravesar

la membrana citoplasmática y entrar en la célula. Para confirmar esta hipótesis deberían realizarse ensayos de internalización celular con marcadores específicos.

## 5. CONCLUSIONES

1. Solo las monosales de triazoloquinolinio resultaron ser activas frente a las líneas tumorales ensayadas.
2. De las monosales ensayadas las más activas resultaron ser la **4d**, **5b** y **5c** con un  $IC_{50}$  menor a  $2.0 \mu M$  en la línea celular tumoral más sensible.
3. Los compuestos **4d** y **5b** mostraron capacidad para provocar una parada en el ciclo celular en fase de síntesis en el caso del compuesto **5b** y en la fase de síntesis y mitosis en el caso de **4d**.
4. Los compuestos **4d**, **5b** y **5c** son capaces de inducir actividad caspasa, lo que indica que su actividad antitumoral podría deberse a la activación de la muerte celular por apoptosis.
5. De los tres compuestos más activos, solo los compuestos **4d** y **5c** mostraron capacidad para provocar daño en el ADN celular e impedir así, la formación de colonias celulares.

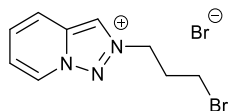
## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. SÍNTESIS DE MONOSALES DE TRIAZOLOPIRIDINIO. PROCEDIMIENTO GENERAL

A 25 °C se mezcló [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina **2** (1 mmol) o 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina **3** (1 mmol) disuelta en DMF (1 mL) con el correspondiente haluro de alquilo (1-2 mL) en un vial cerrado y se calentó a 80 °C sin agitación durante 5h. Se enfrió a temperatura ambiente y se eliminó el disolvente por decantación, el sólido resultante se lavó tres veces con DMF y tres veces más con acetato de etilo, utilizando para estas operaciones ultrasonidos para eliminar el exceso de los haluros de alquilo. El sólido obtenido, se secó a vacío durante 24h. Cuando después de este proceso las sales no están puras se purifican por cromatografía en columna de sílice utilizando AcOEt/metanol como eluyente.

TQ		Agente alquilante		Producto (mg)	Rto
<b>2</b>	120 mg	1,3-dibromopropano	1mL	<b>8a</b> (200)	62%
<b>2</b>	120 mg	1,4-dibromobutano	1mL	<b>8b</b> (198)	59%
<b>2</b>	120 mg	1,5-dibromopentano	1mL	<b>8c</b> (210)	60%
<b>2</b>	120 mg	1,6-dibromohexano	1mL	<b>8d</b> (310)	85%
<b>3</b>	130 mg	1,3-dibromopropano	1mL	<b>9a</b> (284)	80%
<b>3</b>	130 mg	1,4-dibromobutano	1mL	<b>9b</b> (271)	77%
<b>3</b>	130 mg	1,5-dibromopentano	1mL	<b>9c</b> (245)	68%
<b>3</b>	130 mg	1,6-dibromohexano	1mL	<b>9d</b> (182)	48%

**Bromuro de 2-(3-bromopropil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridinio (8a)**



**Sólido Blanco p. f:** 120-121 °C

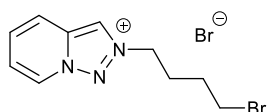
**HRMS ESI-[TOF]** para  $C_9H_{11}N_3Br^+$  Calculado 240.0131; Encontrado 240.0129

**MS (m/z) (%)** 240 (10), 132 (9), 120 (100), 117 (42).

**$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  9.15 (s, 1H), 9.07 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 8.26 (ddd,  $J = 9.0, 1.2, 0.8$  Hz, 1H), 7.91 (ddd,  $J = 9.1, 7.1, 0.8$  Hz, 1H), 7.79 (td,  $J = 7.1, 1.2$  Hz, 1H), 5.08 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 3.57 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 2.80 – 2.59 (m, 2H).

**$^{13}C$  RMN (126 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  135.69 (C), 130.62 (CH), 125.84 (CH), 123.64 (C), 122.74 (CH), 119.61 (CH), 52.60 ( $CH_2$ ), 31.53 ( $CH_2$ ), 29.11 ( $CH_2$ ).

**Bromuro de 2-(4-bromobutil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridinio (8b)**



**Sólido Blanco p. f:** 135-136 °C

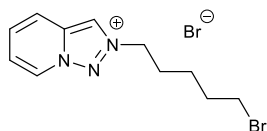
**HRMS ESI-[TOF]** para  $C_{10}H_{13}N_3Br^+$  Calculado 254.0287; Encontrado 254.0285.

**MS (m/z) (%)** 135 (40), 120 (100), 106 (21).

$^1\text{H RMN}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  9.11 (s, 1H), 9.06 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 8.26 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 8.03 – 7.85 (m, 1H), 7.77 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.94 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.58 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.47 – 2.22 (m, 2H), 2.13 – 1.87 (m, 2H).

$^{13}\text{C RMN}$  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  135.67 (C), 130.54 (CH), 125.82 (CH), 123.14 (CH), 122.60 (CH), 119.58 (CH), 53.58 ( $\text{CH}_2$ ), 33.12 ( $\text{CH}_2$ ), 28.58 ( $\text{CH}_2$ ), 27.76 ( $\text{CH}_2$ ).

### Bromuro de 2-(5-bromopentil)-[1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]piridinio (8c)



Sólido Blanco p. f: 145-147 °C

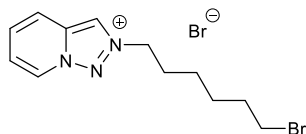
HRMS ESI-[TOF] para  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{Br}^+$  Calculado 268.0444; Encontrado 268.0444.

MS (m/z) (%) 120 (100), 106 (8).

$^1\text{H RMN}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  9.09 (s, 1H), 9.06 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 8.25 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 7.97 – 7.83 (m, 1H), 7.77 (t,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 4.90 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.53 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 2.31 – 2.09 (m, 2H), 2.03 – 1.86 (m, 2H), 1.67 – 1.44 (m, 2H).

$^{13}\text{C RMN}$  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  135.64(C), 130.50(CH), 125.81(CH), 123.07(CH), 122.54(CH), 119.56(CH), 54.18( $\text{CH}_2$ ), 34.28( $\text{CH}_2$ ), 31.09( $\text{CH}_2$ ), 28.08( $\text{CH}_2$ ), 24.00( $\text{CH}_2$ ).

### Bromuro de 2-(6-bromohexil)-[1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]piridinio (8d)



Sólido Blanco p. f: 155-160 °C

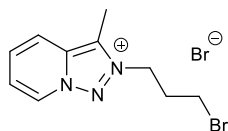
HRMS ESI-[TOF] para  $C_{12}H_{17}N_3Br^+$  Calculado. 282.0600; Encontrado 282.0611

MS (m/z) (%) 120 (100), 106 (3).

$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  9.08 (s, 1H), 9.05 (ddd,  $J = 7.1, 1.9, 0.9$  Hz, 1H), 8.24 (dt,  $J = 9.1, 1.2$  Hz, 1H), 7.89 (ddd,  $J = 9.1, 7.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.76 (td,  $J = 7.1, 1.3$  Hz, 1H), 4.88 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.51 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.17 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.00 – 1.75 (m, 2H), 1.59 – 1.48 (m, 2H), 1.49-1.39 (m, 2H).

$^{13}C$  RMN (126 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  135.63 (C), 130.49 (CH), 125.81 (CH), 123.03 (CH), 122.52 (CH), 119.55 (CH), 54.30 ( $CH_2$ ), 34.86 ( $CH_2$ ), 31.67 ( $CH_2$ ), 28.78 ( $CH_2$ ), 26.54 ( $CH_2$ ), 24.47 ( $CH_2$ ).

### Bromuro de 2-(3-bromopropil)-3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]piridinio (9a)



Sólido Blanco p. f: 122-125 °C



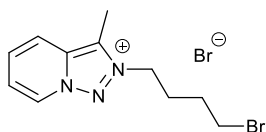
**HRMS ESI-[TOF]** para  $C_{10}H_{13}N_3Br^+$  Calculado 254.0287; Encontrado 254.0296

**MS (m/z) (%)** 134 (48), 131 (11), 130 (16), 118 (21), 106 (100), 104 (52).

**$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  8.91 (dt,  $J = 7.1, 0.9$  Hz, 1H), 8.15 (dt,  $J = 9.1, 1.1$  Hz, 1H), 7.77 (ddd,  $J = 9.0, 7.0, 0.8$  Hz, 1H), 7.68 (td,  $J = 7.1, 1.3$  Hz, 1H), 4.91 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.53 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 2.84 (s, 3H), 2.73 – 2.38 (m, 2H).

**$^{13}C$  RMN (126 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  134.29 (C), 133.30 (C), 129.13 (CH), 125.43 (CH), 122.73 (CH), 119.16 (CH), 49.32 ( $CH_2$ ), 48.85 ( $CH_2$ ), 30.94 ( $CH_2$ ), 29.24 ( $CH_2$ ), 8.07 ( $CH_3$ ).

### **Bromuro de 2-(4-bromobutil)-3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]piridinio (9b)**



**Sólido Blanco p. f:** 145-150 °C

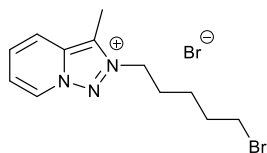
**HRMS ESI-[TOF]** para  $C_{11}H_{15}N_3Br^+$  Calculado 268.0444; Encontrado 268.0444.

**MS (m/z) (%)** 135 (30), 134 (60), 106 (100), 104 (10).

**$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  8.90 (dt,  $J = 7.1, 0.9$  Hz, 1H), 8.14 (dt,  $J = 9.1, 1.1$  Hz, 1H), 7.76 (ddd,  $J = 9.1, 7.0, 0.8$  Hz, 1H), 7.66 (td,  $J = 7.1, 1.3$  Hz, 1H), 4.74 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.52 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 2.81 (s, 3H), 2.29 – 2.09 (m, 2H), 2.20-1.92(m, 2H).

**$^{13}C$  RMN (126 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  134.25 (C), 132.85 (C), 129.03 (CH), 125.40 (CH), 122.58 (CH), 119.09 (CH), 50.31 ( $CH_2$ ), 33.16 ( $CH_2$ ), 28.59 ( $CH_2$ ), 27.04 ( $CH_2$ ), 7.96 ( $CH_3$ ).

### Bromuro de 2-(5-bromopentil)-3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]piridinio (9c)



Sólido Blanco p. f: 149-150 °C

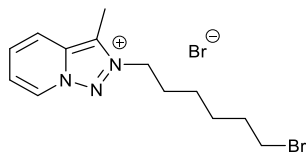
HRMS ESI-[TOF] para  $C_{12}H_{17}N_3Br^+$  Calculado 282.0600; Encontrado 282.0604.

MS (m/z) (%) 134 (72), 106 (100), 104 (5).

$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  8.90 (dt,  $J = 7.1, 0.9$  Hz, 1H), 8.13 (dt,  $J = 9.1, 1.1$  Hz, 1H), 7.75 (ddd,  $J = 9.1, 7.0, 0.8$  Hz, 1H), 7.66 (td,  $J = 7.1, 1.3$  Hz, 1H), 4.74 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 3.47 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.17 – 2.01 (m, 2H), 2.07-1.89(m, 2H), 1.66 – 1.44 (m, 2H).

$^{13}C$  RMN (126 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  134.21 (C), 132.76 (C), 128.98 (CH), 125.38 (CH), 122.52 (CH), 119.07 (CH), 50.93 ( $CH_2$ ), 34.24 ( $CH_2$ ), 31.16 ( $CH_2$ ), 27.44 ( $CH_2$ ), 24.08 ( $CH_2$ ), 7.94 ( $CH_3$ ).

### Bromuro de 2-(6-bromohexil)-3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]piridinio (9d)



Sólido Blanco p. f: 170-175 °C

**HRMS ESI-[TOF]** para  $C_{13}H_{19}N_3Br^+$  Calculado 296.0757; Encontrado 296.0757.

**MS (m/z) (%)** 134 (81), 106 (100).

**$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  8.90 (dt,  $J = 7.1, 0.9$  Hz, 1H), 8.14 (dt,  $J = 9.1, 1.1$  Hz, 1H), 7.76 (ddd,  $J = 9.1, 7.0, 0.8$  Hz, 1H), 7.66 (td,  $J = 7.1, 1.2$  Hz, 1H), 4.74 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.46 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.81 (d,  $J = 3.1$  Hz, 3H), 2.13 – 2.02 (m, 2H), 1.92 – 1.77 (m, 2H), 1.57 – 1.36 (m, 4H).

**$^{13}C$  RMN (126 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  134.21 (C), 132.73 (C), 128.99 (CH), 125.39 (CH), 122.52 (CH), 119.10 (CH), 51.08 ( $CH_2$ ), 34.85 ( $CH_2$ ), 31.69 ( $CH_2$ ), 28.17 ( $CH_2$ ), 26.62 ( $CH_2$ ), 24.58 ( $CH_2$ ), 8.01 ( $CH_3$ ).

## 6.2. ENSAYOS DE EVALUACIÓN ANTITUMORAL *IN VITRO*

Los estudios de evaluación de la actividad antitumoral *in vitro* de las sales de triazoloquinolinio se realizaron en colaboración con el Grupo de Biología Celular del Cáncer de la Universitat de les Illes Balears, dirigido por el Dr. Priam de Villalonga.

### 6.2.1. Cultivos celulares

#### *Líneas Celulares*

La evaluación antitumoral *in vitro* de los diferentes compuestos sintetizados se realizó a partir de un panel de líneas celulares humanas de diferente origen tumoral, derivadas tanto de neoplasias hematológicas, como de tumores sólidos.

Derivadas de neoplasias hematológicas:

**Jurkat:** línea celular de leucemia linfoblástica aguda,<sup>46</sup> cedida por el Dr. Joan Gil del Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIVELL) de Barcelona.

**Granta-519, Jeko-1, SP53, y Z-138:** líneas celulares derivadas de neoplasias de células B maduras, cuyo origen y características inmunofenotípicas permiten su clasificación como linfomas no-Hodgkin bajo la denominación de Linfoma de Células del Manto (LCM).<sup>47,48</sup> Jeko-1 fue cedida por la Dra. Beatriz Martínez del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid), Granta-519 y JVM-2 por la Dra. Dolors Colomer del Hospital Clínic de Barcelona y Z-138 por la Dra. Eva Ortega-Paino de la Universidad de Lund (Suecia).

Derivadas de tumores sólidos:

**LN229, U87MG, y T98G:** líneas celulares de glioblastoma multiforme o astrocitoma de grado IV.<sup>49-51</sup> LN229, U251 y U373 fueron cedidas por el Dr. Joan Seoane del Institut de Recerca Vall d'Hebron de Barcelona y SKMG-3 por el Dr. Hans Skovgaard del hospital Rigshospitalet (Oslo).

**MCF-7** de adenocarcinoma de mama.<sup>52</sup>

**PC-3** de adenocarcinoma de próstata de grado IV,<sup>53</sup> cedida por la Dra. Anne J. Ridley del King's College (Londres).

**SW-620:** líneas establecidas a partir de adenocarcinoma primario de colon,<sup>54</sup> cedidas por el Dr. Eric Lam del Imperial College London (Londres).

### *Mantenimiento de Cultivos Celulares*

Jurkat, Granta-519, Jeko-1, JVM-2, SP53 y Z-138 fueron mantenidas en suspensión en medio RPMI-1640 con L-glutamina y HEPES (Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel). Todas las líneas se cultivaron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (volumen máximo de células en suspensión 5 mL) o 75 cm<sup>2</sup> (volumen máximo de células en suspensión 20 mL), manteniéndose en crecimiento exponencial a una dilución de 0.4x10<sup>6</sup> células/mL mediante al menos dos diluciones por semana.

Las líneas adherentes LN229, U87MG, MCF-7, PC-3, SW480 y SW620 fueron mantenidas en medio DMEM con 4.5 g/L de glucosa y L-glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA), manteniéndose en crecimiento exponencial mediante dos subcultivos por semana. En todos los casos el medio de cultivo se suplementó con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS, Fetal Bovine Serum) inactivado (56 °C 60 min) y 100 U/mL penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), y ocasionalmente, con Plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA) a una concentración de 5 µg/mL de como medida profiláctica.

Las líneas celulares se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar de 37 °C de temperatura, 95% de humedad y 5% de presión de CO<sub>2</sub>. El crecimiento y proliferación del cultivo se analizó diariamente con ayuda de un microscopio óptico controlando la morfología, adherencia celular y ausencia de contaminación. Todas las manipulaciones se hicieron en una campana de flujo laminar vertical de bioseguridad Clase II (nivel de seguridad biológica 2; Telstar).

En cada pase o subcultivo se determinó la viabilidad celular mediante el método de recuento azul tripán. El azul tripán es un colorante azoico capaz de penetrar en la

célula en función de la integridad de la membrana plasmática. Tan sólo penetra en aquellas con la membrana plasmática desestructurada, permitiendo distinguir las células muertas de coloración azul y las vivas y apoptóticas, que conservan su aspecto redondeado y transparente.

Tras la previa mezcla de volúmenes equivalentes (10 µL) de la suspensión celular y azul tripán (0.4% en NaCl 0.15 M), se depositó un volumen de 10 µL en una cámara de Neubauer, se realizó el conteo en un microscopio óptico y se determinó la viabilidad celular a partir del cociente entre las células vivas y las totales.

Todos los ensayos se realizaron partiendo de una viabilidad celular de al menos el 95 %.

La densidad celular se calculó a partir de la siguiente ecuación

$$Densidad\ Celular = \frac{N^{\circ}\ células\ viables \times factor\ de\ dilución \times 10^4}{N^{\circ}\ cuadrantes} \quad [3]$$

Siendo  $10^4$  el factor de corrección para el volumen de la cámara.

Para realizar los pases de las líneas adherentes se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se eliminó el medio de cultivo con ayuda de una pipeta pasteur y una bomba de vacío.
2. La monocapa adherente se lavó con 0.5 o 1 mL de PBS 1x estéril (solución fosfato a pH 7.4; GIBCO) para placas de 35 mm o 100 mm, respectivamente.

3. Se eliminó el PBS y se añadió 0.5 o 1mL de tripsina-EDTA (0.25% tripsina-EDTA 1mM pH 8.0, Gibco, Life Technologies) atemperada, incubándose en condiciones estándar de cultivo entre 2-5 minutos, dependiendo de la línea celular.

4. Tras el periodo de incubación, se añadió un volumen equivalente de medio completo para neutralizar el efecto de la tripsina y se centrifugó a 1500 r.p.m durante 5 minutos en un tubo de centrifuga de fondo cónico de 15 mL.

5. Se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en un 1 mL de medio completo, pipeteando suavemente para favorecer la desagregación y obtener una suspensión celular homogénea para el cálculo preciso de la densidad celular.

6. Se realizó el recuento en la cámara de Neubauer y la consiguiente dilución requerida.

#### Subcultivo de células en suspensión

Para realizar los pases de las líneas en suspensión se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se determinó la viabilidad y densidad celular y se transfirió un volumen de cultivo para una densidad celular de  $0.4 \times 10^6$ /mL a un tubo de centrifuga de 15 mL.

2. Se centrifugaron a 1500 r.p.m durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5, 20 o 40 mL de medio completo, según el frasco de cultivo a utilizar.

## *Criopreservación*

Para el almacenamiento de las líneas durante largos periodos de tiempo se procedió a su congelación, respetando la subconfluencia y el crecimiento en fase exponencial. A continuación, se detalla brevemente el protocolo de congelación y descongelación.

### Protocolo de Congelación

1. Para las líneas adherentes se realizó el proceso de tripsinización descrito anteriormente.
2. Se determinó la viabilidad y densidad celular, y se centrifugó a 1200 r.p.m durante 5 minutos un volumen de suspensión para congelar aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por criotubo.
3. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 900  $\mu$ L de suero FBS y 100  $\mu$ L de DMSO, utilizado como agente crioprotector.
4. Los criotubos fueron introducidos en un recipiente con isopropanol (Nalgene® Mr. Frosty) y se almacenaron a  $-80$  °C. Pasados unos días, los criotubos se introdujeron en el tanque de nitrógeno líquido ( $-196$  °C) hasta su utilización.

### Protocolo de Descongelación:

1. El criotubo se descongeló en el baño termostatado a  $37$  °C en agitación constante.
2. Una vez descongelado, se transfirió su contenido a un tubo de centrifuga de 15 mL y se añadió hasta 5 mL de medio completo homogeneizando con la pipeta.



3. Se centrifugó a 1000 r.p.m durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 mL de medio completo en una placa de 60 mm o frasco de 25 cm<sup>2</sup>.

### **6.2.2. Preparación de las disoluciones stock**

Las monosales y disales de triazoloquinolinio, se disolvieron en H<sub>2</sub>O a una concentración de 100 mM. A partir de esta disolución stock se realizaron las diferentes diluciones seriadas a una concentración de 1, 5 y 10 mM para su uso inmediato.

La disolución stock se almacenó a -20 °C durante largos períodos, mientras que las disoluciones de 1 y 10 mM se mantuvieron a 4 °C para su utilización inmediata en los diferentes ensayos.<sup>55</sup>

### **6.2.3. Ensayos de viabilidad celular**

La viabilidad celular se determinó mediante el kit comercial Cell Titer-Glo luminiscent assay (Promega, Madison, WI), ensayo quimioluminiscente para la detección de células metabólicamente activas a partir de la cuantificación de ATP.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos. Para las líneas en suspensión se transfirió un volumen equivalente a una densidad celular de 10.000 células/pocillo en placas de fondo redondo. Para las líneas adherentes se sembraron 4000 células por pocillo en placas estándar y a las 24 horas, una vez adheridas, se trataron con los diferentes compuestos.

Tanto para las líneas de células adherentes como para las de células en suspensión, se estableció un control negativo correspondiente al tratamiento de las células con

el disolvente utilizado como vehículo, en este caso H<sub>2</sub>O y un blanco de reacción (H<sub>2</sub>O + medio de cultivo) para determinar el ruido de fondo del reactivo.

Se establecieron como condiciones de tratamiento estándar para los diferentes screenings una concentración de 10 µM y un periodo de incubación de 48 horas, determinándose cada condición por triplicado en tres ensayos independientes.

Tras 48 horas de tratamiento se aspiró el medio y, se añadió 100 µL de medio nuevo y el mismo volumen de reactivo Cell Titer Glo Reagent atemperado. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia y se realizó la lectura en un lector de placas Synergy HT multi-detection microplate reader (Biotek, Winooski, VT), con el software Gen5 Data Analysis con un tiempo de integración de 0.5.

Los datos se normalizaron respecto al control y se expresan como porcentaje de la viabilidad celular.

#### **6.2.4. Determinación del valor IC<sub>50</sub>**

El valor de IC<sub>50</sub> corresponde a la concentración de fármaco que produce una reducción de la viabilidad celular en un 50%, parámetro utilizado en la evaluación in vitro de agentes antitumorales como determinante de su efectividad entre diferentes compuestos o la sensibilidad a los mismos entre diferentes líneas celulares.<sup>56</sup>

Siguiendo las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente en los ensayos de viabilidad celular, se estableció un rango de concentraciones entre 0.1-50 µM y un período de incubación de 48 horas. Cada concentración se evaluó por triplicado en cada ensayo, realizándose hasta tres ensayos independientes.

Los datos de luminiscencia obtenidos se normalizaron respecto a los valores del control negativo y se calculó la IC<sub>50</sub> a partir de la curva dosis-respuesta con el programa Graphad Prism 6 (La Jolla California, USA), mediante un ajuste de regresión no lineal con pendiente variable de acuerdo con la ecuación sigmoidea (ecuación [4]).<sup>57</sup>

$$y = \frac{ymáx}{1+10^{(logIC_{50}-x)n}} \quad [4]$$

Donde  $y$  es la viabilidad celular (%),  $x$  es la concentración del compuesto ensayado y  $n$  es el coeficiente de Hill.

#### **6.2.5. Análisis de la distribución del ciclo celular**

Las líneas adherentes se sembraron a una densidad celular de  $2 \times 10^4$  células/mL en placas de 100 mm, y a las 24 horas de incubación, manteniendo la subconfluencia, se trataron con los compuestos seleccionados.

La densidad celular utilizada para la línea celular Jurkat, en fase exponencial de crecimiento, fue de  $4 \times 10^5$  células /mL en frascos de 25 cm<sup>2</sup>, tratadas a la misma dosis y periodo de incubación.

El procedimiento para el análisis del ciclo celular se divide en tres partes:

##### *1. Recogida y fijación de las muestras*

Para ello se siembran 100.000 células en placas de 60 mm. Se sembraron tres placas por compuesto y control correspondientes a los tiempos 0, 24 y 48h de tratamiento. Se incuban en el incubador a 37 °C y se tratan al día siguiente.

Pasado el periodo de tratamiento, se recoge el medio de incubación y se hace un lavado con PBS1x. Se tripsinizan las células con 1 mL de tripsina durante 2-3

minutos incubando a 37 °C. A continuación, se inactiva la tripsina con medio completo recogiendo todo el volumen y se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos. Se aspira el sobrenadante y se resuspende el pelet en PBS1x.

Con la ayuda de una cámara de Neubauer se hace un recuento celular y se recogen aproximadamente 1 millón de células por vial. Se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones y se descarta el sobrenadante. A continuación, se resuspende el *pelet* en 0.5 mL de PBS 1x con 1% de suero y se fijan con 700 µL de etanol 96% frío gota a gota. Conservar las muestras a -20 °C entre 2h y 3 semanas.

## 2. *Preparación de las muestras*

Las muestras se centrifugan a 1600 rpm durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante. A continuación, se realiza un lavado con PBS1x y se centrifuga de nuevo a 1600 rpm durante 5 minutos y nuevamente se descarta el sobrenadante. El pelet se resuspende en 400 µL de tampón de marcaje (4.7 mL de PBS1x, 250 µL de ioduro de propidio (stock 0.5 mg/mL) y 50 µL de RNAsa (stock 10 mg/mL)). Las muestras se analizan mediante citometría de flujo después de ser incubadas a 37 °C durante 40 minutos.

## 3. *Análisis de muestras*

Las muestras se analizaron con un citómetro FACScan (Coulter Epics XL-MSL, Beckman Coulter, Fullerton, CA), utilizando el programa informático EXPO 32 ADC para la adquisición de datos. Se adquirieron 20000 eventos por cada condición experimental a una velocidad no superior a mil eventos por segundo, detectándose la fluorescencia del IP en el canal FL3. La cuantificación de cada una de las fases del ciclo celular se realizó con los programas Flowing Software 2

y WinMDI Software y se expresan como la media del porcentaje de células en cada fase de tres ensayos independientes  $\pm$  SD.

#### **6.2.6. Análisis de inducción de la Apoptosis**

##### *Ensayos de actividad caspasa*

Se determinó la activación de las caspasas ejecutoras -3 y -7 mediante el kit Caspase-Glo 3/7 assay (Promega, Madison, WI).

El ensayo se realizó paralelamente a los estudios de viabilidad celular, siguiendo el mismo procedimiento de siembra, tratamiento e incubación en las mismas líneas celulares. De la misma manera se estableció un control negativo correspondiente al tratamiento de las células con H<sub>2</sub>O y un blanco de reacción (H<sub>2</sub>O + medio de cultivo) para determinar la actividad basal de las caspasas.

Tras 48 horas de tratamiento, se aspiró el medio y se añadió 50  $\mu$ L de medio nuevo y el mismo volumen de reactivo *Caspase-Glo*<sup>®</sup> 3/7 *Reagent* atemperado. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia y se realizó la lectura en un lector de placas *Synergy HT multi-detection microplate reader* (Biotek, Winooski, VT), con el software *Gen5 Data Analysis* con un tiempo de integración de 0.5.

Los datos se normalizaron respecto al control y se expresan como *fold induction* de la actividad caspasa.

### **6.2.7. Análisis del daño al ADN**

#### *Ensayo de formación de colonias*

Se evaluó la clonogenicidad de las líneas celulares LN229 y PC3 tras un corto tratamiento de 4 horas con los compuestos seleccionados. Posteriormente se tripsinizaron y fueron sembradas a baja densidad celular, 200 y 500 células por pocillo en placas de 6 pocillos en ausencia de compuestos. Cada condición se evaluó por duplicado en tres ensayos independientes. El periodo para formar las colonias fue de entre 10-20 días dependiendo de la línea celular, siempre evitando la formación de colonias solapantes.

Posteriormente, para el recuento de colonias se realizó la tinción con cristal violeta (0.5% en metanol) y tras 20 minutos con solución de tinción se lavaron con PBS.

A partir de las células control determinamos la eficiencia de plaqueo (PE, Plating efficiency) mediante la ecuación 1 (ver página 27).

La PE es dependiente de línea y condiciones de cultivo. Su reproducibilidad en los diferentes ensayos permite asegurar que los resultados entre éstos y los diferentes tratamientos son comparativos.<sup>58</sup>

Por último, se realizó el recuento de colonias de los diferentes tratamientos, considerando aquellas formadas por al menos 50 células. Los resultados se expresan en porcentaje de colonias formadas respecto al control.

### **6.2.8. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó a partir de las medias  $\pm$  desviación estándar con el programa GraphPad Prism 6.0. La comparación entre las medias se realizó mediante la prueba t de Student o mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA de un factor) según se indica. Los datos para los cuales el valor F fue significativo, se analizaron con un post-test de Turkey para múltiples comparaciones. La hipótesis nula fue aceptada para todos aquellos valores de los test en los que el valor F no resultó significativo con un valor de p mayor de 0.05.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. I. Steiner, N. Stojanovic, A. Bolie, A. Brozovic, D. Polance, A. Ambriovic-Ristov, MR. Stojkovic, I. Piantanida, D. Eljuga, J. Kosmrlj, M. Osmak, *Radiol. Oncol.*, **2016**, 50 (3) 280
2. D. Dheer, V. Singh, R. Shankar, *Bioorg. Chem.*, **2017**, 71, 30
3. J.M. Aizpurua, R. M. Fratila, Z. Monasterio, N. Pérez-Esnaola, E. Andreieff, A. Irastorza, M. Sagartzazu-Aizpurua, *New. J. Chem.*, **2014**, 38, 474
4. A. Massarotti, S. Aprile, V. Mercalli, E. Del Grosso, G. Sorba, G. C. Tron, *Chem. Med. Chem.*, **2014**, 9, 2497
5. A. Santoro, R. M. Lord, J. J. Loughrey, P. C. McGowan, M. A. Halcrow, A. F. Henwood, C. Thomson, E. Zysman-Colman, *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 7035
6. [www.seom.org](http://www.seom.org)
7. P. Peltomäki, *Exp. Cell Res.*, **2012**, 318 (4), 299
8. R. Garzón, C. M. Croce, *Curr. Opin. Hematol.*, **2008**, 15 (4), 352
9. J.E. Darnell, H. Lodish, A. Berk, L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, **2001**, 4th edition
10. D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell*, **2011**, 144, 646
11. M. Villa, C. Cassani, E. Gobbini, D. Bonetti, M. P. Longhese, *Cell Mol. Life Sci.*, **2016**, 73, 3655
12. C. J. Matheson, D. S. Backos, P. Reigan, *Trends. Pharmacol. Sci.*, **2016**, 37, 872
13. C. L. Sansam, R. J. Pezza, *FEBS J.*, **2015**, 282, 2471
14. J.F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie, *Br. J. Cancer*, **1972**, 4, 239
15. P. Allavena, A. Sica, G. Solinas, C. Porta, A. Mantovani, *Crit. Rev. Oncol. Hemat.*, **2008**, 66, 42
16. B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano, C. Di Ilio, V. De laurenzi, *Aging*, **2012**, 4, 330
17. I. M. Ghobrial, T. E. Witzig, A. A. Adjei, *CA Cancer J. Clin.*, **2005**, 55, 178



18. M. O. Hengartner, *Nature*, **2000**, 407, 770
19. H. Y. Yamada, G. J. Gorbisky, *Mol. Cancer Ther.*, **2006**, 5, 2963
20. M. Kurokawa, S. Kornbluth, *Cell*, **2009**, 138, 838
21. D. W. Nicholson, A. Ali, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt, C. K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P. R. Griffin, M. Labelle, Y. A. Lazebnik, *Nature*, **1995**, 376, 37
22. I. Chowdhury, B. Tharaka, G. K. Bhat, *Comp. Biochem. Phys. B*, **2008**, 151, 10
23. L. S. Dickens, R. S. Boyd, R. Jukes-Jones, M. A. Hughes, G. L. Robinson, L. Fairall, J. W. R. Schwabe, K. Cain, M. MacFarlane, *Mol. Cell*, **2012**, 47, 291
24. S. W. G. Tait, M. J. Parsons, F. Llambi, L. Bouchier-Hayes, S. Connell, C. Muñoz-Pinedo, D. R. Green, *Dev. Cell*, **2010**, 18, 802
25. D. R. Green, G. Kroemer, *Science*, **2004**, 305, 626
26. A. Sharma, K. Singh, A. Almasan, *Methods Mol. Biol.*, **2012**, 920, 613
27. V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina, A. I. Poletayev, *Biopolymers*, **1973**, 12, 89
28. A. R. Morgan, D. H. Evans, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, *Nucleic Acids Res.*, **1979**, 7, 571
29. A. M. Shoieb, M. Elgayyar, P. S. Dudrick, J. L. Bell, P. K. Tithof, *Int. J. Oncol.*, **2003**, 22, 107
30. *Clinical Oncology: basic principles and practice*. 4<sup>th</sup> Ed. H. Arnold, London, Ed. **2009**
31. H. Cortés Funes, R. Colomer Bosch, *Principios del tratamiento oncológico*. Publicaciones Permanyer. ISBN:978-84-92620-17-3, Barcelona, **2009**, p. 201-2018
32. M. A. Gómez del Rio, J. Benedeti González, *Farmacia Profesional*, 20, nº2, Feb. **2006**
33. G. Szakács, J. Paterson, J. Ludwig, M. M. Gottesman, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, 3, 219

34. C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D. B. Longley, P. G. Johnston, *Nat. Rev. Cancer*, **2013**, *13*, 714
35. S. P. Crouch, R. Kozlowski, K. J. Slater, J. Fletcher, *J. Immunol. Meth.*, **1993**, *160*, 81
36. V. Gurtu, S. R. Kain, G. Zhang, *Anal. Biochem.*, **1997**, *251*, 98
37. E. Conti, N. P. Franks, P. Brick, *Structure*, **1996**, *4*, 287
38. R. Deyes, *Promega Notes*, **2002**, nº 81, 32
39. L. M. Mooney, K. A. Al-Sakkaf, B. L. Brown, P. R. M. Dobson, *Br. J. Cancer*, **2002**, *87*, 909
40. A. M. Payne, J. Zorman, M. Horton, S. Dubey, J. T. Meulen, K. A. Vora, *J. Clin. Microbiol.*, **2013**, *51*, 2970
41. S. V. Sharma, D. A. Haber, J. Settleman, *Nat. Rev. Cancer*, **2010**, *10*, 241
42. L. H. Pettus et al., *J. med. Chem.*, **2016**, *59*, 2328
43. W-G. Su, H. Jia, G. Dai, Certain triazolopyridines, compositions thereof and their use in the treatment of cancer. 2013, US8507487B2, Hutchison Medipharma Ltd.
44. F. Chen, W. Wang, W. S. El-Deiry, *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, *80* (5), 724
45. A. Krishan, *J. Cell Biol.*, **1975**, *66*, 118
46. U. Schneider, H. U. Schwenk, G. Bornkamm, *Int. J. Cancer*, **1977**, *19* (5) 621
47. C. A. Tucker et al., *Leuk. Res.*, **2006**, *30*, 449
48. R. J. de Leeuw et al., *Hum. Mol. Genet.*, **2004**, *13*, 1827
49. G. H. Stein, *J. Cell. Physiol.*, **1979**, *99*, 43
50. N. Ishii, D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A. C. Diserens, E. G. Van Meir, *Brain. Pathol.*, **1999**, *9*, 469
51. C. Y. Thomas, M. Chuinard, M. Cox, S. Parsons, M. Stallings-Mann, R. García, R. Jove, R. Wharen, *Int. J. Cancer*, **2003**, *104*, 19

52. H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennam, *J. Nat. Cancer Inst.*, **1973**, *51*, 1409
53. M. E. Kaighn, K. S. Naravan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, L. W. Jones, *Invest. Urol.* **1979**, *17*, 16
54. A. Leibovitz, J. C. Stinson, W. B. McCombs, C. E. McCoy, K. C. Mazur, N. D. Mabry, *Cancer Res.*, **1976**, *36*, 4562
55. B. A. Kozikowski, T. M. Burt, D. A. Tirey, L. E. Williams, B. R. Kuzmak, D. T. Stanton, K. L. Morand, S. L. Nelson, *J. Biomol. Screen*, **2003**, *8*, 205
56. J. L. Sebaugh, *Pharm. Stat.* **2011**, *10*, 128
57. Graphpad\_Software, Graphpad Prism User Guide.  
[https://www.graphpad.com/guides/prism/6/curvefitting/index.htm?reg\\_dr\\_inhibit\\_variable.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/6/curvefitting/index.htm?reg_dr_inhibit_variable.htm)
58. N. A. Franken, H. M. Rodermond, S. J. Haveman, C. Van Bree, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2315

## **CAPITULO VI**

# **ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN CON ADN DE TRIAZOLPIRIDIL ARIL CETONAS ACTIVAS FRENTE A LEISHMANIA. INTERACCIÓN CON BSA**



## 1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis, infección transmitida por vectores y causada por protozoos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae y género *Leishmania*, es una de las enfermedades parasitarias más importantes. Esta enfermedad está considerada dentro de las enfermedades tropicales emergentes más relevantes, afectando a millones de personas en todo el mundo por lo que se ha convertido en uno de los objetivos de la Organización Mundial de la Salud.

Las diversas manifestaciones de esta enfermedad vienen determinadas por las diferentes especies de *Leishmania* que causan la infección. La forma más común es la leishmaniosis cutánea. La leishmaniosis visceral (VL), conocida también como Kala-azar, es la forma más severa pudiendo ser mortal si no es tratada. Además, VL empieza a surgir como una infección oportunista a tener en cuenta ya que se asocia con el VIH y esta co-infección está empezando a causar problemas que requieren urgente atención. Debido a la ausencia de vacunas efectivas y de un control satisfactorio del vector que transmite la enfermedad, el control de la enfermedad se basa únicamente en la quimioterapia, la cual depende de fármacos como antimoniales pentavalentes inyectables, estibogluconato de sodio y antimoniato de meglumina, desarrollados hace 50 años como fármacos de primera línea. En caso de recaída, los pacientes necesitan tratamiento con fármacos más tóxicos y de segunda línea como por ejemplo la anfotericina B o pentamidina.

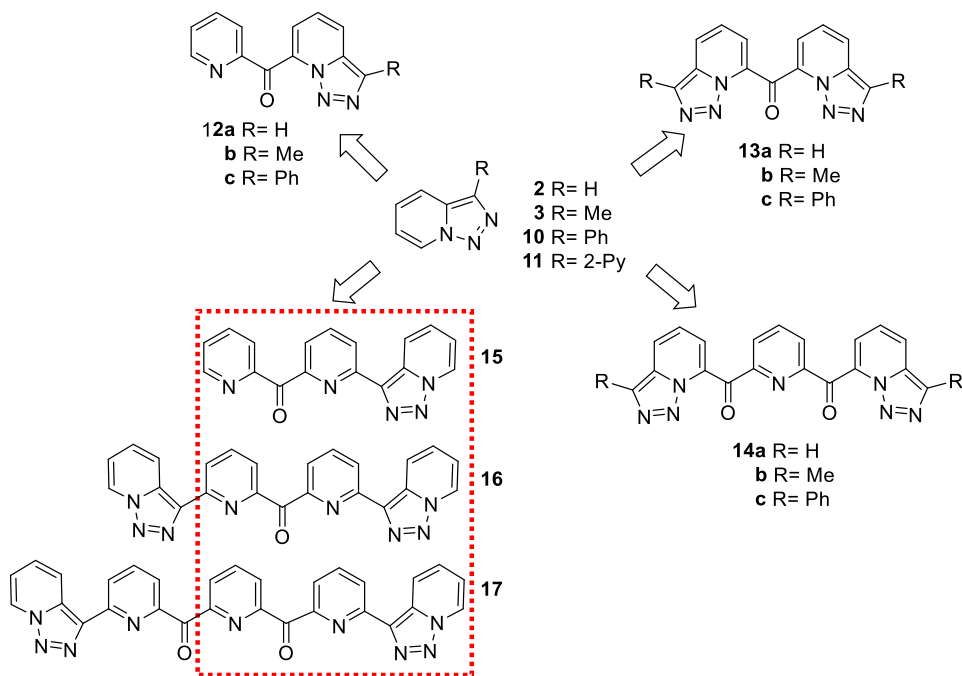
Una anfotericina B liposomal recientemente desarrollada, es altamente efectiva y prácticamente no muestra efectos secundarios importantes, por ello, este nuevo fármaco se ha situado en la primera línea de los tratamientos frente a la leishmania visceral. Desafortunadamente, esta anfotericina liposomal tiene un coste demasiado elevado para poder ser utilizada en países subdesarrollados.

Otras terapias efectivas son la miltefosina, una alquilfosfocolina, y el antibiótico aminoglucósido paramomicina. Hoy en día, muchos grupos de investigación se están centrando en la terapia combinada, la cual está teniendo resultados prometedores.<sup>1,2</sup> Sin embargo, los tratamientos actuales están lejos de proporcionar resultados satisfactorios para combatir la enfermedad de manera efectiva y satisfactoria. La aparición de mecanismos de resistencia, las rutas de administración, los tratamientos durante largos periodos de tiempo, la alta toxicidad y el elevado coste de los fármacos de segunda línea ponen de manifiesto la necesidad de investigar nuevos agentes quimioterapéuticos para combatir la leishmaniosis.<sup>3-7</sup>

Teniendo en cuenta estas premisas, nuestro enfoque se basa en el diseño de nuevos agentes antileishmania capaces de interactuar con el ADN, ya que existe una correlación entre la actividad antileishmania y otras enfermedades parasitarias y la afinidad con el DNA en un gran número de compuestos.<sup>8</sup>

Como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis, los 1,2,3-triazoles se consideran grupos funcionales de elevado interés en química médica,<sup>9,10</sup> ya que estas estructuras están presentes en moléculas con diversas actividades biológicas, como antibióticos,<sup>11,12</sup> antineoplásicos,<sup>13,14</sup> anti-VIH<sup>15</sup> o antifúngicos.<sup>16</sup> Igualmente, algunas moléculas que contienen la fracción 1,2,3-triazol en su estructura se han descrito recientemente como agentes antileishmania.<sup>17-20</sup> Durante los últimos años, la investigación de nuestro grupo se ha centrado en la funcionalización de [1,2,3]triazolo[1,5- $\sigma$ ]piridinas con un grupo heteroaril cetona. Esta estrategia ha permitido la obtención de triazolopiridil piridil cetonas **12a-c**, **13a**, **14a-c**, **15** y **17** (Figura VI.1).<sup>21-23</sup> Estos compuestos podrían ser buenos candidatos como agentes antileishmania así como buenos compuestos capaces de interactuar con el ADN.

Este capítulo se centra en la síntesis de nuevos compuestos **13b**, **13c** y **16** (Figura VI.1), con estructura triazolopiridil piridil cetona y en el estudio de la actividad *in vitro* e *in vivo* frente a la leishmania de los compuestos **12-17**. Además, con el objetivo de elucidar el mecanismo de acción de estos ligandos, también se realizaron estudios de interacción con ADN. Debido a la distribución global, y al metabolismo la eficacia de numerosos fármacos puede ser alterada por su afinidad con la albúmina sérica, por lo que también se han llevado a cabo estudios de interacción con Albúmina Sérica Bovina (BSA) con los compuestos que resultaron más activos.



**Figura VI.1.** Triazolopiridil piridil cetonas y triazolopiridil cetonas ensayadas.



## 2. ANTECEDENTES

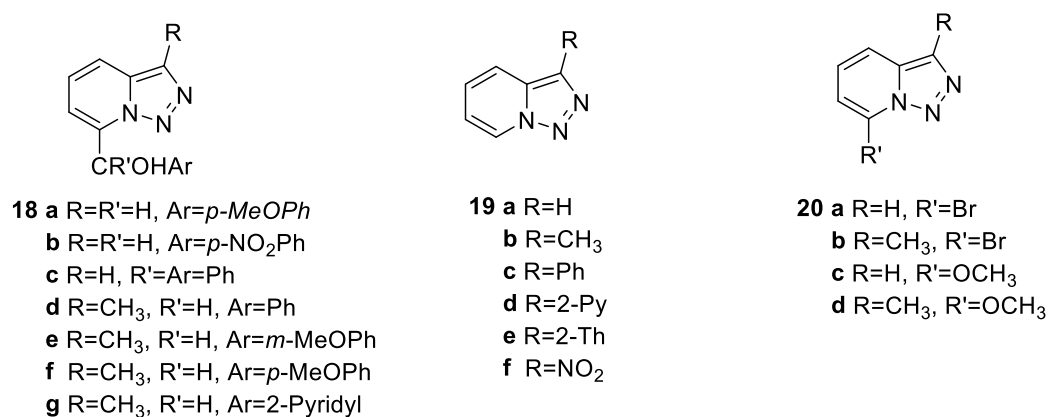
### 2.1. Aplicaciones biológicas de derivados de [1,2,3]triazolo[1,5- $\alpha$ ]piridina

La química de las triazolopiridinas ha sido estudiada ampliamente, tal como se ha expuesto en la introducción.<sup>24-28</sup> Aunque no hay triazolopiridinas que se usen como compuestos farmacéuticos, el potencial interés de estos compuestos en el campo de la actividad biológica ha hecho que se hayan llevado a cabo investigaciones en este ámbito. Se hicieron estudios preliminares del interés farmacológico como potenciales agentes cardio-vasculares,<sup>29</sup> y como nuevos inhibidores de la sintasa del óxido nítrico neuronal.<sup>30-35</sup> Más recientemente se ha estudiado la capacidad de interacción con ADN, las actividades leishmanicida<sup>36,37</sup> *in vitro* e *in vivo*, de derivados de triazolopiridinas, y también la interacción con DNA de nuevos diquats basados en triazolopiridinas y triazoloquinolinas.<sup>38</sup> A continuación se exponen los resultados descritos.

### 2.2. Síntesis y evaluación de 7-arylhidroximetiltriazolopiridinas como agentes cardiovasculares potenciales.<sup>29</sup>

Las 7-arylhidroximetiltriazolopiridinas pueden ser consideradas como análogos estructurales de los alcaloides benciltetrahidroisoquinolina y bisbenciltetrahidroisoquinolina que tienen la habilidad de bloquear los canales de calcio y/o antagonizar los  $\alpha_1$ -adrenoceptores y tener aplicación en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Una serie de derivados de triazolopiridinas **18** fueron sintetizados (Figura VI.2) y ensayada la actividad relajante del músculo liso vascular en anillo aórtico aislado precontraído por noradrenalina buscando actividad como antagonistas de  $\alpha_1$ -adrenoceptores presentes en este tejido y estimulados por noradrenalina. La falta de una acción relajante excluye la posibilidad de que estos compuestos actúen como antagonistas  $\alpha_1$ -adrenoceptores.

La adición de una solución despolarizante al anillo aórtico induce una respuesta contráctil sostenida en ausencia de endotelio. En estas condiciones, la apertura de canales de calcio sensibles al voltaje y la entrada de calcio promueve esta respuesta contráctil. La adición posterior de estos compuestos en concentraciones acumulativas, una vez que se alcanzó la meseta contráctil inducida por la solución de despolarización, no modificó el tono, lo que sugiere que ninguno de los compuestos probados puede bloquear la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes del voltaje.<sup>29</sup>



**Figura VI.2.** Triazolopyridinas con potencial aplicación farmacológica estudiadas

### 2.3. Evaluación biológica de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridinas como nuevos inhibidores de la sintasa del óxido nítrico neuronal.<sup>30-35</sup>

La importancia del óxido nítrico (NO) como un mensajero biológico en numerosos procesos fisiológicos se ha demostrado en un grado cada vez mayor en las últimas décadas. Esta molécula está implicada en varias funciones fundamentales, como la neurotransmisión,<sup>30</sup> la presión arterial y la regulación del flujo sanguíneo,<sup>31</sup> la agregación plaquetaria y la inflamación.<sup>32</sup> La sobreproducción de óxido nítrico juega un papel importante en una variedad de trastornos. El óxido nítrico se sintetiza en

varios tipos de células a partir de L-arginina por diferentes isoformas de óxido nítrico sintasa (NOS).

Una serie de inhibidores de esta enzima está constituida por heterociclos tales como indazoles sustituidos o imidazoles. Los indazoles 3- o 7-sustituidos son potentes inhibidores de nNOS.<sup>33,34</sup> [1,2,3]Triazolo[1,5-*a*]pyridines pueden ser consideradas como aza-análogos de indazoles, y se han hecho algunos estudios para valorar la posibilidad de que las triazolopiridinas sean inhibidores de esta enzima (NO).

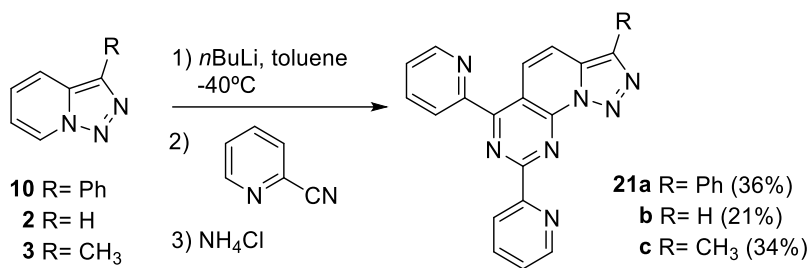
Varias triazolopiridinas 3- y 7- sustituidas **19** y **20** (Figura VI.2), se han sintetizado y se han probado.<sup>35</sup> Las triazolopiridinas evaluadas tienen una actividad pequeña, y los resultados indican que un grupo NH es necesario para la interacción con el NOS.

#### **2.4. Actividad antileishmania de derivados de triazolopiridinas.**

La leishmaniasis sigue siendo un significativo problema mundial, es de gran interés el desarrollo de nuevos fármacos para luchar contra esta enfermedad. En la literatura hay descritos estudios sobre la actividad antileishmania de dos familias de derivados de triazolopiridinas, triazolopiridopirimidinas, y sales de triazolopiridinio.

##### **2.4.1. Actividad antileishmania de triazolopiridopirimidinas.<sup>36</sup>**

Las triazolopiridopirimidinas **21a-c** se sintetizaron por reacción de litiación regioselectiva de la correspondiente triazolopiridina **2**, **3**, o **10** con *n*-BuLi en tolueno a -40 °C, y subsiguiente reacción de la 7-litio triazolopiridina obtenida con 2.1 equivalentes de 2-cianopiridina (Esquema VI.1).



**Esquema VI.1.** Síntesis de las triazolopiridopirimidinas **21a-c**

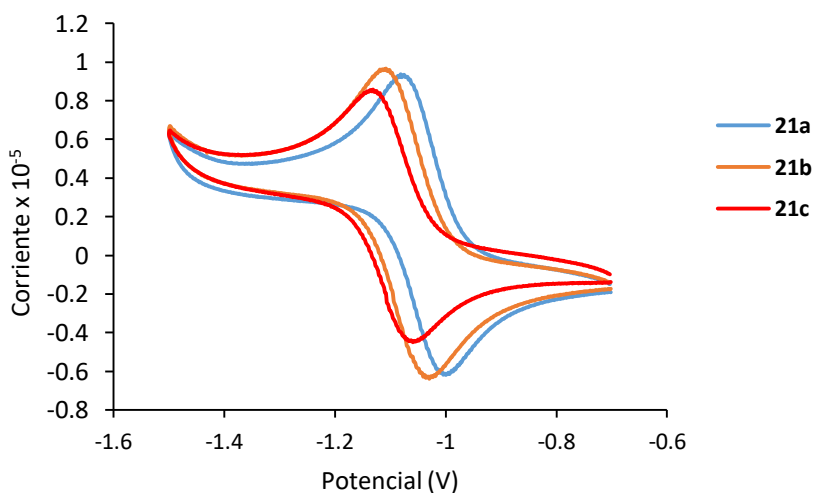
Es conocido que las propiedades fotofísicas y electroquímicas de los compuestos están íntimamente ligadas a su actividad biológica y, en particular, a su habilidad para inducir foto ruptura del ADN. Se han estudiado los espectros de absorción y luminiscencia de los compuestos **21a-c** que fueron realizados en el disolvente que se usa para ensayos biológicos (cacodilato 0,1M, pH=6,0, DMF 5%). Los datos espectroscópicos se recogen en la Tabla **VI.1**. Los tres compuestos presentan dos bandas de absorción bien definidas asignables a transiciones  $\pi-\pi^*$ : una banda intensa alrededor de 280 nm y otra de menor intensidad, centrada entre 356 y 387 nm. Notablemente, la sustitución no tiene efecto en el máximo alrededor de 280, mientras que el máximo a mayor longitud de onda depende significativamente de las propiedades electro-donantes de los sustituyentes en el anillo de triazol. El máximo de absorción desplazado hacia el rojo en **21a** y **21c** comparado con **21b** está en buen acuerdo con el efecto electro-donante del grupo fenilo y, en menor extensión, del metilo. El máximo de emisión de fluorescencia sigue el mismo orden:  $\lambda_{\max}$  (**21a**) >  $\lambda_{\max}$  (**21c**) >  $\lambda_{\max}$  (**21b**). Sin embargo, la naturaleza electrónica del sustituyente en el anillo de triazol tiene un mayor efecto en la posición del máximo de emisión comparada con la correspondiente banda de absorción.

**Tabla VI.1.** Datos de UV-vis fluorescencia de los compuestos **21**.<sup>a</sup>

	UV $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ( $\log \epsilon$ )	Emisión de fluorescencia $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	Excitación de fluorescencia $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$
<b>21a</b>	280 (4.21), 387 (3.95)	519	286, 376
<b>21b</b>	283 (4.31), 356 (4.14)	455	285, 360
<b>21c</b>	283 (4.24), 366 (4.01)	481	286, 368

<sup>a</sup>disolvente: cacodilato buffer 0.1 M, pH= 6.0, 5% DMF.

Las propiedades electroquímicas de las triazolopiridopirimidinas **21** fueron estudiadas por voltametría cíclica. Los voltagramas cíclicos registrados desde -0.7 V a -1,5 V, se muestran en la figura VI.3 y los datos electroquímicos están recogidos en la tabla VI.2.



**Figura VI.3:** Voltagrama cíclico de triazolopiridopirimidinas **21** (2.5 mM) en DMF. 21a (línea azul), 21b (línea naranja) 21c (línea roja). Rango de escaneo 50 mV/s.

**Tabla VI.2.** Datos electroquímicos de las triazolpiridopirimidinas

	$E_{pc}$ (V)	$E_{pa}$ (V)	$E_{1/2}$ (V)	$\Delta E_p$ (mV)	$I_{pa}/I_{pc}$
<b>21a</b>	-1.08	-1.00	-1.04	-80	0.93
<b>21b</b>	-1.10	-1.03	-1.07	-70	0.95
<b>21c</b>	-1.13	-1.05	-1.09	-80	0.88

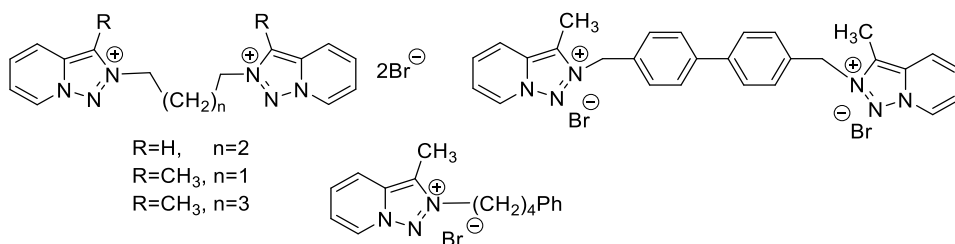
La habilidad de unión al ADN de esta serie de compuestos ha sido investigada por medio de valoraciones de absorción UV-vis y fluorescencia, inhibición de la emisión de estado estacionario con ferrocianuro, así como medidas de viscosidad. Los resultados mostraron que la triazolpiridopirimidina **21c** interacciona fuertemente con surcos de ADN. Además, estos estudios han revelado el papel clave del sustituyente fenilo en el anillo de triazol en la afinidad de unión de **21a-c**. Los compuestos **21a** y **21b** no presentan apreciable propensión a la unión al ADN, sin embargo, estas triazolpiridopirimidinas han demostrado presentar actividad de escisión de ADN fotoinducida, siendo **21a** más activa que **21b**. La fotoruptura del ADN mediada por estos compuestos tiene lugar principalmente a través de escisión de cadena simple y en menor extensión a través de cortes de doble cadena. Investigaciones mecánicas usando atrapadores de radicales mostraron que ambos **21a** y **21b** generan especies de oxígeno reactivo (oxígeno singlete, y radicales superóxido e hidroxilo) tras la radiación.

Se ha estudiado también la actividad antiprotozoaria frente a diferentes *Leishmania* spp. (*L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis*). Las triazolpiridopirimidinas **21b** y **21c** resultaron ser más activas y selectivas *in vitro* que la droga de referencia (miltefosina) contra amastigotes de *L. infantum*. El compuesto

**21c** exhibe alta actividad leishmanicida contra *L. Infantum* formas de bazo en ensayos *in vivo*.<sup>36</sup>

#### **2.4.2. Actividad antileishmania de sales de triazolopiridinio.**<sup>37</sup>

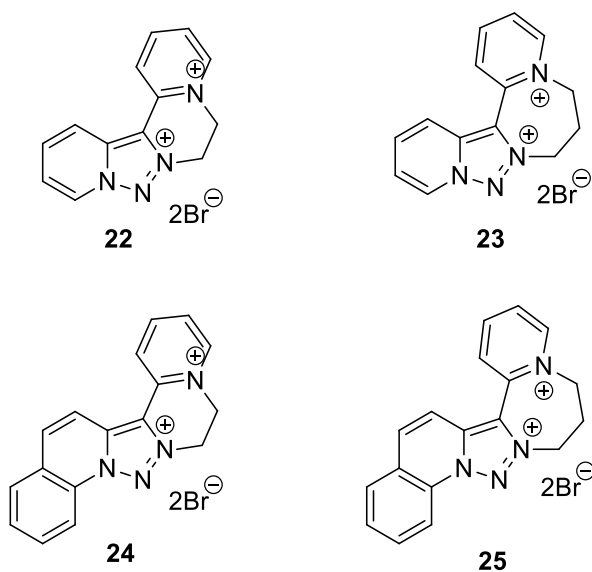
Recientemente se ha llevado a cabo un estudio *in vitro* sobre la actividad leishmanicida de monosales y disales de triazolopiridinio sintetizadas por primera vez a partir de [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina **2** y 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina **3**, fácilmente sintetizadas a partir de productos comerciales (véase Esquema **1.2** pag. 5). Las disales son preparadas por reacción de la correspondiente triazolopiridina y un dibromo compuesto. En el caso de las mono sales se utiliza un procedimiento similar utilizando un exceso de un monobromo derivado. Todos los compuestos ensayados son activos, siendo de destacar los representados en la figura **VI.4** que presentan una eficacia mejorada y una menor toxicidad que la del fármaco de referencia Glucantime sobre tres especies de Leishmania (*L. infantum*, *L. braziliensis*, y *L. donovani*). Además, estos compuestos son potentes inhibidores de Fe-SOD en las tres especies de parásitos consideradas, mientras que su impacto en CuZn-SOD humano fue bajo. La alta actividad, baja toxicidad, estabilidad y solubilidad, bajo coste de los productos de partida y su sencilla síntesis hace de estos compuestos moléculas adecuadas para el desarrollo de agentes antileishmanicidas asequibles. Además, estos compuestos muestran una acción significativa en el metabolismo de la glucosa de los parásitos, en adición a la acción inhibitoria de Fe-SOD.



**Figura VI.4.** Compuestos antileishmania

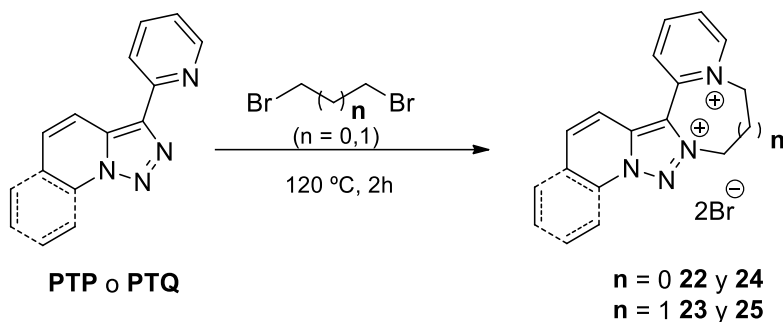
## 2.5. Interacción con ADN de nuevos diquats basados en triazolopiridinas y triazoloquinolinas.<sup>38</sup>

Se han sintetizado nuevos diquats **22-25** en rendimientos excelentes (Figura VI.5). Los productos de partida para su síntesis han sido 3-(2-piridil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina (PTP) y 3-(2-piridil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]quinolina (PTQ) (Figura VI.6).



**Figura VI.5.** Diquats objetivo





**Figura VI.6.** Procedimiento sintético para los compuestos **22-25**

Estos compuestos pueden adoptar conformaciones helicoidales como dos enantiómeros (*P* o *M*), que son interconvertibles a través de una barrera energética muy pequeña, de acuerdo con estudios teóricos, lo que hace que sea muy difícil resolverlos. Los valores del potencial de reducción de estas moléculas están de acuerdo con los registrados para el catión diquat original. Estos compuestos pueden interactuar con ADN ya sea electrostáticamente o por intercalación. Se han realizados estudios de desnaturalización, valoraciones de espectroscopia UV-Visible y fluorescencia en presencia de CT-ADN; así, la naturaleza de la interacción con el ADN se determinó que era electrostática para los derivados de **PTP**, **22** y **23**, y para los derivados de **PTQ**, **24** y **25** fueron confirmados tanto un modo de enlace electrostático como la intercalación.

En general se ha demostrado que el comportamiento de los derivados diquats se puede controlar por el tamaño del anillo de la parte no aromática y por el número de anillos aromáticos que conduce a moléculas que pueden interactuar exclusivamente por fuerzas electrostáticas o a través de una combinación de modos de enlace electrostático e intercalado.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Síntesis de triazolopiridil piridil cetonas y triazolopiridil cetonas

La síntesis de los compuestos **12a-c**,<sup>21</sup> **13a**,<sup>22</sup> **14a-c**,<sup>23</sup> **15**,<sup>21</sup> y **17**,<sup>23</sup> fue publicada anteriormente por nuestro grupo de investigación. Las nuevas bistrizolopiridil cetonas **13b** y **13c** se han sintetizado mediante litiación regioselectiva de las correspondientes [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridinas **3** y **10** en posición 7 con *n*-BuLi en tolueno a -40 °C, seguida por la adición de la triazolopiridina litiada a 0.5 equivalentes de dietil carbonato. Con esta metodología las bistrizolopiridil cetonas **13** se sintetizaron con rendimientos moderados (Figura VI.7).

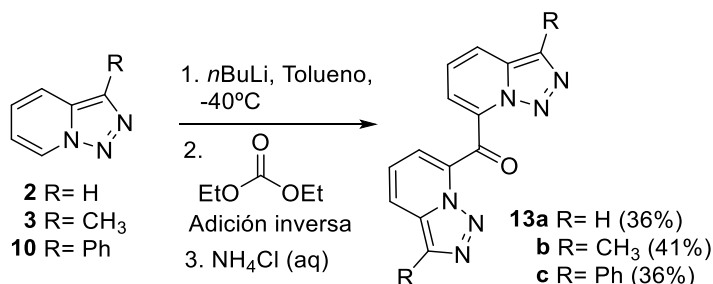


Figura VI.7. Síntesis de bistrizolopiridil cetonas **13**.

Cuando se llevó a cabo la misma reacción partiendo de la 3-(2-piridil)-triazolopiridina **11**, solo el compuesto **16B** fue aislado con rendimientos moderados (Figura VI.8), sin observar trazas del producto **16A**. La formación de este tipo de estructura (**B**) se justifica por la característica isomerización anillo-cadena de las 7-sustituidas 3-(2-piridil)-triazolopiridinas, (expuesta en el capítulo II) que proporciona estructuras tipo **A** o tipo **B** dependiendo del sustituyente en la posición 7.<sup>39</sup> Los sustituyentes electrón-donores proporcionan la estructura **A**, mientras que los electrón-aceptores dan lugar a la estructura tipo **B**, (a partir de ahora compuesto **16**).

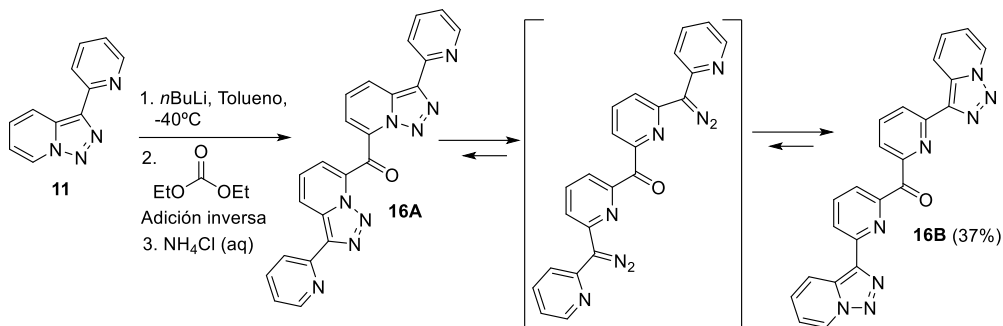


Figura VI.8. Síntesis de la bistriazolopiridil piridil cetona **16**.

## 3.2. Actividad biológica

### 3.2.1. Actividad *In Vitro* frente a *Leishmania* spp

En este apartado se muestran los resultados de la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los compuestos **12-17** frente a diferentes especies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis*) así como de su citotoxicidad frente a macrófagos J774, siguiendo los protocolos establecidos (ver parte experimental). Los resultados de los compuestos activos se recogen en la tabla VI.3. Tal y como se indica en esta tabla, los compuestos **16** y **17** mostraron ser los más efectivos. Ambos mostraron actividad en un rango micromolar frente a promastigotas de *Leishmania* spp., sin provocar la citotoxicidad de macrófagos J774. Aunque su potencia frente a algunas especies de *Leishmania* fue menor comparado con la miltefosina, fármaco estándar utilizado como referencia, en general nuestros compuestos mostraron mejor índice de selectividad ( $IS = CC_{50}/IC_{50}$ ), lo que indica que estos compuestos podrían resultar una alternativa terapéutica.

**Tabla VI.3:** Actividad leishmanicida de las triazolopiridinas seleccionadas en formas extracelulares (*Leishmania* promastigotes) y actividad citotóxica en macrófagos J774.

Comp.	Parásitos IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)								Líneas celulares CC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μM)
	<i>L. inf</i>	SI <sup>c</sup>	<i>L. amaz</i>	SI	<i>L. braz</i>	SI	<i>L. guy</i>	SI	Macrófagos J774
<b>12c</b>	173.1	>1.9	105.8	>2.8	168.8	>1.8	125.8	>2.4	NC <sup>e</sup>
<b>15</b>	230.7	>1.3	107.9	>2.8	189.6	>1.6	108.7	>2.8	NC
<b>13c</b>	NA <sup>f</sup>		NA		56.8	>2.5	53.8	>4,5	NC
<b>16</b>	47.3	>6.3	89.6	>3.3	26.8	>11.2	29.3	>10.2	NC
<b>17</b>	99.8	>3.0	53.7	>5.6	59.4	>5.1	28.7	>10.4	NC
<b>M<sup>d</sup></b>	21.3	7.7	28.3	5.8	27.1	6.0	53.6	3.1	163.6

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub>, Concentración del compuesto que produce una reducción del parásito al 50%; <sup>b</sup>CC<sub>50</sub>, concentración del compuesto que causa una reducción del 50% de la viabilidad celular en cultivos celulares tratados respecto a cultivos celulares no tratados; <sup>c</sup>SI = CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>; <sup>d</sup>M, miltefosina; <sup>e</sup>NC (no citotóxico), CC<sub>50</sub> ≥ 300 μM; <sup>f</sup>NA, no activa a concentraciones ensayadas.

Cabe destacar que el compuesto **13c** fue activo exclusivamente frente promastigotes de *L. brazilensis* (IC<sub>50</sub> = 56.8 μM) y *L. guyanensis* (IC<sub>50</sub> = 53.8 μM) lo que indica una diferente susceptibilidad entre las especies de *Leishmania*. Los compuestos **12c** y **15** resultaron ser menos activos que la miltefosina. Sin embargo, su débil citotoxicidad representa una ventaja a destacar frente al fármaco de referencia.

Los resultados mostrados por los compuestos **15**, **16** y **17** parecen indicar que la fracción de triazolopiridil piridil cetona mejora la actividad antiprotozoaria, ya que estos compuestos han demostrado ser efectivos agentes antileishmanicida. Además, la fracción 3-fenil triazolopiridina presente en los compuestos **12c** y **13c**, también parece favorecer la actividad antileishmania.

En el hospedador mamífero los parásitos de la leishmania existen como amastigotes intracelulares dentro de fagolisosomas o macrófagos. Por lo tanto, las triazolopiridinas **16** y **17**, las cuales han mostrado ser las más activas en el ensayo de antipromastigotes (SI = 3.3-11.2 para el compuesto **16** y 3.0-10.4 para el compuesto **17**), podrían ser buenos candidatos para siguientes investigaciones clínicas relevantes frente a las formas amastigotes de la leishmania. Por lo tanto, estas triazolopiridinas fueron ensayadas frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. infantum* (tabla VI.4). Cuando el ensayo se llevó a cabo con amastigotes de *L. amazonensis*, la actividad antileishmania de los compuestos ensayados disminuye frente a las formas intracelulares en comparación con las formas extracelulares. En el caso de *L. infantum*, se observó un perfil más elevado frente a los amastigotes que los promastigotes en ambos compuestos, lo que revela una aplicación terapéutica prometedora.

**Tabla VI.4.** Actividad *In vitro* de las triazolopiridinas **16** y **17** en las formas intracelulares (amastogotes) de *L. infantum* y *L. amazonensis*.

Compuesto	Amastigotes intracelulares			
	<i>L. infantum</i>	SI <sup>b</sup>	<i>L. amazonensis</i>	SI
	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)		IC <sub>50</sub> (μM)	
<b>16</b>	19.5	>15.3	114.6	>2.6
<b>17</b>	38.0	>7.9	NA <sup>d</sup>	—
<b>M<sup>c</sup></b>	23.7	5.7	20.9	6.5

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>, concentración del compuesto que produce un 50% de reducción en los parásito, <sup>b</sup> SI = CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>, <sup>c</sup> M, miltefosina, <sup>d</sup> NA, no activo a las concentraciones estudiadas.

### 3.2.2. Eficacia *In Vivo* frente a *L. infantum*

Debido a los resultados mostrados en ensayos *in vitro*, se evaluó la eficacia *in vivo* de los compuestos **16** y **17** en modelos murinos de infección aguda por *L. infantum* (tabla VI.5). Los compuestos fueron ensayados a concentraciones de 5 mg/kg, administrados diariamente vía intraperitoneal hasta un total de 5 dosis, utilizando un protocolo anteriormente descrito por M. A. Dea-Ayuela *et al.* en el año 2009.<sup>40</sup> Desafortunadamente, el compuesto **17** fue totalmente inactivo frente a los parásitos hepáticos; sin embargo, sí que mostró buena actividad antileishmania frente a las formas de bazo del parásito ( $78.2 \pm 38.6\%$  de reducción respecto a los controles). La triazolopiridina **16** mostró una alta eficacia frente a las dos formas del parásito, la hepática y la de bazo ( $99.3 \pm 0.7$  y  $92.8 \pm 12.2\%$  de reducción, respectivamente, respecto a los controles no tratados). No se observaron signos evidentes de toxicidad, como pérdida de peso o pelo, al final del ensayo en ninguno de los animales tratados. Esto sugiere, claramente, que el compuesto **16** fue bien tolerado por los ratones infectados. Por lo tanto, este compuesto puede ser considerado como un prometedor fármaco prototipo para el tratamiento de la leishmania.

**Tabla VI.5.** Actividad *In vivo* de triazolopiridinas **16** y **17** en *L. infantum* and *L. amazonensis*, formas intracelular (amastigotes).

Compuesto	Porcentaje de Reducción <sup>a</sup> (Mean ± SD <sup>b</sup> )	
	Bazo	Hígado
<b>16</b>	99.3±0.7*	92.8±12.2*
<b>17</b>	78.2±38.6	NS <sup>c</sup>

<sup>a</sup> reducción de la carga de parásitos en bazos e hígados de ratones tratados en relación con los grupos control (no tratados) expresados como porcentaje

<sup>b</sup> La desviación estándar (SD) fue calculada por comparación de los datos individuales para cada animal tratado con el valor medio para el grupo de control

<sup>c</sup> NS: no supresión en la carga del parásito

\*  $P < 0.05$

### 3.2.3. Estudios de Interacción con ADN

Es sabido que las triazoloacridonas, cuya estructura es muy similar a las triazolopiridinas, tienen la capacidad de interactuar fuertemente con el DNA.<sup>41,42</sup> Por otra parte, ciertos fármacos antileishmania como la pentamidina, presentan un mecanismo de acción en el cual la interacción con los ácidos nucleicos es un paso crucial.<sup>43</sup> Debido a esto y con el objetivo de elucidar el mecanismo de acción de estos compuestos, se realizaron ensayos de interacción con *calf thymus* ADN (CT-DNA) y los compuestos más activos **16** y **17** y el compuesto menos activo **15**. Estos ensayos se llevaron a cabo mediante valoraciones UV-visible y medidas de viscosimetría.

La monitorización de la interacción ADN-compuesto mediante espectroscopía UV-visible depende del hecho de que el espectro de absorción electrónica de los compuestos es alterado tras la interacción con el ADN.<sup>44,45</sup> Los experimentos de valoración UV-visible de los compuestos **16** y **17** se llevaron a cabo utilizando una

concentración determinada del compuesto y sucesivas adiciones de concentraciones crecientes de CT-DNA. Como se muestra en la figura **VI.9**, se observó un importante hipocromismo en las bandas características del compuesto **16** ( $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$ ) y **17** ( $\lambda_{\text{max}} = 322 \text{ nm}$ ) tras la adición de CT-DNA. Este hipocromismo alcanzó un 60% a una relación  $[\text{DNA}]/[\text{compuesto}]$  de 3 en ambos casos, lo que sugiere que **16** y **17** interaccionan fuertemente con los ácidos nucleicos (Figura **VI.9**).

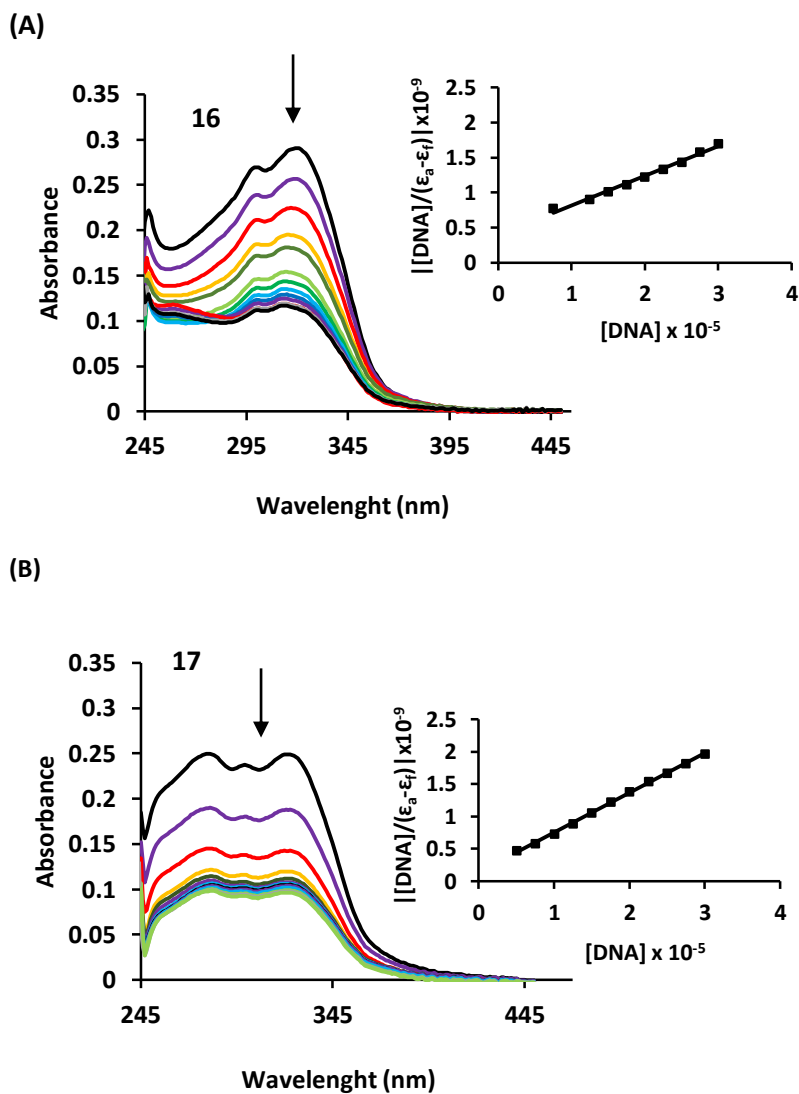
La constante de interacción ( $K_b$ ) para los dos compuestos se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:<sup>46</sup>

$$[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{ADN}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)] \quad [1]$$

Donde  $[\text{ADN}]$  es la concentración de ADN en nucleótidos,  $\epsilon_a$  es el coeficiente de extinción molar aparente calculado mediante  $A_{\text{obs}}/[\text{compuesto}]$ ,  $\epsilon_f$  corresponde al coeficiente de extinción molar para el compuesto libre y  $\epsilon_b$  es el coeficiente de extinción molar para el compuesto en su forma ADN-compuesto. La  $K_b$  es calculada por la relación de la pendiente en la intersección de los puntos  $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  frente a  $[\text{ADN}]$ .

Los valores de la  $K_b$ ,  $1.14 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  para el compuesto **16** y  $3.26 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  para el compuesto **17**, son similares a aquellas calculadas para moléculas pequeñas con una fracción de triazol en su estructura las cuales son capaces de interaccionar con el ADN.<sup>47</sup> Estos valores son también indicativos de una elevada afinidad de interacción de ambos compuestos. Además, la magnitud de la constante de unión muestra que el compuesto **17** se une al ADN más fuertemente que el compuesto **16**.

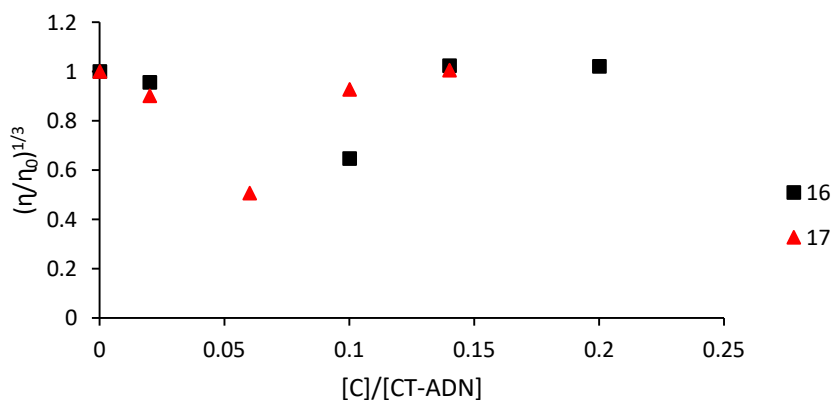




**Figura VI.9.** Espectro de absorción electrónica de 10  $\mu\text{M}$  para el compuesto **16** (A) y 10  $\mu\text{M}$  para el compuesto **17** (B) (0.1 M tampón cacodilato, pH = 6.0, 10% DMF) en presencia de concentraciones crecientes de CT-DNA (5-30  $\mu\text{M}$ ). Las flechas muestran los cambios en la absorbancia con el incremento en la concentración de ADN. Inset: Plot de  $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{ADN}]$ .

Normalmente, los espectros de absorción de UV-visible del ADN-compuesto muestran simultáneamente un efecto hipocrómico y el desplazamiento de la longitud de onda, lo que se conoce como efecto batocrómico. Sin embargo, tal comportamiento no es indicativo de un modelo de interacción; la intercalación, unión a los surcos y una asociación externa con el fármaco pueden inducir efectos similares cualitativamente.

La viscosimetría, la cual es sensible a cambios de longitud del ADN, es uno de los métodos menos ambiguos para estudiar los modelos de interacción con el ADN de moléculas en solución.<sup>48</sup> Es sabido que los intercaladores clásicos producen una prolongación de la hebra del ADN ya que los pares de bases se separan para poder acomodar el compuesto con el que interaccionan, provocando un aumento en la viscosidad. Sin embargo, los compuestos que interaccionan con los surcos o que presentan interacciones electrostáticas no modifican la viscosidad o inducen cambios significativos.<sup>49</sup> Nuestros resultados han mostrado que los compuestos **16** y **17** no provocan efectos significativos en la viscosidad relativa del CT-DNA (Figura VI.10).



**Figura VI.10:** Viscosidad de CT-ADN (50  $\mu$ M) en tampón cacodilato 0.1 M (pH = 6.0), 10 % DMF en presencia de concentraciones crecientes del compuesto **16** o compuesto **17** [ $1.0 \times 10^{-6}$  M hasta  $1.0 \times 10^{-5}$  M]

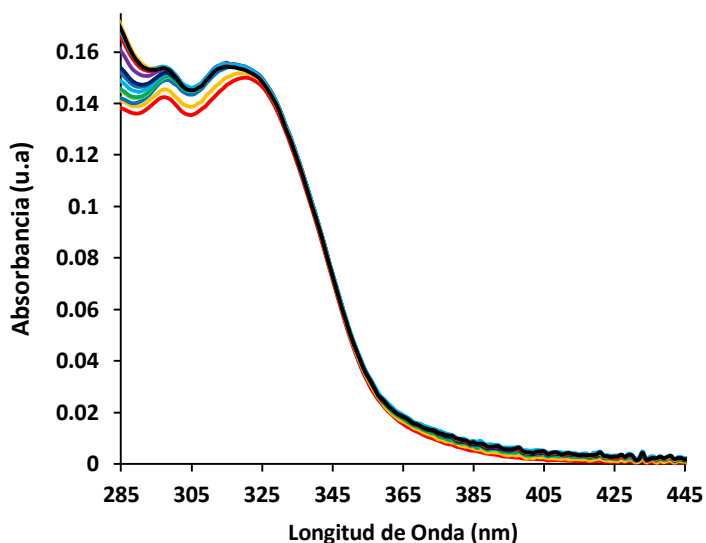
Por lo tanto, podemos descartar la intercalación como método de interacción de los compuestos **16** y **17** con el ADN. Ya que los resultados obtenidos de las valoraciones UV-visible sugieren claramente que **16** y **17** presentan una gran afinidad por el ADN, se propone una interacción mediante unión a los surcos. Probablemente, este tipo de unión se da mediante interacciones hidrofóbicas y/o enlaces de hidrógeno entre las nucleobases y los átomos de nitrógeno y oxígeno de las triazolopiridil cetonas. En este sentido, la mayor afinidad por el DNA del compuesto **17** podría explicarse teniendo en cuenta la mayor capacidad de este compuesto para formar enlaces de hidrógeno, ya que presenta una unidad más de piridil cetona en su estructura que el compuesto **16**.

Recientemente se han publicado estudios que relacionan la unión a los surcos del ADN con la actividad antiprotozoaria de diversos compuestos.<sup>8</sup> En este contexto, se pensó que determinar si existe alguna correlación entre el efecto antileishmania de

nuestros compuestos y su habilidad para interactuar con el ADN podría ser interesante. En principio, los compuestos con una mayor afinidad por el ADN deberían ser los agentes leishmanicidas más potentes.

Se investigó la posible correlación entre la actividad antiprotozoaria (medida como  $IC_{50}$ ) y la afinidad de unión al ADN (medida como  $K_b$ ). Excepto para las formas extracelulares de *L. amazonensis*, no se observó ninguna correlación directa. De hecho, el compuesto **16**, el cual mostró ser mejor agente leishmanicida, presentó una menor afinidad de unión al ADN. Con el objetivo de investigar si la unión al ADN de los compuestos **16** y **17** tiene un papel importante en el mecanismo antileishmania, se estudió la unión al ADN del compuesto menos activo **15**. Se monitorizó el espectro UV-visible del compuesto **15** en presencia de cantidades crecientes de CT-ADN. Tal y como se muestra en la figura **VI.11**, no se observaron cambios significativos, por tanto, el compuesto menos activo no presenta afinidad significativa por el ADN.

Ya que los compuestos **16** y **17** presentan buena actividad leishmanicida y se unen fuertemente al ADN, se puede deducir que la interacción con el ADN juega un papel muy importante en dicha actividad leishmanicida. No obstante, el acceso de estos compuestos a las células, así como mecanismos de acción adicionales como la inhibición enzimática, también podrían contribuir a la actividad antiprotozoaria de nuestros compuestos.<sup>8</sup>



**Figura VI.11.** Espectro de absorción electrónica 10  $\mu\text{M}$  del compuesto **15** (A) (0.1 M cacodilato buffer, pH= 6.0, 10% DMF) en presencia de cantidades crecientes de CT-ADN (5-30  $\mu\text{M}$ ).

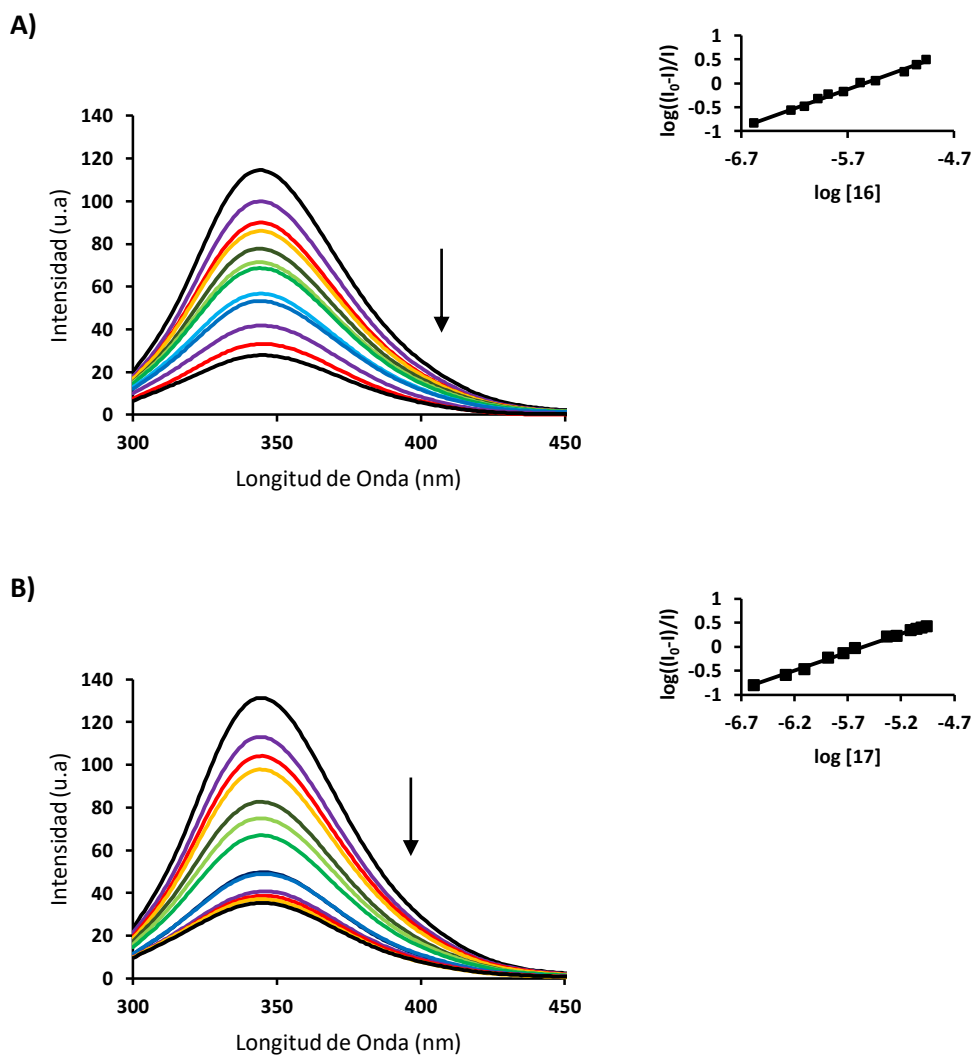
### 3.2.4. Estudios de Interacción con BSA

La albúmina sérica (AS), como la proteína más abundante en el sistema circulatorio, actúa como transportador de numerosos compuestos endógenos y exógenos.<sup>50,51</sup> La afinidad de los fármacos por la AS influye directamente en su concentración plasmática y como consecuencia contribuye a la magnitud de sus actividades biológicas *in vivo*. Generalmente, una débil interacción AS-fármaco da lugar a una menor distribución, mientras que una fuerte interacción disminuye la concentración del fármaco libre en plasma.<sup>52</sup> Estudios de unión AS-fármaco *in vitro*, considerado como un modelo en química proteica, puede proporcionar información sobre las características estructurales que determinan la eficacia terapéutica de los fármacos

y puede sugerir nuevas estrategias para el diseño de nuevos fármacos. En este sentido, los estudios de interacción de AS y los compuestos **16** y **17**, son de gran interés, ya que los dos compuestos han mostrado ser buenos agentes leishmanicidas.

#### **3.2.4.1. Estudios de desactivación fluorescente de BSA con 16 y 17**

La interacción de **16** y **17** con la BSA (Albúmina Sérica Bovina) fue monitorizada mediante estudios de desactivación fluorescente de la proteína con concentraciones crecientes de ambos compuestos. Generalmente, la fluorescencia de una proteína está causada por tres componentes intrínsecos, residuos de triptófano, tirosina y fenilalanina. La desactivación de la fluorescencia puede ser causada por una variedad de interacciones moleculares incluyendo reacciones de estado excitado, reordenamiento molecular, transferencia de energía, colisiones moleculares y formación de complejos en estado fundamental.<sup>53</sup> Se registró la emisión del espectro de la BSA, en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos y en un rango de longitud de onda de 300-450 nm excitando la proteína a 280 nm. Tal y como se muestra en la figura **VI.12**, en ambos casos la intensidad de fluorescencia de la proteína sufre un descenso progresivo con el aumento de la concentración del compuesto. La desactivación en la intensidad de emisión puede atribuirse a los cambios en el microambiente alrededor del residuo de triptófano y/o a la inducción del despliegue de la proteína, ambos son resultado de la interacción con los compuestos.<sup>54</sup>



**Figura VI.12:** Espectros de emisión de fluorescencia de la BSA ( $1.3 \times 10^{-6}$  M) en presencia de concentraciones crecientes de **16** (A) y **17** (B) [ $2.6 \times 10^{-7}$  a  $1.1 \times 10^{-5}$  M]. Las flechas indican el efecto de los compuestos en la emisión de fluorescencia de la BSA. Inset: Gráfica:  $\log [(I_0 - I)/I]$  versus  $\log [Q]$ ;  $[Q] = [16]$  o  $[17]$ .

Normalmente, la desactivación de la fluorescencia se describe mediante la siguiente ecuación de Stern-Volmer:<sup>55</sup>

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad [2]$$

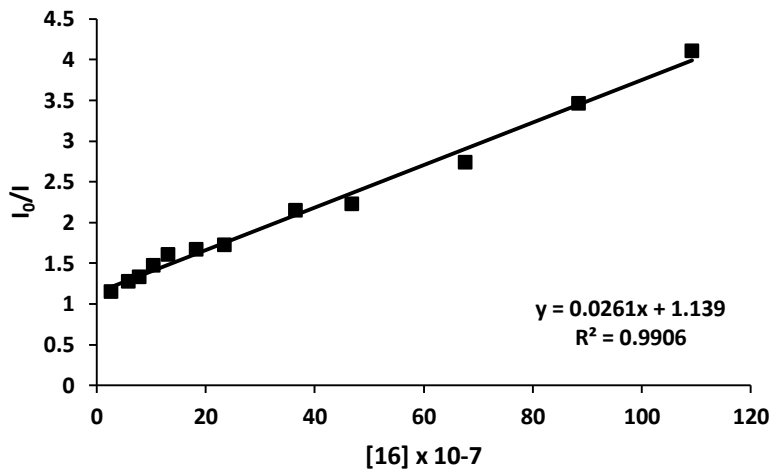
Donde  $I_0$  e  $I$  son las intensidades de fluorescencia del fluoróforo en ausencia y presencia del *quencher*,  $K_{SV}$  es la constante de Stern-Volmer,  $[Q]$  es la concentración del *quencher*,  $k_q$  es la constante de velocidad de desactivación y  $\tau_0$  es el tiempo de vida media de la biomolécula en ausencia del *quencher* ( $10^{-8}$  s para BSA).<sup>56</sup>

La gráfica  $I_0/I$  frente  $[Q]$  representa una buena relación lineal (figura VI.13). El valor de la  $K_{SV}$ ,  $2.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  para **16** y  $2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  para **17** son prácticamente iguales. Es conocido que una gráfica lineal de Stern-Volmer representa un solo mecanismo de desactivación, ya sea estático o dinámico.<sup>57</sup>

El *quenching* dinámico se refiere a un proceso en el cual el fluoróforo y el *quencher* entran en contacto durante la existencia transitoria del estado excitado, mientras que el *quenching* estático consiste en la formación del complejo *quencher*-fluoróforo en el estado fundamental. La constante de *quenching* bimolecular obtenida ( $k_q$ ),  $2.6 \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $2.4 \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para **16** y **17**, respectivamente, es 1000 veces mayor que el valor máximo para la desactivación controlada por difusión ( $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Esta observación indica que el mecanismo de desactivación no se inició por un *quenching* dinámico sino mediante un *quenching* estático.<sup>56</sup>



A



B

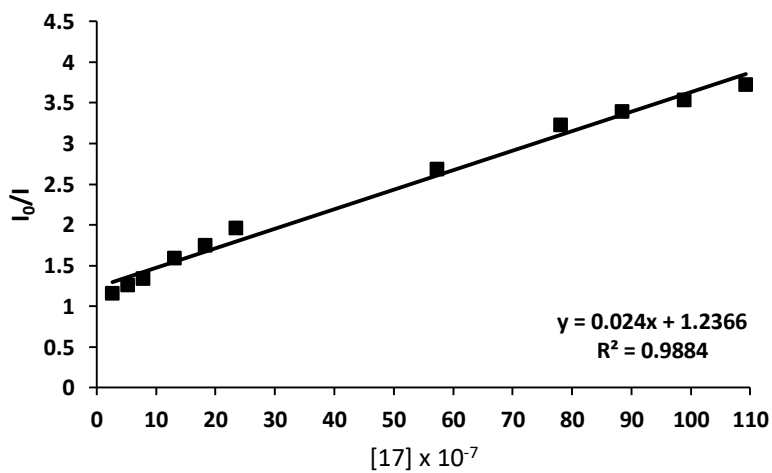
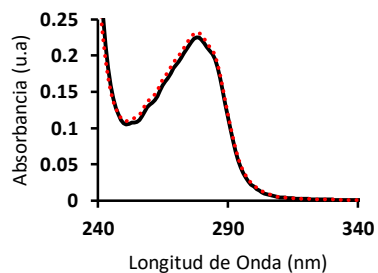
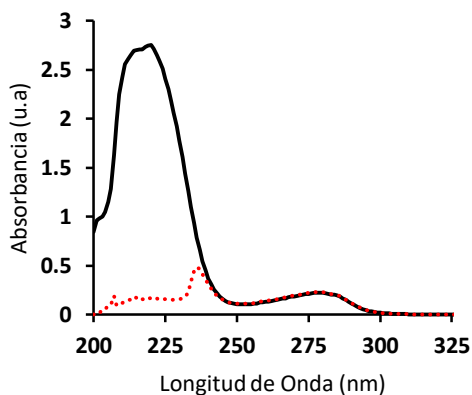


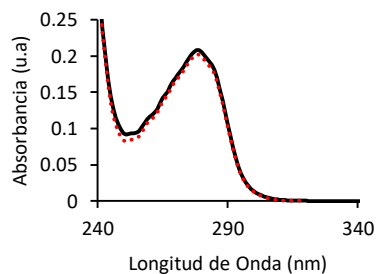
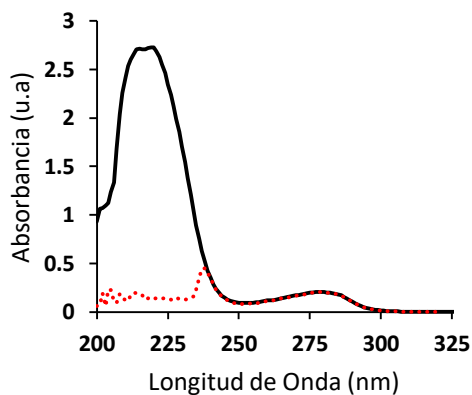
Figura VI.13: Gráfica Stern Volmer de BSA-16 (A) y de BSA-17 (B).

Un método simple para diferenciar entre los dos mecanismos mencionados anteriormente es la absorción espectroscópica UV-visible. El *quenching* dinámico solo afecta a los estados excitados del fluoróforo, por tanto, no habrá cambios en el espectro de absorción. Por el contrario, la formación del complejo en el estado fundamental, normalmente resultará en una perturbación del espectro de absorción del fluoróforo.<sup>58</sup> La figura **VI.14** muestra la absorción UV de la BSA en ausencia y presencia de los compuestos **16** y **17**. La proteína presenta dos bandas a 220 nm y 280 nm, las cuales se deben al contenido de  $\alpha$ -hélice en la proteína y los residuos de amino ácidos aromáticos, respectivamente.<sup>58</sup> Un importante descenso en la absorbancia en la banda a 220 nm se observa tras la adición de ambos compuestos. Este hecho es inducido por la perturbación de la hélice alfa de la proteína al interaccionar con los compuestos.<sup>59</sup> Por otra parte, la intensidad de absorción de la banda a 280 nm está ligeramente modificada, lo cual indica, hasta cierto punto, que el microambiente de los residuos de los amino ácidos aromáticos fue alterado. Todos estos cambios que se atribuyen a la formación de un complejo entre el compuesto y la BSA apoyan la teoría de que el proceso de *quenching* es básicamente el estático, como sugieren los valores de la  $k_q$ .<sup>56,58,60</sup>

A)



B)



**Figura VI.14:** Espectros de Absorción de la BSA ( $5.2 \times 10^{-6}$  M) en ausencia (línea negra) y BSA ( $5.2 \times 10^{-6}$  M) más compuesto **16** (A) ( $2.6 \times 10^{-6}$  M) (línea roja discontinua) y **17** (B) ( $2.6 \times 10^{-6}$  M) en tampón cacodilato 0.1 M (pH= 6.0), 10% DMF. La figura insertada arriba muestra los espectros ampliados en el rango de longitud de onda entre 240 y 340 nm.

Cuando las moléculas pequeñas se unen a macromoléculas, el equilibrio entre moléculas libres y formando un complejo se representa mediante la siguiente ecuación:<sup>55</sup>

$$\log [I_0-I/I] = \log K_b + n \log [Q] \quad [3]$$

donde la  $K_b$  y  $n$  son la constante de unión y el número de los sitios de unión, respectivamente.

De acuerdo a los resultados experimentales, la regresión linear de  $\log(I_0-I)/I$  frente a  $\log [Q]$  se observa en el recuadro insertado de la figura **VI.12**. Los valores correspondientes a  $K_b$  y  $n$ , calculados a partir de la pendiente y la intersección de la recta se resumen en la tabla **VI.6**. Los valores de la constante de unión indican que **16** y **17** presentan una gran afinidad por la BSA. Además, estos datos sugieren que hay una cierta preferencia de la BSA por unirse al compuesto **16**.

**Tabla VI.6:** Parámetros de unión para la interacción **16** y **17** con BSA en ausencia y en presencia de marcadores de sitio

	Compuesto 16		Compuesto 17	
	$K_b (M^{-1})$	$n$	$K_b (M^{-1})$	$n$
BSA	$2.5 \times 10^4$	0.79	$1.9 \times 10^4$	0.77
BSA + warfarina	$9.3 \times 10^3$	0.74	$8.2 \times 10^3$	0.75
BSA + ibuprofeno	$5.3 \times 10^3$	0.68	$3.8 \times 10^3$	0.69

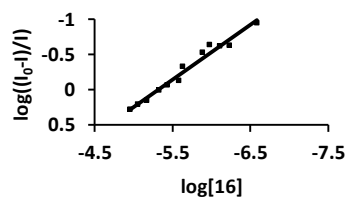
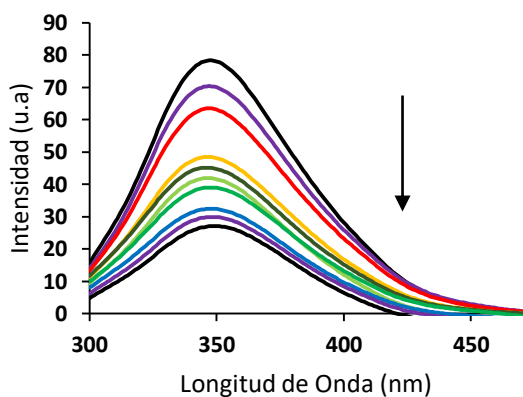
### 3.2.4.2. Sitio de unión selectiva de la BSA

Los análisis de estructura cristalina<sup>61</sup> revelan que la albúmina sérica (AS) contiene tres dominios homólogos (I-III), y cada uno de ellos se compone de dos subdominios, A y B. La principal región de gran afinidad para la unión de ligandos, conocida como el sitio *Sudlow* I y II, se localiza en los subdominios IIA y IIIA.<sup>62</sup> Fármacos como la

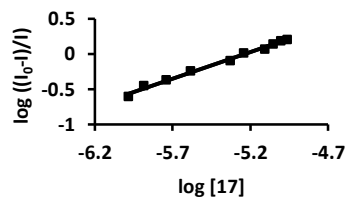
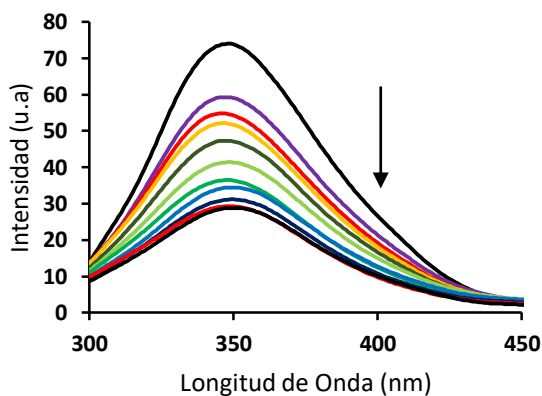
warfarina, fenilbutazona, etc, mostraron afinidad por el sitio de unión IIA, mientras que fármacos como el ibuprofeno, diazepam y ácido flufenámico, entre otros, muestran afinidad por el sitio IIIA.<sup>63</sup> Por tanto, la información acerca de la localización del sitio de unión para moléculas pequeñas en la región de la AS puede obtenerse mediante la monitorización de los cambios en el espectro de fluorescencia de AS unida a los marcadores del sitio I y II tras la adición de los compuestos ensayados. Con el objetivo de estudiar los sitios de unión de los compuestos **16** y **17**, se llevaron a cabo ensayos de competitividad utilizando warfarina e ibuprofeno como marcadores del sitio I y II respectivamente.

La intensidad de emisión del sistema AS-warfarina desciende si un segundo ligando compite por el sitio ocupado. Ya que la warfarina interacciona con el triptófano 213 en el subdominio hidrofóbico IIA (perteneciente al sitio I) de la BSA, la accesibilidad al trp 213 en la BSA por los ligandos se puede confirmar mediante la monitorización de los espectros de fluorescencia del sistema AS-warfarina cuando se añade un segundo ligando. Una disminución en la intensidad de emisión del sistema BSA-warfarina (1:1) se observa tras la adición de los compuestos **16** y **17** (figura VI.15). La disminución en la intensidad de emisión fue diferente cuando el mismo experimento se realizó sin warfarina. Con warfarina se observó una disminución menor, lo que sugiere que el marcador del sitio I puede prevenir la unión de los compuestos **16** y **17**. Este hecho solo refleja cierta preferencia por el Trp 213 en la BSA por ambos compuestos. Además, es muy probable que la unión ocurra en el sitio I de la warfarina, localizado en el subdominio IIA.

A)



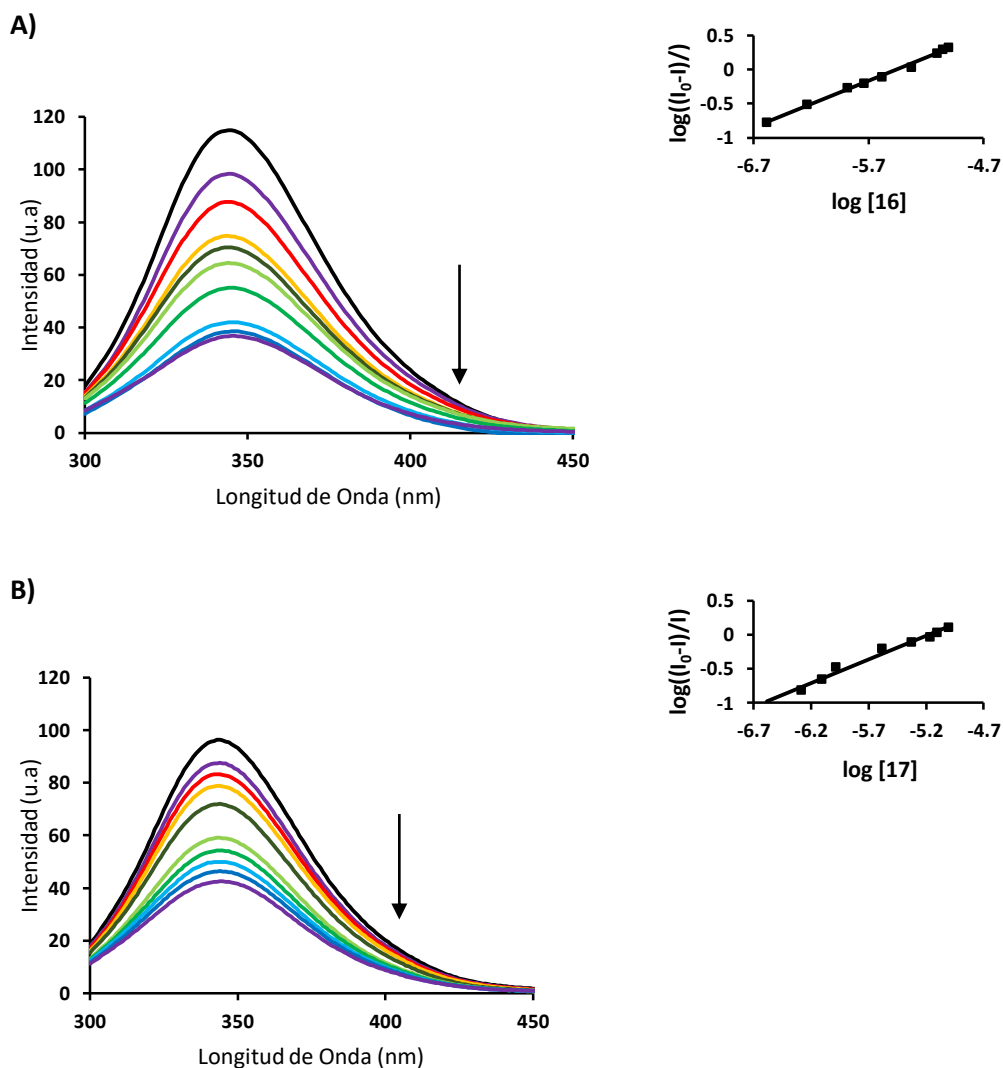
B)



**Figura VI.15:** Espectro de emisión de fluorescencia de BSA-Warfarina (1:1) en presencia de concentraciones crecientes de **16** (A) y **17** (B) [ $2.6 \times 10^{-7}$  M a  $1.1 \times 10^{-5}$  M] tampón cacodilato 0.1 M (pH= 6.0), 10% DMF. [BSA]=[warfarina] =  $1.3 \times 10^{-6}$  M. Las flechas indican los cambios en la intensidad de emisión de BSA-warfarina tras la adición de los compuestos.

Como se puede observar en la figura **VI.16**, en presencia de ibuprofeno, el marcador del sitio II, también se observó un descenso en la intensidad de emisión tras la adición de los compuestos **16** y **17**. La desactivación de la fluorescencia fue menor que la observada en ausencia de ibuprofeno, sugiriendo así que la unión de los compuestos **16** y **17** estuvo afectada por la adición del ibuprofeno y que los dos compuestos se unen al sitio II de la BSA.

Para facilitar la comparación de la influencia de la warfarina e ibuprofeno en la unión de los compuestos **16** y **17** a la BSA, se analizaron las constantes de unión en presencia de estos marcadores mediante la ecuación [3]. Tal y como se muestra en la tabla **VI.6**, para ambos compuestos los valores de las constantes de unión disminuyen claramente en presencia de warfarina o ibuprofeno, siendo este efecto más remarcable con el ibuprofeno. Todos estos resultados indican que **16** y **17** se unen a la BSA en el sitio I, principalmente, y en menor medida al sitio II.<sup>64</sup> Resultados similares fueron publicados para la aspirina.<sup>54</sup>



**Figura VI.16.** Espectro de emisión fluorescente del sistema BSA-ibuprofeno (1:1) en presencia de concentraciones en aumento de **16** (A) y **17** (B) [ $0.26 \times 10^{-6}$  M to  $1.1 \times 10^{-5}$  M]. 0.1 M cacodilato buffer (pH= 6.0), 10% DMF. [BSA]=[ibuprofeno] =  $1.3 \times 10^{-6}$  M. Las flechas indican los cambios en la intensidad de emisión de BSA-ibuprofeno por la adición de los compuestos



#### 4. CONCLUSIONES

1. La serie de triazolopiridil cetonas **12a-c**, **13a**, **14a-c**, **15** y **17** se ha extendido con la síntesis de nuevos compuestos, **13b**, **c** y **16**, lo que contribuye a proporcionar una mayor diversidad estructural a esta familia de compuestos.
2. Se realizaron ensayos antileishmania, *in vitro* e *in vivo*, para todas las triazolopiridil cetonas **12-17**. La actividad *in vitro* frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania* spp. resultó ser prometedora para los compuestos **16** y **17**. Además, el compuesto **16** presentó una gran reducción de la carga parasitaria en hígado y bazo de ratones tratados, mientras que el compuesto **17** solo mostró buena actividad *in vivo* frente a los parásitos esplénicos.
3. Los estudios de interacción con ADN, realizados para los compuestos más activos **16** y **17**, demostraron que ambos compuestos tienen la capacidad de unirse a los surcos de la doble hélice del ADN con gran afinidad. La interacción con el ADN podría ser un mecanismo para explicar, en parte, la actividad antileishmania de estos compuestos.
4. La interacción de **16** y **17** con la BSA se ha investigado debido a la importancia biológica de proteínas de albúmina como transportadores de numerosos fármacos. Las triazolopiridil cetonas **16** y **17** han demostrado tener una gran afinidad por la BSA. Ambos compuestos interaccionan en los sitios de unión I y II, con cierta preferencia por el primero. Cabe resaltar, que los valores de las constantes de unión no son demasiado bajas para prevenir una distribución eficiente ni tan elevadas para disminuir su concentración en plasma. Este comportamiento podría justificar su buena actividad *in vivo*.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Química

#### 5.1.1. Materiales y Métodos

Los puntos de fusión se determinaron en un Büchi B-545. Los espectros de RMN se registraron en un Bruker AC 300 MHz o 500 MHz en CDCl<sub>3</sub> o DMSO-*d*<sub>6</sub> como disolventes. Experimentos COSY se llevaron a cabo para todos los compuestos. Las determinaciones HRMS de impacto electrónico (IE) o Electrospray (ES) se realizaron utilizando un VG Autoespect Trio 1000 (Fisons). Todas las reacciones de litación se llevaron a cabo bajo una atmosfera inerte y disolventes anhidros.<sup>65</sup> Todos los reactivos utilizados se obtuvieron de fuentes comerciales (Aldrich).

#### 5.1.2. Procedimiento general para la síntesis de los compuestos **2**, **3**, **10**, **11**, **12a-c**, **13a**, **14a-c**, **15** y **17**

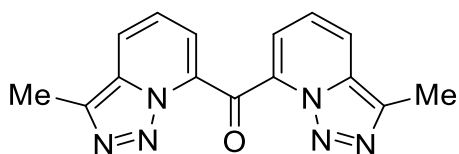
[1,2,3]Triazolo[1,5-*a*]piridina **2**,<sup>66</sup> 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina **3**,<sup>66</sup> 3-fenil-[1,2,3]triazolo [1,5-*a*]piridina **10**,<sup>67</sup> 3-(2-piridil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina **11**,<sup>68</sup> [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il 2-piridil cetona **12a**,<sup>69</sup> 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il piridin-2-il cetona **12b**,<sup>69</sup> 3-fenil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il piridin-2-il cetona **12c**,<sup>69</sup> piridin-2-il 6-([1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-3-il)piridin-2-il cetona **15**,<sup>21,62</sup> bis([1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il) cetona **13a**,<sup>22</sup> [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il 6-([1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il carbonil)-2-piridil cetona **14a**,<sup>23</sup> 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il 6-(3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il carbonil)-2-piridil cetona **14b**,<sup>23</sup> 3-fenil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il 6-(3-fenil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il carbonil)-2-piridil cetona **14c**,<sup>23</sup> 6-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-3-il-2-piridil 6-(6-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-3-il-2-piridil carbonil)-2-piridil cetona **17**,<sup>23</sup> fueron preparados como están descritos.

### 5.1.3. Procedimiento general para la síntesis de bistriazolopiridil cetonas **13b**, **c** y bistriazolopiridil piridil cetona **16**

Una solución de n-butil litio en hexano (1.5 M) se añadió a una solución en agitación de la correspondiente [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina **3**, **10** o **11** en tolueno anhidro a -40 °C. La reacción se tornó de un color rojo intenso. La mezcla de reacción se mantuvo a -40 °C durante 30 minutos. Posteriormente, la triazolopiridina litiada se añadió mediante una doble jeringa a una disolución de dietil carbonato destilado en tolueno anhidro (10 mL). La mezcla se mantuvo a -40 °C durante 2h y posteriormente se dejó a temperatura ambiente durante 1h. Tras este tiempo, la reacción se trató con una solución saturada de cloruro de amonio. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con diclorometano. Después de secar las fases orgánicas con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporar los disolventes orgánicos, se obtuvo el compuesto deseado.

### 5.1.4. Bis(3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il) cetona **13b**

Se utilizó como producto de partida el compuesto **3** (0.5 g, 3.8 mmol), tolueno (50 mL), nBuLi (2.7 mL), carbonato de dietilo (0.22 g, 1.9 mmol). El residuo se trató con acetato de etilo y el compuesto **13b** precipitó en forma de sólido amarillo (60.0 mg). El filtrado se purificó mediante cromatografía con hexano-acetato de etilo como eluyente obteniéndose una cantidad adicional del mismo compuesto (161 mg), con un rendimiento total de 41%.



pf: 149-150 °C.

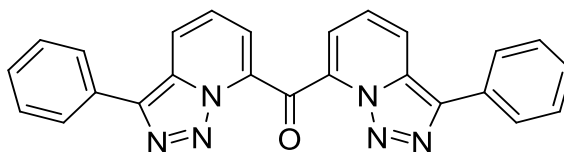
HMRS calculado para C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O M<sup>+</sup> 292.1076; Encontrado: 292.1073.

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz)  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.85 (dd,  $J = 8.9, 1.2$  Hz, 2H), 7.67 (dd,  $J = 6.9, 1.2$  Hz, 2H), 7.36 (dd,  $J = 8.9, 6.9$  Hz, 2H), 2.52 (s, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz)  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 180.0 (CO), 135.7 (C), 135.1 (C), 132.3 (C), 123.8 (CH), 122.4 (CH), 119.9 (CH), 10.7 ( $\text{CH}_3$ ). MS (E. I.)  $m/z$  (%): 292 (21), 264 (41), 236 (54), 235 (93), 207 (78), 104 (100), 77 (64).

### 5.1.5. Bis(3-fenil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il) cetona **13c**

Producto de partida el compuesto **10** (0.5 g, 3.8 mmol), tolueno (35 mL),  $n\text{BuLi}$  (1.9 mL), carbonato de dietilo (0.15 g, 1.3 mmol). El residuo se purificó mediante cromatografía FLASH + 40TM (Recambios Biotage) sobre silica gel con hexano-acetato de etilo como eluyente obteniéndose el compuesto **13c** (196 mg, 36%).



pf: 218-219  $^{\circ}\text{C}$ .

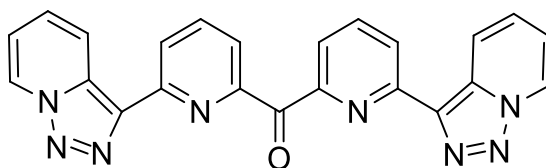
HMRS calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$   $\text{M}^+$  388.1300; Encontrado: 388.1324.

$^1\text{H NMR}$  (300MHz)  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.26 (dd,  $J = 9.0, 1.2$ Hz, 2H), 7.84 (dd,  $J = 8.1, 1.5$ Hz 4H), 7.79 (dd,  $J = 6.9, 1.2$ Hz, 2H), 7.52 (dd,  $J = 8.9, 6.9$ Hz, 2H), 7.47 (m, 4H), 7.37 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (75MHz)  $\delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 180.9 (CO), 139.3 (C), 135.4 (C), 131.1 (C), 131.1 (C), 129.4 (CH), 128.7 (CH), 127.3 (CH), 125.8 (CH), 123.5 (CH), 120.1 (CH). MS (E. I.)  $m/z$  (%): 388 (100), 360 (15), 332 (11), 331 (19), 285 (30), 256 (8), 208 (3), 139 (5).

### 5.1.6. Bis{6-([1,2,3]triazolo[1,5- $\sigma$ ]piridin-3-il) piridin-2-il} cetona 16

Producto de partida el compuesto **11** (0.45 g, 2.3 mmol), tolueno (30 mL), nBuLi (1.7 mL), dietil carbonato (0.14 g, 1.2 mmol). El residuo se trató con acetato de etilo y el compuesto **16** precipitó como un sólido amarillo (110 mg). El filtrado se purificó mediante cromatografía FLASH + 40TM (Recambios Biotage) sobre sílica gel con hexano-acetato de dietilo como eluyente obteniéndose una cantidad adicional del compuesto **16** (67 mg) para dar un rendimiento total de 37 %.



**pf:** 138-142 °C.

**HMRS** calculado para  $C_{23}H_{14}N_8O$   $M^+$ : 418.1293; Encontrado: 418.1291.

**$^1H$  NMR (300 MHz)  $\delta$  ( $CDCl_3$ ):** 8.62 (m, 4H), 8.23 (m, 2H), 8.07 (s, 2H), 8.06 (d,  $J = 1.7$  Hz, 2H), 6.86(m, 4H).  **$^1H$  NMR (500 MHz)  $\delta$  (DMSO- $d_6$ ):** 9.05 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 8.53 (dd,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 2H), 8.26 (dd,  $J = 7.8, 7.8$  Hz, 2H), 8.07 (dd,  $J = 7.7, 1.0$  Hz, 2H), 8.02 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.07 (ddd,  $J = 6.7, 6.7, 1.4$  Hz, 2H), 6.98 (ddd,  $J = 8.7, 6.7, 1.1$ Hz, 2H).

**$^{13}C$  NMR (125.7 MHz)  $\delta$  ( $CDCl_3$ ):** 197.0 (CO), 153.8 (C), 150.5 (C), 138.4 (CH), 135.3 (C), 131.3 (C), 127.2 (CH), 125.9 (CH), 122.5 (CH), 122.2 (CH), 119.4 (CH), 116.5 (CH). **MS (E. I.)  $m/z$  (%):**418 (33), 390 (100), 362 (51), 333 (70), 306 (17), 284 (23), 257 (30), 231 (26), 167 (52), 140 (62), 113 (27), 78 (39).

## 5.2. Actividad Biológica

### 5.2.1. Fármacos y Reactivos

La sal sódica de Resazurina se obtuvo de Sigma-Aldrich, St. Louis, USA y se conservó a 4 °C protegida de la luz. La solución de resazurina se preparó a 2.5 mM en tampón fosfato salino (PBS), pH 7.4 y se filtró antes de su uso. El fármaco de referencia miltefosina fue obtenido también a través de Sigma-Aldrich. Las soluciones de CT-ADN (Tipo XV, Sigma-Aldrich) se prepararon en agua destilada. La concentración en moles de nucleótidos por litro del ADN se determinó mediante la absorbancia UV a 260 nm de una disolución 1:20 utilizando el coeficiente de extinción molar de  $\epsilon_{\text{CT-DNA}} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .<sup>27</sup> BSA, warfarina e ibuprofeno se obtuvieron a través de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin ninguna purificación previa al ensayo.

### 5.2.2. Ensayos leishmanicidas

#### 5.2.2.1. Parásitos y procedimientos de cultivos

Para estos ensayos se utilizaron las siguientes especies de *Leishmania*: *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN150) especie autóctona aislada de un perro asintomático de la región del Priorat (Catalunya, España), facilitada por la profesora Montserrat Portús (Universidad de Barcelona); *L. braziliensis* 2903, *L. amazonensis* (MHOM/Br/79/María) y *L. guyanensis* 141/93 fueron facilitadas por el profesor Alfredo Toraño (Instituto de Salud Carlos III). Los promastigotes fueron cultivados en el medio de cultivo Schneider (Sigma) a 26 °C completado con un 20 % de Serum Fetal Bovino (FBS) (Sigma) y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin (Sigma) en frascos de cultivo de una capacidad de 25 mL.

### **5.2.2.2. Ensayos *in vitro* de susceptibilidad de promastigotes**

Este ensayo se llevó a cabo siguiendo un método ya descrito anteriormente.<sup>40</sup> Brevemente, promastigotes en fase logarítmica ( $2.5 \times 10^5$  parásitos/pocillo) fueron cultivados en placas de plástico de 96 pocillos. Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadieron a disoluciones en serie hasta obtener un volumen final de 200  $\mu$ L. El DMSO nunca sobrepasó el 0.2% (v/v) en las disoluciones finales. Tras 48 h a 26 °C, se añadieron 20  $\mu$ L de una disolución de resazurina de 2.5 mM y se determinó la intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación de 535 nm y longitud de onda de emisión de 590 nm) con un espectrofluorímetro Infinite 200 (Tecan i-Control) para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. La miltefosina se utilizó como fármaco de referencia. La eficacia de cada compuesto se determinó calculando la IC<sub>50</sub> y el porcentaje de inhibición de crecimiento.

### **5.2.2.3. Ensayos *in vitro* de susceptibilidad de amastigotes intracelulares**

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Bilbao-Ramos y colaboradores.<sup>70</sup> El protocolo se basa en la siembra de  $5 \times 10^4$  de macrófagos J774 y promastigotes estacionarios con una relación de 1:10, en cada pocillo de una placa de microtitulación, suspendidos en 200  $\mu$ L de medio de cultivo e incubados durante 24h a 33 °C, 5% CO<sub>2</sub> en una cámara humidificada. Tras esta primera incubación, la temperatura se elevó a 37 °C durante otras 24h. Posteriormente, las células se lavaron varias veces en el medio de cultivo y se centrifugaron a 1500 g durante 5 minutos con el objetivo de eliminar los promastigotes libres que no han infectado al macrófago. Por último, el sobrenadante se reemplazó por medio de cultivo (200  $\mu$ L/pocillo) el cual contiene diluciones seriadas (1:2) de los compuestos analizados, estudiados en un ensayo realizado por triplicado. Tras una incubación durante 48h a

37 °C, 5% CO<sub>2</sub> en una cámara humidificada, el medio de cultivo se reemplazó por una solución de lisis (200 µL/pocillo RPMI-1640 con 0.048% HEPES y 0.006% SDS) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras los 20 minutos de incubación, las placas se centrifugaron a 1500 g durante 5 minutos y la solución de lisis se reemplazó por 200 µL/pocillo de medio *Insect Schneider*. Las placas de cultivo se incubaron, posteriormente, a 26 °C durante otros 3 días para permitir la transformación de amastigotes viables en promastigotes y su proliferación. Por último, 20 µL/pocillo de 2.5 mM de resazurina se añadió y se incubó durante otras 3 h. Finalmente, la emisión de fluorescencia se midió como se describe en el apartado 5.2.3.2.

#### **5.2.2.4. Ensayo leishmanicida *in vivo***

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en ratones BALB/c infectados con una cepa virulenta de *L. infantum* MCAN/ES/96/BCN150. La infección tuvo lugar en las mismas condiciones previamente descritas.<sup>40</sup> Cada ratón fue infectado con 10<sup>7</sup> promastigotes en fase estacionaria, mediante ruta intracardiaca (IC) seguida de anestesia con pentobarbital sódico. La carga parasitaria en hígado y bazo se estimó mediante el método de dilución limitante descrito por Titus y colaboradores,<sup>71</sup> adaptado a las condiciones de nuestro laboratorio.

Los protocolos terapéuticos se llevaron a cabo del siguiente modo: los ratones fueron repartidos arbitrariamente en siete grupos. Un grupo se mantuvo como grupo control no tratado. El tratamiento empezó el día 21 después de la infección y duró 5 días seguidos. Los animales se trataron una vez al día y se les administró 5mg/kg de compuesto por vía intraperitoneal con un volumen final de 0.1 mL de una solución de propilenglicol. Tras siete días, los ratones fueron sacrificados y se evaluó la carga parasitaria de los mismos.



Todos los experimentos con animales y protocolos fueron aprobados por los comités de ética y protección de animales de laboratorio utilizados para fines científicos.

### **5.2.3. Ensayos de citotoxicidad**

#### **5.2.3.1. Cultivos celulares**

Los macrófagos murinos J774 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma) complementada con 10% de FBS (30 minutos a 56 °C), penicilina G (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Para los ensayos, las células, en fase de pre-confluencia se despegaron de la placa de cultivo utilizando tripsina. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en un ambiente humidificado con un 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### **5.2.3.2. Ensayos de citotoxicidad en macrófagos J774**

El procedimiento para las medidas de viabilidad celular se evaluó con resazurina por un método de colorimetría descrito previamente.<sup>72</sup> Las líneas celulares de macrófagos J774 se sembraron (5 x 10<sup>4</sup> células/pocillo) en una microplaca de 96 pocillos con 100 µL del medio RPMI 1640. Las células se incubaron durante 24h para permitir su adherencia, a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. El medio se reemplazó con diferentes concentraciones de los compuestos en 200 µL de medio, y se trataron durante otras 24h. Los controles de crecimiento fueron también incluidos. Tras las 24 h de tratamiento, una solución de 20 µL con una concentración de 2.5 mM de resazurina se añadió y las placas se incubaron de nuevo durante otras 3 h para poder así evaluar la viabilidad celular. La reducción de resazurina se evaluó mediante la intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación 535 nm y longitud de onda de emisión 590 nm) como en el ensayo de promastigotes. Cada concentración fue ensayada por triplicado. El medio de cultivo y los fármacos controles se utilizaron en cada ensayo como blancos.

### 5.2.3.3. Estadística

Los datos se registran como el resultado de tres experimentos repetidos. La eficacia frente a los parásitos ( $IC_{50}$ ) y el efecto de la citotoxicidad ( $CC_{50}$ ) de los compuestos se determinó mediante curvas de análisis multilinear probit. Para los ensayos *in vitro* todos los datos se analizaron mediante el Tukey's HSD-test post-hoc y los ensayos *in vivo* se analizaron mediante Whitney U-Mann. La significancia estadística se consideró a  $p \leq 0.05$  utilizando SPSS v20.0 y el Microsoft Excel 2007.

## 5.2.4 Ensayos de interacción con ADN

### 5.2.4.1. Valoraciones UV-Visible

Los espectros UV-vis de las muestras se registraron a 25 °C en un espectrofotómetro UV-vis Agilent 8453 equipado con un Peltier para controlar la temperatura y un driver (Agilent 89090A). Las valoraciones de absorción electrónica se realizaron mediante la adición de ADN a la solución del compuesto a ensayar a concentraciones fijas. Las muestras se prepararon en tampón cacodilato 0.1 M (pH = 6.0), 10% DMF y la concentración de cada compuesto a ensayar fue de 10  $\mu$ M. Tras cada adición de ADN, se dejó que la mezcla se equilibrara antes de registrar los espectros. Para corregir la absorbancia del ADN, se registraron los espectros UV del CT-ADN en las mismas condiciones experimentales y después los espectros de ADN se restaron de los espectros del compuesto más ADN.

#### 5.2.4.2. Medidas de viscosidad

Los ensayos de viscosidad se llevaron a cabo con un viscosímetro semi-micro Ubbelodhe inmerso en un baño de termostato Julabo ME16G mantenido a  $25 \pm 0.1$  °C. Las muestras, de 4 mL, se componían de una disolución del compuesto a ensayar con una concentración final de 1-10  $\mu\text{M}$  y CT-DNA (50  $\mu\text{M}$ ) en tampón cacodilato (pH = 6.0), 10% DMF. Los tiempos de flujo se midieron por triplicado con un cronómetro. Los datos se analizaron como  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  frente a la relación de la concentración del compuesto y el ADN, donde  $\eta$  es la viscosidad del ADN en presencia del compuesto y  $\eta_0$  es la viscosidad del ADN libre. Los valores de viscosidad se calcularon a partir del tiempo de flujo observado de una disolución de ADN corregida para el tiempo de flujo del tampón cacodilato ( $t_0$ ),  $\eta = t - t_0$ .

#### 5.2.5. Ensayos de unión a la proteína BSA

##### 5.2.5.1. Medidas de fluorescencia

Los análisis cuantitativos de la interacción de los compuestos **16** y **17** con la albúmina sérica bovina (BSA) se realizaron mediante valoraciones de fluorescencia. Los espectros de fluorescencia se registraron con un espectrofluorímetro Jasco FP6200 a temperatura ambiente. Una solución stock de BSA ( $2.0 \times 10^{-4}$  M) se preparó en tampón cacodilato 0.1 M a pH = 6.0 y se mantuvo a 0-4 °C en oscuridad, máximo durante dos días, y posteriormente diluida con tampón cacodilato hasta obtener una disolución de  $1.3 \times 10^{-6}$  M. Las soluciones de los compuestos **16** y **17** (1.0 M y 0.5 M, respectivamente) se prepararon en DMF. La solución de BSA ( $1.3 \times 10^{-6}$  M) (3 mL) se valoró mediante sucesivas adiciones de la disolución de compuesto para dar un rango de concentraciones finales de  $2.6 \times 10^{-7}$  a  $1.1 \times 10^{-5}$  M. Para cada adición, se esperó 10 minutos para permitir a la solución resultante alcanzar el equilibrio. Las muestras se excitaron a 280 nm y la emisión se registró entre 300 y 450 nm.

### 5.2.5.2. Estudios de absorción UV

Las medidas de absorción UV de la BSA en presencia y ausencia de **16** y **17** se registraron en un rango de 200-350 nm. La concentración de BSA era de  $5.2 \times 10^{-6}$  y la concentración de los compuestos de  $2.6 \times 10^{-6}$ . Las muestras se prepararon en tampón cacodilato 0.1 M, pH = 6.0, 10% DMF. Para corregir la absorbancia de los compuestos, se registraron los espectros UV de ambos compuestos bajo las mismas condiciones experimentales y posteriormente, estos espectros se restaron a aquellos espectros de la BSA con el compuesto.

### 5.2.5.3. Ensayos de competitividad

Los estudios para localizar el sitio de unión de los compuestos **16** y **17** cuando se unen a la BSA, en presencia de warfarina como marcador del sitio I e ibuprofeno como marcador del sitio II, se llevaron a cabo utilizando métodos de valoración de la fluorescencia. Las disoluciones stock de warfarina e ibuprofeno ( $2.5 \times 10^{-3}$  y  $2.0 \times 10^{-3}$  para **16** y **17** respectivamente) se prepararon en DMF y posteriormente diluidas a la concentración necesaria con tampón cacodilato 0.1 M (pH = 6.0). Los ensayos de desplazamiento se llevaron a cabo mediante la preparación de mezclas equimolares de biomacromoléculas ( $1.30 \times 10^{-6}$  M) y warfarina o ibuprofeno ( $1.30 \times 10^{-6}$  M), los cuales se mezclaron y equilibraron a temperatura ambiente durante 1 h. La disolución (3 ml) se valoró mediante sucesivas adiciones de soluciones de los compuestos **16** o **17**. Tras la completa mezcla de la solución resultante en cada adición de la valoración, las soluciones se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir llegar al equilibrio. Las muestras se excitaron a 280 nm y la emisión se registró a 300 y 450 nm.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.who.int.topics/leishmaniasis/en/7>.
2. <http://www.who.int/publications/2010/9789241564090>.
3. M. P. Barret, S. L. Croft, *British Med. Bull.*, **2012**, *104*, 175.
4. S. Espuelas, D. Plano, P. Nguewa, M. Font, J. A. Palop, J. M. Irache, C. Sanmartín, *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*, 4259.
5. C. Marín, M. P. Clares, I. Ramírez-Macías, S. Blasco, F. Olmo, C. Soriano, B. Verdejo, M. J. Rosales, D. Gomez-Herrera, E. García-España, M. Sánchez-Moreno, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 466.
6. K. Chauhan, M. Sharma, R. Shivahare, U. Debnath, S. Gupta, Y. S. Prabhakar, P. M. S. Chauhan, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1108.
7. a) C. Galiana-Roselló, P. Bilbao-Ramos, M. A. Dea-Ayuela, M. Rolon, C. Vega, F. Bolas-Fernández, E. García-España, J. Alfonso, C. Coronel, M. E. González-Rosende, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8984.  
b) S. Sundar, J. Chakravarty., *Expert Opin. Pharmacother.*, **2015**, *16*, 237.
8. a) C. McKeever, M. Kaiser, I. Rozas, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 700.  
b) C. Darndonville, J. Martínez, N. Jonathan. *Current Med. Chem.*, **2017**, *24*, 3606.
9. G. C. Tron, T. Piralí, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278.
10. S. G. Agalave, S. R. Maujan, V. S. Pore, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2696.
11. G. L. Almajan, S. F. Barbuceanu, E. R. Almajan, C. Draghici, G. Saramet, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3083.
12. O. A. Phillips, E. E. Udo, M. E. Abdel-Hamid, R. Varghese, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3217.
13. K. S. Bauer, K. J. Cude, S. C. Dixon, E. A. Kruger, W. D. Figg, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 31.

14. A. Kumar, I. Ahmad, B. S. Chhikara, R. Tiwari, D. Mandal, K. Parang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1342.
15. M. J. Giffin, H. Heaslet, A. Brik, Y. C. Lin, G. Cauvi, C. H. Wong, D. E. McRee, J. H. Elder, C. D. Stout, B. E. Torbett, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6263.
16. N. G. Aher, V. S. Pore, N. N. Mishra, A. Kumar, P. K. Shukla, A. Sharma, M. K. Bhat, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 759.
17. V. Patil, W. Guerrant, P. C. Chen, B. Gryder, D. B. Benicewicz, S. I. Khan, B. L. Tekwani, A. K. Oyelere, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 415.
18. A. Tahghighi, S. Razmi, M. Mahdavi, P. Foroumadi, S. K. Ardestani, S. Emami, F. Kobarfard, S. Dastmalchi, A. Shafiee, A. Foroumadi, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 124.
19. T. T. Guimarães, M. d. C. F. R. Pinto, J. S. Lanza, M. N. Melo, R. L. do Monte-Neto, I. M. M. de Melo, E. B. T. Diogo, V. F. Ferreira, C. A. Camara, W. O. Valença, R. N. de Oliveira, F. Frézard, E. N. da Silva Junior, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 523.
20. a) S. N. Suryawanshi, A. Tiwari, S. Kumar, R. Shivahare, M. Mittal, P. Kant, S. Gupta, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *23*, 2925.  
b) P. H. F. Stroppa, L. M. R. Antinarelli, A. M. L. Carmo, J. Gameiro, E. S. Coimbra, A. D. da Silva, *Bioorg. Med. Chem.*, **2017**, *25*, 3034.
21. B. Abarca, R. Ballesteros, M. Chadlaoui, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5785.
22. G. Jones, D. R. Sliskovic, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 967.
23. B. Abarca, R. Ballesteros, M. Chadlaoui, *ARKIVOC* **2008**, (vii), 73.
24. G. Jones, D. R. Sliskovic, *Adv. Heterocyclic Chem.* **1983**, *34*, 79.
25. G. Jones, *Adv. Heterocyclic Chem.* **2002**, *83*, 1.
26. B. Abarca, G. Jones, *Adv. Heterocyclic Chem.* **2010**, *100*, 195
27. B. Abarca-González, *J. Enz. Inh. Med. Chem.* **2002**, *17*, 359.
28. B. Abarca, R. Ballestero-Garrido, *Topics in Heterocyclic Chemistry.* **2015**, *40*, 325.

29. B. Abarca, R. Ballesteros, M. Elmasnaouy, P. D'Ocon, M. D. Ivorra, M. Valiente, *Arkivoc*, **2002**, x, 9.
30. J.P. Kiss, E.S. Vizi, *Trends in Neuroscience*, **2001**, 24, 211
31. M. Kadekaro, J. Y. Summy-Long, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2000**, 27, 450.
32. D.S. Bredt, *Free Radical Research*, **1999**, 31, 577.
33. P. Schumann, V. Collot, Y. Hommet, W. Gsell, F. Dauphin, J. Sopkova, E. MacKenzie, D. Duval, M. Boulouard, S. Rault, *Bior. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1153.
34. A. Tuynman, C. Pérollier, Y. Frapart, P. Schumann, V. Collot, S. Rault, J. L. Boucher, *Nitric Oxide*, **2003**, 9, 86
35. B. Abarca, R. Ballesteros, F. Blanco, V. Collot, S. Rault, P. Schumann-Bard, *XIII Congreso Nacional de la Real Sociedad Española de Química Terapéutica*, **2003**, Santiago de Compostela (Spain).
36. R. Adam, P. Bilbao-Ramos, B. Abarca, R. Ballesteros, M. E. González-Rosende, M. A. Dea-Ayuela, F. Estevan, G. Alzuer-Piña, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 4903.
37. A. Martin-Montes, R. Ballesteros-Garrido, R. Martin-Escolano, C. Marin, R. Gutierrez-Sánchez, B. Abarca, R. Ballesteros, M. Sánchez-Moreno, *RSC Advances*, **2017**, 7, 15715.
38. P. J. Llabrés-Campaner, LL. Guijarro, C. Giarratano, R. Ballesteros-Garrido, R. J. Zaragoza, M. J. Aurell, E. García-España, R. Ballesteros, B. Abarca, *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 12825.
39. B. Abarca, I. Alkorta, R. Ballesteros, F. Blanco, M. Chadlaoui, J. Elguero, F. Mojarrad, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3905.

40. M. A. Dea-Ayuela, E. Castillo, M. Gonzalez-Alvarez, C. Vega, M. Rolón, F. Bolás-Fernández, J. Borrás, M. E. González-Rosende, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7449.
41. K. Lemke, M. Wojciechowski, W. Laine, H. Bailly, P. Colson, M. Baginski, A. K. Larsen, A. Skladanowski, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6034.
42. E. Zabost, A. M. Nowicka, Z. Mazerska, Z. Stojek, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 3408.
43. T. Sun, Y. Zhang, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1654.
44. K. R. Fox, *Drug-DNA interaction protocols, Vol. 90*, Humana Press Inc, New Jersey, **1997**.
45. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2013**, *124*, 1.
46. A. Wolfe, G. H. Shimer, T. Meehan, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6392.
47. X. Li, Y. Lin, Q. Wang, Y. Yuan, H. Zhang, X. Qian, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1274.
48. S. Satyanarayana, J. C. Dabrowiak, J. B. Chaires, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9319.
49. D. Suh, Y. K. Oh, J. B. Chaires, *Process Biochem.* **2001**, *37*, 521.
50. D. C. Carter, J. X. Ho, in *Adv. Prot. Chem., Vol. Volume 45* (Eds.: J. T. E. F. M. R. C.B. Anfinsen, S. E. David), Academic Press, **1994**, pp. 153.
51. Y. Z. Zhang, J. Dai, X. Xiang, W.-W. Li, Y. Liu, *Mol. Biol. Rep.* **2010**, *37*, 1541.
52. B. Sandhya, A. H. Hegde, S. S. Kalanur, U. Katrahalli, J. Seetharamappa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 1180.
53. Y. J. Hu, Y. Ou-Yang, C. M. Dai, Y. Liu, X. H. Xiao, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 106.
54. Y. Ni, R. Zhu, S. Kokot, *Analyst* **2011**, *136*, 4794.



55. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer Science + Business Media, New York, **2006**.
56. C. Y. Gao, X. Qiao, Z. Y. Ma, Z. G. Wang, J. Lu, J. L. Tian, J. Y. Xu, S. P. Yan, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 12220.
57. M. R. Eftink, C. A. Ghiron, *J. Phys. Chem.* **1976**, *80*, 486.
58. F. Samari, B. Hemmateenejad, M. Shamsipur, M. Rashidi, H. Samouei, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 3454.
59. Y. He, Y. Wang, L. Tang, H. Liu, W. Chen, Z. Zheng, G. Zou, *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 433.
60. P. Sathyadevi, P. Krishnamoorthy, R. R. Butorac, A. H. Cowley, N. S. P. Bhuvanesh, N. Dharmaraj, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 9690.
61. X. M. He, D. C. Carter, *Nature* **1992**, *358*, 209.
62. G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11*, 824.
63. Y. Ni, S. Su, S. Kokot, *Analyt. Chim. Acta* **2006**, *580*, 206.
64. Y. Li, X. Yao, J. Jin, X. Chen, Z. Hu, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2007**, *1774*, 51.
65. D. Perrin, L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd Ed., Pergamon, Oxford, **1988**.
66. J. D. Bower, G. R. Ramage, *J. Chem. Soc.* **1957**, 4506.
67. J. H. Boyer, N. Goebel, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 304.
68. B. Abarca, R. Ballesteros, M. Elmasnaouy, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15287.
69. B. Abarca, R. Ballesteros, M. Chadlaoui, *ARKIVOC* **2002**, *x*, 52.
70. P. Bilbao-Ramos, S. Sifontes-Rodríguez, M. A. Dea-Ayuela, F. Bolás-Fernández, *J. Microbiol. Methods* **2012**, *89*, 8.
71. R. G. Titus, M. Marchand, T. Boon, J. A. Louis, *Parasite Immunol.* **1985**, *7*, 545.

72. M. Rolón, E. M. Seco, C. Vega, J. J. Nogal, J. A. Escario, A. Gómez-Barrio, F. Malpartida, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *28*, 104.